

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Michael Lohoff
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Der Einfluss der kurzkettigen Fettsäure Valproat auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Carina Breidenbend
aus Grevenbroich

Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 07.09.2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Frau Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr Prof. Dr. Alexander Visekruna

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. Bernd Schmeck

Widmung

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Verzeichnisse	1
1.1 Abbildungsverzeichnis.....	1
1.2 Tabellenverzeichnis.....	1
1.3 Abkürzungsverzeichnis	2
2 Einleitung	4
2.1 Das Immunsystem.....	4
2.2 T-Lymphozyten.....	5
2.2.1 CD4 ⁺ T-Lymphozyten	6
2.2.2 CD8 ⁺ T-Lymphozyten	9
2.3 Plastizität der T-Zellsubtypen	11
2.4 Histondeacetylase-Inhibitoren und ihr klinischer Einsatz	12
2.4.1 Physiologische Grundlagen von Histondeacetylasen	12
2.4.2 HDAC-Inhibition als epigenetische Tumorthherapie	14
2.4.3 Einfluss von Histondeacetylasen auf T-Zell-Immunantworten	15
2.4.4 Klinischer Einsatz von HDAC-Inhibitoren	16
2.5 Kurzkettige Fettsäuren (SCFAs) als Modulatoren des Immunsystems.....	17
2.6 Valproinsäure als Antiepileptikum und potenzielles Tumorthapeutikum	19
2.6.1 Wirkweise als Antiepileptikum	20
2.6.2 Wirkweise als potenzielles Tumorthapeutikum	21
2.6.3 Valproinsäure und SCFAs als HDAC-Inhibitoren	22
2.6.4 Effekte von Valproinsäure und SCFAs auf Immunzellen	23
2.7 Immunonkologie	24
2.8 Ziel der Arbeit	25
3 Material	26
3.1 Geräte	26

3.2	Verbrauchsmaterialien	27
3.3	Chemikalien und Reagenzien	27
3.4	Puffer und Medien	29
3.5	Antikörper	30
3.5.1	Antikörper für die magnetische Separation (MACS) der T-Zellen	30
3.5.2	Antikörper für die Zellkultur	30
3.5.3	Antikörper für die Durchflusszytometrie	31
3.6	Zytokine	31
3.7	Mausstämme	32
3.8	Software	32
4	Methoden	33
4.1	Zellbiologische Methoden	33
4.1.1	Organpräparation	33
4.1.2	Zellzahlbestimmung	33
4.1.3	Magnetische Isolation der CD4 ⁺ bzw. CD8 ⁺ T-Lymphozyten	34
4.1.4	Aktivierung und Differenzierung der CD4 ⁺ bzw. CD8 ⁺ T-Lymphozyten	35
4.1.5	Behandlung der Zellen mit Natrium-Valproat oder Natrium-Valerat	36
4.1.6	Nachweis von Proteinen mittels Durchflusszytometrie	37
4.2	Proteinbiochemische Methoden	40
4.2.1	ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay	40
4.2.2	HDAC-Aktivitätsassay	41
4.3	Statistische Analysen	42
5	Ergebnisse	43
5.1	Valproat induziert konzentrationsabhängig die Apoptose von T-Zellsubtypen ..	43
5.2	Valproat wirkt auf CD4 ⁺ T-Zellen als HDAC-Inhibitor	45
5.3	Die Generierung von Foxp3 ⁺ T _{regs} kann <i>in vitro</i> nicht durch Valproat gefördert werden	46

5.4	Die IFN- γ Expression in T _H 1-Zellen wird durch Valproat induziert	49
5.5	Valproat vermittelt eine Induktion von IFN- γ und eine Suppression zellspezifischer Zytokine in T _H 17-Zellen.....	51
5.6	Valproat wirkt auf CD8 ⁺ T-Zellen als HDAC-Inhibitor	54
5.7	Valproat verstärkt die zytotoxischen Fähigkeiten von CTL	55
5.8	Valproat vermittelt eine Induktion von IFN- γ und eine Suppression zellspezifischer Zytokine in T _C 17-Zellen.....	57
6	Diskussion.....	60
6.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	60
6.2	Valproat vermittelt auch bei Immunzellen eine dosisabhängige Apoptose-Induktion.....	61
6.3	CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen werden durch Valproat über eine HDAC-Inhibition beeinflusst	63
6.4	Valproat kann die Generierung von Foxp3 ⁺ T _{regs} <i>in vitro</i> nicht fördern, vermittelt jedoch die Induktion von IFN- γ in T _{regs}	64
6.5	Induktion von IFN- γ bei verschiedenen CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellsubtypen durch eine Valproat-vermittelte HDAC-Inhibition.....	66
6.6	Valproat-vermittelte Suppression zellspezifischer Zytokine in T _H 17- und T _C 17-Zellen.....	68
6.7	Potenzielle Verstärkung der zytotoxischen Fähigkeiten von CTL durch Valproat.....	70
6.8	Limitationen.....	71
6.9	Klinische Schlussfolgerungen und Ausblick.....	72

7 Zusammenfassung	74
8 Literaturverzeichnis.....	78
9 Anhang.....	95
9.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer	
9.2 Danksagung	

1 Verzeichnisse

1.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Differenzierung von CD4 ⁺ T-Zellen	8
Abbildung 2 – Zytokin-gesteuerte Plastizität der CD4 ⁺ T-Zellsubtypen	11
Abbildung 3 – Wirkweise von HDACs und HDAC-Inhibitoren.....	13
Abbildung 4 – Kurzkettige Fettsäuren (SCFAs).....	18
Abbildung 5 – Vergleich der chemischen Struktur von Valeriansäure und Valproinsäure	20
Abbildung 6 – Prinzip eines Sandwich ELISAs.....	40
Abbildung 7 – Prinzip eines HDAC-Aktivitätsassays	41
Abbildung 8 – Proapoptotischer Effekt von Valproat auf verschiedene T-Zellsubtypen.....	44
Abbildung 9 – Inhibition der HDAC-Aktivität durch Valproat und Valerat in CD4 ⁺ T-Zellen	46
Abbildung 10 – Behandlung mit Valproat führt <i>in vitro</i> zu einer Reduktion von Foxp3 ⁺ T _{regs}	47
Abbildung 11 – Behandlung mit Valproat führt zu einer Induktion von IFN-γ in T _{regs}	49
Abbildung 12 – Behandlung mit Valproat führt zu einer Induktion der IFN-γ Produktion in T _H 1-Zellen	50
Abbildung 13 – Valproat induziert IFN-γ und supprimiert zellspezifische Zytokine in T _H 17-Zellen	52
Abbildung 14 – Inhibition der HDAC-Aktivität durch Valproat und Valerat in CD8 ⁺ T-Zellen	54
Abbildung 15 – Behandlung mit Valproat führt zu einer Induktion von IFN-γ in CTLs..	56
Abbildung 16 – Valproat verstärkt die zytotoxischen Fähigkeiten von CTL	57
Abbildung 17 – Valproat induziert IFN-γ und supprimiert zellspezifische Zytokine in T _C 17-Zellen	58

1.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Geräte	26
Tabelle 2 – Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 3 – Chemikalien und Reagenzien	27
Tabelle 4 – Puffer und Medien.....	29
Tabelle 5 – MACS-Antikörper	30

Tabelle 6 – Zellkultur-Antikörper	30
Tabelle 7 – Durchflusszytometrie-Antikörper	31
Tabelle 8 – Zytokine.....	31
Tabelle 9 – Mausstämme.....	32
Tabelle 10 – Software	32
Tabelle 11 – Bestandteile der T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung	36
Tabelle 12 – Bestandteile der T-Zell-Restimulation	37

1.3 Abkürzungsverzeichnis

α	Anti-	ELISA	<i>Enzyme-linked</i>
AK	Antikörper		<i>immunosorbent assay</i>
AMC	7-Amino-4- methylcoumarin	Eomes	Eomesodermin
AP	Alkaline Phosphatase	FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
APC	Allophycocyanin	FCS	<i>Fetal calf serum</i>
APC	Antigen präsentierte Zelle	FITC	Fluorescein Isothiocyanat
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>	Foxp3	<i>Forkhead box Protein 3</i>
BSS	<i>Balanced salt solution</i>	FSC	<i>Forward scatter</i>
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>	g	Gramm
CD	<i>Cluster of differentiation</i>	GABA	Gammaamino- buttersäure
DC	Dendritische Zelle	GATA3	<i>Gata binding Protein 3</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	h	Stunde
DNMT	DNA-Methyltransferase	HAT	Histonacetyltransferase
CTL	Zytotoxischer T- Lymphozyt	HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte- associated Protein-4</i>	HDAC	Histondeacetylase
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	HEPES	Hydroxyethyl-Piperazin- Ethansulfonsäure
EDTA	Ethylendiamin- tetraessigsäure	HP	Heterochromatin-Protein
		HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
		IBD	<i>Inflammatory bowel disease</i>
		IFN-γ	Interferon gamma

Ig	Immunglobulin	rm	Rekombinant murin
IL	Interleukin	RORγt	<i>Retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor γ</i>
i.p.	intraperitoneal		
IRF4	Interferon-Regulations-Faktor 4	Rpm	<i>Revolutions per minute</i>
MACS	<i>Magnetic-activated cell separation</i>	RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>	RT	Raumtemperatur
μ	Mikro-	SCFA	<i>Short chain fatty acid</i>
mM	Millimolar	SD	Standardabweichung
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>	SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
MS	Multiple Sklerose	SSC	<i>Side scatter</i>
n	Nano-	STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
NEAS	Nicht-essentielle Aminosäuren	T_{fh}	Follikuläre T-Zelle
NK	Natürliche Killerzelle	T-bet	<i>T-box transcription factor TBX21</i>
OVA	Ovalbumin	TGF-β	<i>Transforming growth factor-beta</i>
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>	TILs	Tumor infiltrierende Lymphozyten
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung	TLR	<i>Toll like</i> Rezeptoren
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>	TMB	Tetramethylbenzidin
PE	Phycoerythrin	TME	<i>Tumor microenvironment</i>
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex	TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat	T_{reg}	Regulatorische T-Zelle
PNPP	p-Nitrophenylphosphat	TCR	T-Zell-Rezeptor
PS	Phosphatidylserin	TSA	Trichostatin A
PRR	<i>Pattern recognition</i> Rezeptoren	UK	Unbehandelte Kontrolle
RA	Rheumatoide Arthritis	ÜS	Überstand
rh	Rekombinant human	VPS	Valproinsäure
		°C	Grad Celsius

2 Einleitung

2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt Lebewesen vor krankheitsauslösenden Mikroorganismen, schädlichen sowie allergenen Substanzen und entarteten Körperzellen. Essentiell für ein leistungsstarkes Immunsystem ist die Fähigkeit zur Diskriminierung zwischen Fremd und Selbst, sodass bei der Abwehr von Pathogenen die körpereigenen Zellen und kommensalen Mikroorganismen toleriert werden. Ist die Regulation der Immunantwort gestört, können Autoimmunerkrankungen oder Allergien entstehen. Das Immunsystem gliedert sich in die angeborene und die adaptive Immunität (Chaplin, 2010).

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie dar, indem es eine unmittelbare, aber auch unspezifische (antigen-unabhängige) Erregerabwehr vermittelt. Neben mechanischen Abwehrsystemen des Körpers wie der Haut oder den Schleimhäuten und löslichen Molekülen wie Komplementfaktoren, Defensinen, Zytokinen oder Chemokinen spielen im angeborenen Immunsystem hauptsächlich vier Zelllinien eine Rolle. Neben Mastzellen sind dies Monozyten, die in der Peripherie zu phagozytierenden Makrophagen differenzieren, Granulozyten (basophile, eosinophile, neutrophile) sowie dendritische Zellen (DCs), die aufgrund ihrer Fähigkeit zur Antigenpräsentation als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem gelten (Chaplin, 2010). Auch natürliche Killerzellen (NKs) zählen zu dieser Gruppe. Aus lymphatischen Progenitorzellen im Knochenmark entstanden, verfügen sie neben zytotoxischen Fähigkeiten über immunstimulierende Effektorfunktionen und scheinen adaptive Immuneigenschaften zu besitzen (Brillantes & Beaulieu, 2020; Nabekura & Lanier, 2014).

Über die Erkennung von *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) körperfremder Pathogene mittels *pattern-recognition-Rezeptoren* (PRR) wie *Toll-like Rezeptoren* (TLRs), die von verschiedenen Immun- und Nichtimmunzellen exprimiert werden, wird zunächst eine unspezifische Immunantwort durch das angeborene Immunsystem initiiert (Akira et al., 2006). In Folge dessen kommt es zu der Einleitung der adaptiven Immunantwort, die vor allem auf der Funktion von B- und T-Lymphozyten basiert. Beide stammen von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab und vermitteln die hocheffiziente, spezifische (antigen-abhängige)

Bekämpfung von Pathogenen, welche nach einigen Tagen ihr Maximum erreicht. Nicht nur körperfremde Antigene werden durch das menschliche Immunsystem bekämpft, auch entartete Zellen können durch das Zusammenspiel der Immunzellen erkannt und zerstört werden. Auf die genauen Mechanismen wird in Abschnitt 2.7 „Immunonkologie“ näher eingegangen.

2.2 T-Lymphozyten

Im Gegensatz zu den evolutionär konservierten Genmustern der Zellen des angeborenen Immunsystems, besitzen die Zellen des adaptiven Immunsystems antigenspezifische Rezeptoren, deren große Vielfalt und hohe Spezifität unter anderem auf der somatischen Rekombination der V(D)J-Gensegmente beruht. Je nach Rezeptorexpression werden zwei Zelltypen unterschieden. Während B-Lymphozyten B-Zell-Rezeptoren (membrangebundene Immunglobuline) auf ihrer Oberfläche tragen, exprimieren T-Lymphozyten T-Zell-Rezeptoren (TCRs). B-Zellen reifen im Knochenmark und vermitteln die humorale Komponente des adaptiven Immunsystems, indem sie Antikörper bilden (Chaplin, 2010).

T-Zellen hingegen bilden den zellvermittelten Part der Immunabwehr und reifen mittels positiver und negativer Selektion im Thymus. Nur diejenigen T-Zellen überleben, deren TCR den *Major Histocompatibility Complex* (MHC) binden (positive Selektion). Dies ist essentiell, da eine T-Zelle nicht in der Lage ist, einen Viruspartikel oder eine Bakterienzelle direkt zu erkennen, sondern auf eine Präsentation von in den MHC eingelagerten Antigenfragmenten auf der Zelloberfläche angewiesen ist. Dabei dürfen sie jedoch keine Selbstantigene erkennen und binden (negative Selektion). Abhängig von dem jeweiligen *Cluster of differentiation* (CD) auf der Zelloberfläche, werden T-Zellen in CD4⁺ und CD8⁺ Zellen eingeteilt, welche wiederum in weitere Subklassen gegliedert werden (Kondo et al., 2019; Marshall et al., 2018).

T-Zellen verlassen als naive Zellen den Thymus und migrieren mit dem Blutstrom in die Peripherie. Trifft ein naiver T-Lymphozyt in einem sekundär lymphatischen Organ, wie beispielsweise einem Lymphknoten, auf eine Zelle, die mit ihrem MHC-I oder -II-Molekül das für den TCR des T-Lymphozyten spezifische Peptidfragment präsentiert, wird dieser aktiviert. Neben der Bildung des TCR-CD3-Komplexes mit dem MHC-Peptid-Komplex, werden weitere Aktivierungssignale benötigt, unter anderem durch CD28 mit B7 (CD80) (Nurieva et al., 2009). CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten können nur endogene Peptide erkennen, welche durch MHC-I Moleküle präsentiert werden

(Erkennung Peptide intrazellulärer Erreger bzw. atypischer „Neoantigene“ entarteter Zellen). MHC-I Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert. CD4⁺ T-Zellen hingegen interagieren mit MHC-II Molekülen, die von professionellen Antigen präsentierenden Zellen (APCs; zB. DCs, Makrophagen oder B-Lymphozyten) exprimiert werden (Erkennung extrazellulärer Peptide, die phagozytiert wurden) (Marshall et al., 2018).

Aktivierete Lymphozyten unterliegen einer massiven klonalen Proliferation und differenzieren sich abhängig von dem umgebenden Zytokinmilieu, wodurch Effektor-T-Zellen und Gedächtniszellen mit derselben Antigenpezifität entstehen. Die Effektor-T-Zellen migrieren über den peripheren Blutstrom hin zu dem Ort der Infektion und vermitteln dort die Immunreaktion. Nach Elimination der Pathogene kehrt das Immunsystem wieder in sein Ausgangsstadium zurück, und ist dann für die Abwehr einer neuen Angriffswelle bereit (Chaplin, 2010). Dabei hilft die Entwicklung eines langlebigen, immunologischen Gedächtnisses, welches bei erneuter Konfrontation mit einem schon einmal bekämpften Pathogen zu einer schnelleren spezifischen Abwehr beiträgt (Ratajczak et al., 2018).

2.2.1 CD4⁺ T-Lymphozyten

CD4⁺ T-Helfer-Zellen bilden einen der Grundpfeiler des adaptiven Immunsystems. Sie beeinflussen und koordinieren die Immunantwort mithilfe von Zytokinen und Chemokinen. Dies führt zu einer Vielzahl an Effekten, welche von der Anregung der Antikörperproduktion von B-Zellen, der Rekrutierung von Granulozyten zu Entzündungsherden und der Regulierung von Makrophagen bis hin zu der Stimulation zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) reichen (Chaplin, 2010).

Voraussetzung hierfür ist die Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen in verschiedene Subpopulationen. Abhängig von Umweltfaktoren wie dem umgebenden Zytokinmilieu, der Antigenstärke und kostimulatorischen Molekülen werden nach der Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen subtypenspezifische Genexpressionprogramme induziert, die das Schicksal der Zelle bestimmen (Abb. 1). Nach heutigem Kenntnisstand zählen zu diesen Subtypen T-Helfer-1-Zellen (T_H1-Zellen), T-Helfer-2-Zellen (T_H2-Zellen), T-Helfer-9-Zellen (T_H9-Zellen), T-Helfer-17-Zellen (T_H17-Zellen), T-Helfer-22-Zellen (T_H22-Zellen), folliculäre T-Helfer Zellen (T_{fh}), sowie regulatorische T-Zellen (T_{regs}) (O'Shea and Paul, 2010).

Von Makrophagen oder NKs produziertes Interleukin 12 (IL-12) induziert die Expression des Transkriptionsfaktors *T-box* *TBX21* (T-bet) und somit die Differenzierung zu T_H1-Zellen. Durch die Sekretion von Interferon γ (IFN- γ) und Interleukin 2 (IL-2) vermitteln T_H1-Zellen die Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene, indem sie wiederum Makrophagen und auch CTLs stimulieren (positives Feedback). IFN- γ weist immunstimulatorische, antivirale sowie antitumorale Eigenschaften auf. Die antivirale Wirkung wird unter anderem durch die Vermehrung der TLR Expression auf Immunzellen, die Aktivierung von Makrophagen zu vermehrter Phagozytose sowie durch die Hochregulation der MHC-I und -II abhängigen Antigenpräsentation vermittelt (Kak et al., 2018; Ling Ni & Lu, 2018).

T_H2-Zellen dienen der Bekämpfung extrazellulärer Erreger sowie Helminthen. Sie produzieren u.a. die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, welche den IgE und IgA Isotypenswitch bei B-Zellen vermitteln und Eosinophile, Mastzellen und Basophile rekrutieren (Mosmann, T.R. et al., 1986; Murphy et al., 2012; J. Zhu & Paul, 2008). Auch die durch IL-9 Produktion charakterisierten T_H9-Zellen sind in die Immunantwort gegen Parasiten involviert (Kaplan, 2013).

Die Abwehr gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze wird durch T_H17-Zellen über deren Produktion von IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22 koordiniert. T_H17-Zellen entstehen über die Induktion des Transkriptionsfaktors *Retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor γ* (ROR γ t) vornehmlich durch *Transforming growth factor β* (TGF- β) und IL-6 (Korn et al., 2009).

T_{regs}, die entweder im Thymus (natürliche „n“T_{regs}) oder aus naiven T Zellen in der Peripherie (induzierbare „i“T_{regs} bzw. periphere „p“T_{regs}) entstehen, spielen eine entscheidende Rolle in der Erhaltung der Selbsttoleranz und der Regulierung von Immunantworten. T_{regs} sind charakterisiert durch die Expression der Oberflächenantigene CD4 und CD25 sowie des Transkriptionsfaktors *forkhead box Protein P3* (Foxp3), wobei auch eine Entwicklung von T_{regs} aus CD25⁻ T_{regs} beschrieben wurde (Schuster et al., 2019). Durch verschiedene Mechanismen sind sie in der Lage, überschießende Immunreaktionen zu unterdrücken und vor Autoimmunität zu schützen. Zum einen ist dabei die Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10, TGF- β und IL-35 von Bedeutung, zum anderen zellkontaktabhängige Prozesse wie die Expression von CTLA-4, welches die Hemmung von T-Zell-Aktivierung vermittelt (Noack & Miossec, 2014).

T_H22-Zellen akkumulieren in der Epidermis von Patienten mit inflammatorischen Hauterkrankungen und sind durch die Produktion von IL-22 charakterisiert (Eyerich et al., 2009). T_{fh}-Zellen interagieren unabhängig von der Art eines Pathogens mit naiven B-Zellen und unterstützen die B-Zell-Reaktionen in den Keimzentren von Lymphfollikeln, woraus die Bildung von hochaffinen Antikörpern resultiert (Crotty, 2014).

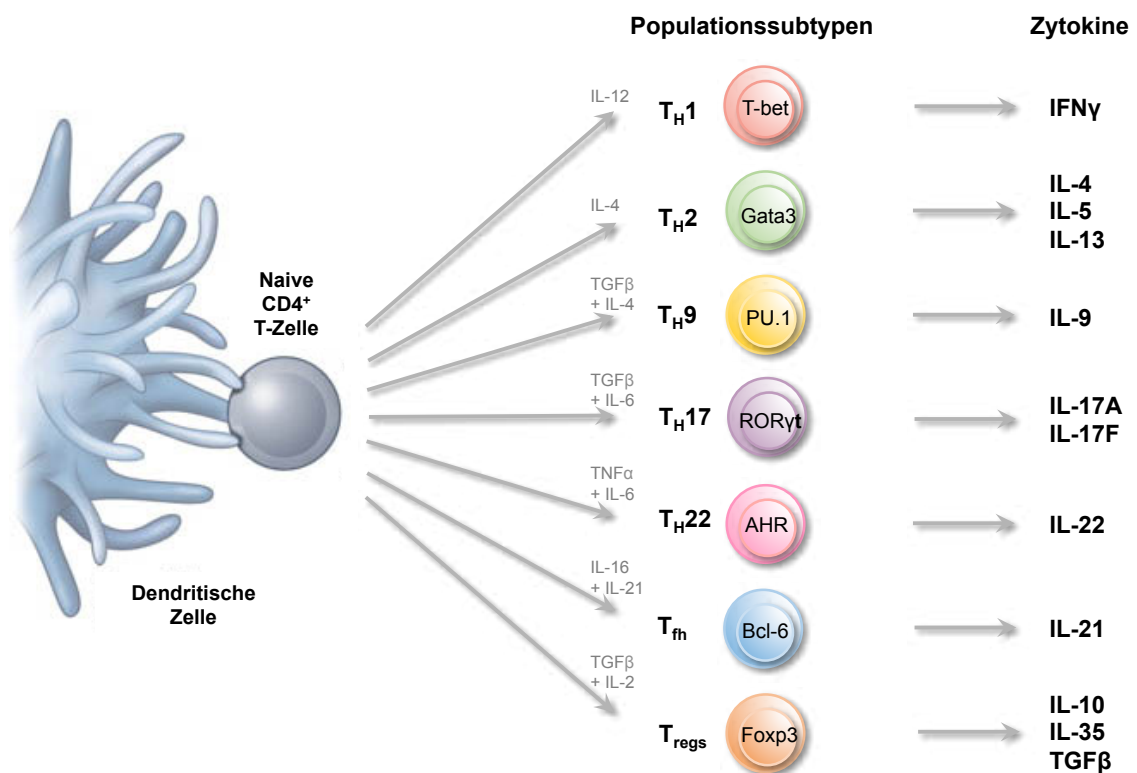


Abbildung 1 – Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen

Erkennt der TCR einer naiven CD4⁺ T-Zelle sein spezifisches Antigen, welches über MHC Klasse II Moleküle von einer APC präsentiert wird, führt dies zu der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung in verschiedene T-Helfer-Zell-Subtypen - abhängig von dem umgebenden Zytokinmilieu. Diese Subtypen umfassen die Linien T_H1, T_H2, T_H9, T_H17, T_H22, T_{fh} sowie T_{regs} (modifiziert nach O’Shea & Paul, 2010).

Eine Dysregulation und Dysbalance der CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen kann zu der Entstehung von Krankheiten im menschlichen Körper beitragen. Die vornehmlich pro-inflammatorischen T_H1- und T_H17-Zellen können in diesem Fall zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und Entzündungszuständen maßgeblich beitragen (Dardalhon et al., 2008; Noack & Miossec, 2014). So wurde gezeigt, dass T_H1-Zellen durch die Sekretion ihres Signaturzytokins IFN- γ eine wichtige Rolle bei Diabetes

mellitus-Typ 1, Multipler Sklerose (MS) und Rheumatoider Arthritis (RA) spielen (Raphael & Forsthuber, 2012; Skurkovich & Skurkovich, 2005). Eine Dysbalance von T_H17 -Zellen wird bei Menschen u.a. mit Erkrankungen wie MS, RA, systemischen Lupus erythemathodes, Psoriasis und entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert (Maddur et al., 2012). Eine Reduktion von Funktion oder Frequenz der anti-inflammatorischen T_{regs} wird ebenfalls mit Autoimmunerkrankungen bei Menschen in Verbindung gebracht, was auch in Mausmodellen nachvollzogen werden konnte (Sakaguchi, 2004). Bei Asthma und anderen allergischen Erkrankungen, die mit einer erhöhten IgE-Produktion einhergehen, spielen T_H2 - und T_H9 -Zellen eine wichtige Rolle (Campos Carrascosa et al., 2017; Martinez et al., 2012; J. Zhu & Paul, 2008).

Neuere Daten legen zudem eine Beteiligung von T_H17 -Zellen und T_{regs} bei verschiedenen Tumorerkrankungen wie Pankreas-, Mamma-, Kolorektalen- und Nicht-kleinzelligen-Bronchialkarzinomen nahe. Dabei werden Mechanismen wie beispielsweise chronische Entzündungen, die durch pathogene T_H17 -Zellen unterhalten werden, aber auch eine reduzierte Tumorummunität durch Hochregulation von T_{regs} in der Tumorumgebung (*Tumor microenvironment*, TME) diskutiert (Knochelmann et al., 2018; C. Li et al., 2020).

2.2.2 CD8⁺ T-Lymphozyten

CD8⁺ T-Lymphozyten stellen einen weiteren wichtigen Zweig des adaptiven Immunsystems dar, indem sie maßgeblich an der Bekämpfung und Elimination von intrazellulären Erregern (insbesondere Viren) und Tumorzellen beteiligt sind (Harari et al., 2006; Kemp & Ronchese, 2001).

Vermittelt wird dies vor allem durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL, T_C1 Zellen). Simultan zu CD4⁺ T-Zellen können CD8⁺ T-Zellen in verschiedene Subtypen differenzieren, abhängig von den Umweltfaktoren, die auf sie einwirken. Zu diesen Subtypen zählen nach heutigem Verständnis T_C2 -, T_C9 -, T_C17 - sowie regulatorische CD8⁺ T-Zellen (CD8⁺ T_{regs}) (Mittrücker et al., 2014).

Kernhaltige Zellen können über MHC Klasse I Moleküle endogene Peptide intrazellulärer Pathogene sowie atypische Peptide entarteter Zellen präsentieren. Diese werden durch die aktivierten Effektor-T-Zellen, die CTL, erkannt. CTL leiten die Apoptose dieser infizierten bzw. entarteten Zellen ein. Die Induktion apoptotischer

Signale durch Caspasen basiert auf der Sekretion zytotoxischer Proteine wie Perforin und Granzym B. Überdies exprimieren CTL membranständige Fas-Liganden, die über die Bindung an Fas auf der Oberfläche der Zielzellen ebenfalls proapoptotisch wirken (Chaplin, 2010). Durch die Sezernierung der Zytokine *Tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α) und IFN- γ wird die zelluläre Immunantwort verstärkt. Die Differenzierung aktivierter CD8⁺ T-Zellen zu CTLs wird durch IL-2 und IL-12 gefördert und auf Transkriptionsebene durch die Induktion u.a. von T-bet vermittelt (Mittrücker et al., 2014).

Das Zytokinprofil von T_C2-Zellen ähnelt stark dem der T_H2-Zellen (IL-4, IL-5, IL-13), wobei zusätzlich zytotoxische Proteine sezerniert werden können. T_C2-Zellen spielen eine Rolle in Allergien und Autoimmunerkrankungen (Mittrücker et al., 2014; Tang et al., 2012). T_C9-Zellen produzieren IFN- γ , IL-9 und IL-10. Neben zytotoxischen Fähigkeiten sind sie u.a. in die Entstehung von Asthma involviert (Y. Lu et al., 2014; Visekruna et al., 2013).

T_C17-Zellen werden anhand der Expression der charakteristischen, proinflammatorischen Zytokine des T_H17 Programms definiert und weisen eine geringere Zytotoxizität als CTL auf (Huber et al., 2009). Determiniert wird die Differenzierung hin zu T_C17 Zellen durch IL-6, IL-21 und TGF- β , welche zu der Induktion der Transkriptionsfaktoren ROR γ t und Interferon-Regulations-Faktor 4 (IRF4) führen (van Duijn et al., 2020).

Huber et al. zeigten die Rolle von T_C17-Zellen in der Pathogenese der *experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis* (EAE), dem Mausmodell von MS (Huber et al., 2013). In weiteren humanen und murinen Studien wurden Hinweise auf eine pathogene Funktion oder zumindest Akkumulation von T_C17-Zellen bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen beschrieben, wozu Diabetes mellitus-Typ 1, Psoriasis(arthritis) und Artherosklerose zählen (Kryczek et al., 2008; Marwaha et al., 2010; Menon et al., 2014; van Duijn et al., 2020). Im Bezug auf potenzielle antivirale Fähigkeiten und den Einfluss auf Tumore liegt eine kontroverse Datenlage vor. Je nach Virus- und Tumorentität konnten T_C17-Zellen zu einer Eindämmung von Infektionen bzw. Tumoren führen oder sie versagten bei der viralen Eradikation und förderten sogar das Tumorwachstum (Mittrücker et al., 2014).

Die anti-inflammatorischen CD8⁺ T_{regs} spielen entsprechend CD4⁺ T_{regs} eine Rolle in der Regulation der Immunantwort. *In vitro* wird durch die Zugabe von TGF- β ihr Transkriptionsfaktor Foxp3 induziert (L. Lu & Cantor, 2008; Tang, X.L. et al., 2005).

2.3 Plastizität der T-Zellsubtypen

Lange wurde das Dogma propagiert, dass die Differenzierung in T-Helfer-Zell-Subtypen irreversibel sei. Neuere Erkenntnisse weisen hingegen auf eine Plastizität der Unterklassen, insbesondere der T_H17 -Zellen und T_{reg} s, als Reaktion auf ein sich veränderndes Milieu hin, was eine dynamische Adaptation an Infektionen durch verschiedene Pathogene ermöglicht (Abb. 2) (Wilson et al., 2009).

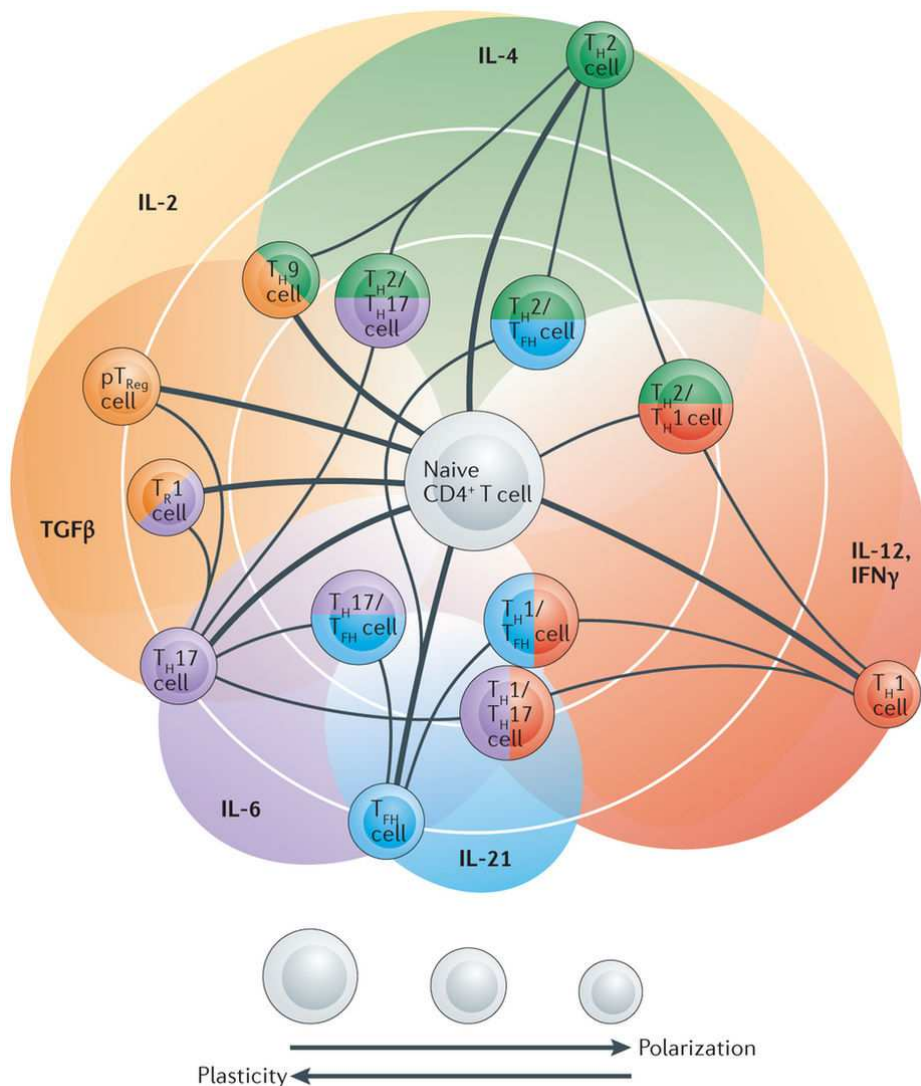


Abbildung 2 – Zytokin-gesteuerte Plastizität der $CD4^+$ T-Zellsubtypen

IL-4, IFN- γ , IL-12, IL-21, IL-6, TGF- β und IL-2 - alleine oder in Kombination - polarisieren naive $CD4^+$ T-Zellen in verschiedene Subtypen. Basierend auf dem umgebenden Zytokinmilieu ändert sich die Polarisierung der T-Zellen. Die Polarisierung und die damit einhergehende spezifischere Zellfunktion wird anhand der Distanz von der zentralen naiven T-Zelle und der abnehmenden Zellgröße skizziert (DuPage & Bluestone, 2016). Nutzungsrechte erteilt durch das Copyright Clearance Center®.

Als zugrundeliegende molekulare Mechanismen werden unter anderem epigenetische Modifikationen, wie DNA Methylierungen oder posttranslationale Histonmodifikationen, sowohl an den transkriptionellen Regulator-Genorten, beispielsweise T-bet oder Gata3, als auch an den Zytokingenen, angesehen (Wilson et al., 2009; Zhou et al., 2009). Besonders im T_H17 Programm scheint eine erhebliche Plastizität zu bestehen. Unter bestimmten Zytokineinflüssen (zusätzlich IL-12 oder IL-4) können T_H17 -Zellen von Effektoren, die hauptsächlich IL-17A und IL-17F produzieren, zu IFN- γ oder IL-4 sezernierenden Effektoren (T_H1 - oder T_H2 -like) transformieren (Boniface et al., 2010). Die sogenannten „Ex- T_H17 “, T_H1 -like Zellen unterscheiden sich anhand ihrer Oberflächenmoleküle und ihrer Zytokinsekretion von klassischen T_H1 -Zellen und scheinen zu einer Verstärkung von Autoimmunität aber auch von Antitumorimmunität beizutragen. Die Proliferation der „Ex- T_H17 “ Zellen kann im Gegensatz zu derer von klassischen T_H1 - und T_H2 -Zellen nicht durch T_{regs} gehemmt werden (Knochelmann et al., 2018). T_{regs} scheinen eine ähnlich hohe Flexibilität aufzuweisen, zum einen hin zu T_H17 -ähnlichen Zellen, was aufgrund der gemeinsamen Erfordernis von TGF- β für die Differenzierung naheliegend ist, zum anderen ist auch hier eine Plastizität hin zu IFN- γ produzierenden, T_H1 -ähnlichen Zellen beschrieben. T_H1 - und T_H2 -Zellen hingegen präsentieren stabilere Phänotypen (Lee et al., 2009).

Ähnlich wie bei $CD4^+$ Zellen wird heute angenommen, dass auch $CD8^+$ T-Zellen einer gewissen Plastizität abhängig von dem umgebenden Zytokinmilieu unterliegen (Arens & Schoenberger, 2010). T_C17 -Zellen wird, analog zu T_H17 -Zellen, eine besonders hohe Flexibilität vor allem zu IFN- γ produzierenden, CTL-ähnlichen Zellen zugeschrieben (Bowers et al., 2015; Yen et al., 2009).

2.4 Histondeacetylase-Inhibitoren und ihr klinischer Einsatz

2.4.1 Physiologische Grundlagen von Histondeacetylasen

Histondeacetylasen (HDACs) sind entscheidend in die epigenetische Regulation von Genen involviert, indem sie den Chromatinstatus der DNA verändern (Haberland et al., 2009). Histone sind Proteine im Zellkern, die als Histonoktamer von der DNA Doppelhelix umwunden werden und diese so als Nukleosomen organisieren. HDACs sind Enzyme, die in der Lage sind, acetylierte Lysinreste an N-terminalen Histonenden dynamisch zu deacetylieren. Durch die positive Ladung des deacetylierten Lysinrestes wird die Bindungsaffinität der Histone zu der negativ geladenen DNA erhöht. Das

entstehende inaktive Heterochromatin ist nicht mehr für Transkriptionsfaktoren oder andere regulatorische Moleküle zugänglich, was im Allgemeinen eine verringerte DNA-Transkription (*gene silencing*) zur Folge hat (Abb. 3). Es gibt jedoch Hinweise, dass eine Deacetylierung auch als Transkriptionsaktivierungssignal für einige Gene erforderlich sein kann. Darüber hinaus können für diverse Zellfunktionen wichtige Proteine wie STAT3, HSP90 oder Transkriptionsfaktoren (beispielsweise p53, c-Myc, Foxp3 oder GATA) einer direkten Deacetylierung durch HDACs unterliegen (Non-Histon-Effekt). Dies verdeutlicht die Komplexität des Zusammenspiels epigenetischer Modifikationen (Akimova et al., 2012; Haberland et al., 2009).

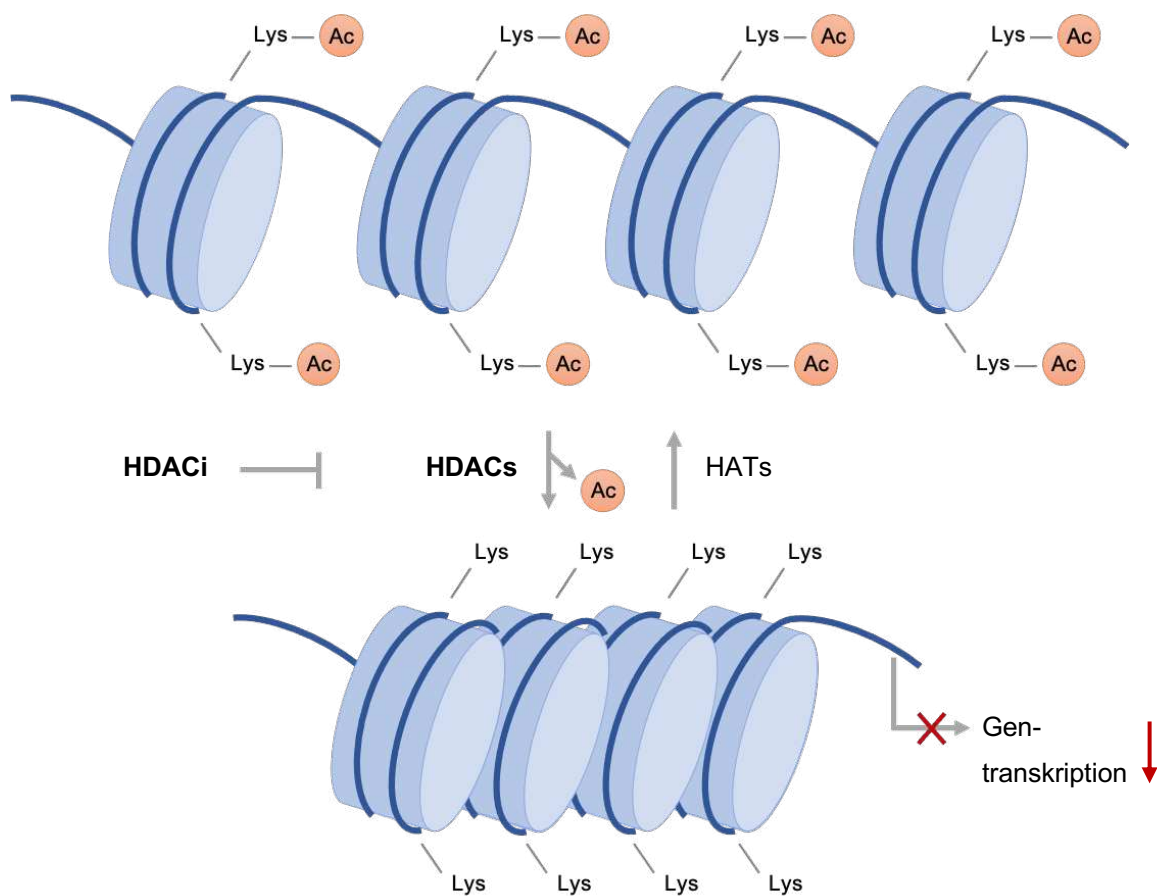


Abbildung 3 – Wirkweise von HDACs und HDAC-Inhibitoren

Die Acetylierung (Ac) von Lysinresten (Lys) an Histonen durch Histonacetylasen (HATs) führt zu einer Relaxation der Chromatinstruktur, welche den Zugang von Transkriptionsfaktoren zu ihren Zielgenen erleichtert. Umgekehrt ermöglicht die Histondeacetylierung durch HDACs im Allgemeinen die transkriptionelle Repression, indem sie zu einer Kompaktierung des Chromatins führt. HDAC-Inhibitoren (HDACi) wiederum hemmen diese Deacetylierung, was eine erhöhte Transkription bestimmter Gene zur Folge hat.

2.4.2 HDAC-Inhibition als epigenetische Tumorthherapie

Lange galten Schäden in der DNA etwa in den Genloci von Tumorsuppressoren (hier: *loss of function*) oder Protoonkogenen (hier: *gain of function*) als alleinige Ursache für die Entstehung von Tumoren. Forschungserkenntnisse der vergangenen Jahre weisen jedoch darauf hin, dass auch epigenetische Veränderungen tiefgreifend in die Karzinogenese involviert sind. Ein Beispiel dafür ist die Veränderung des Acetylierungs- und Methylierungsstatus von Genorten, welche die Differenzierung, Proliferation, Zellzyklus-Progression oder Apoptose von Zellen (Dysregulation = „*Hallmarks of Cancer*“) modulieren. Häufig sind dies Genloci von Tumorsuppressor- und DNA-Reparatur-Genen (Dawson & Kouzarides, 2012; Yoo & Jones, 2006).

Im Gegensatz zu genetischen Veränderungen sind epigenetische Aberrationen veränderbar. So bietet der Einsatz von HDAC-Inhibitoren einen neuen, vielversprechenden Ansatz für Tumorthapien (Falkenberg & Johnstone, 2014).

HDAC-Inhibitoren differieren in ihrer chemischen Struktur (Hydroxamate, kurzkettige Fettsäuren, Benzamide, zyklische Peptide). Es werden Pan-HDAC-Inhibitoren wie Trichostatin A (TSA) von solchen HDAC-Inhibitoren abgegrenzt, die spezifisch nur einzelne HDAC-Isoformen hemmen. Beschrieben sind 18 HDAC-Isoformen, die in die vier HDAC-Hauptvertreterklassen I, II (a und b), III und IV eingeteilt sind. Diese unterscheiden sich in ihrer subzellulären Lokalisation, Gewebeverteilung und katalytischen Aktivität (Akimova et al., 2012; Bantscheff et al., 2011; Weichert, 2009).

Klinische und experimentelle Studien belegen, dass die therapeutische Inhibition von HDACs antineoplastische Effekte aufweisen kann, die durch die Induktion von Zellzyklusarrest, Differenzierung, Seneszenz, Apoptose und Tumormunität vermittelt werden. Wenn die HDAC-Inhibition in Kombination mit anderen Chemo-/ oder Immuntherapeutika eingesetzt wird, führt dies häufig zu einer noch stärkeren, synergistischen Wirkung (Falkenberg & Johnstone, 2014). Dabei wurde unter anderem beobachtet, dass normale Zellen weniger als Tumorzellen durch HDAC-Inhibition beeinflusst werden, was das relativ günstige Nebenwirkungsprofil im Gegensatz zu klassischen Chemotherapeutika begründet. Dawson und Kouzarides (2012) erklärten dies durch eine vielschichtige und semiredundante epigenetische Regulation bei normalen Zellen während der Homöostase. Im Laufe der Forschungsbemühungen kristallisierten sich jedoch auch Limitationen einer Tumorthapie mit HDAC-Inhibitoren heraus. Solide Tumorentitäten beispielweise präsentierten im Gegensatz zu

hämatoonkologischen Erkrankungen ein geringeres bis gar kein Ansprechen auf eine Monotherapie mit HDAC-Inhibitoren (Hull et al., 2016). Zudem scheint ein intaktes Immunsystem für die antineoplastische Wirkung essentiell zu sein, was die Anwendbarkeit bei immunsupprimierten Patienten einschränken könnte (West et al., 2013).

2.4.3 Einfluss von Histondeacetylasen auf T-Zell-Immunantworten

Nicht nur Tumorzellen, sondern auch Zellen des Immunsystems werden durch epigenetische Modifikationen wie der Histondeacetylierung beeinflusst und sind somit ebenfalls durch HDAC-Inhibitoren modulierbar. Wie bereits beschrieben, gelten diese Veränderungen als eine der Grundlagen für die Differenzierung zu Effektorzellen und für die Plastizität der T-Zellen untereinander (Avni et al., 2002; Wilson et al., 2009). Demnach führte der Einsatz von HDAC-Inhibitoren zu einer Modifikation von Aktivierung, Differenzierung und Zytokinexpression muriner und humaner CD4⁺ T-Zellen *in vitro* (Ellmeier & Seiser, 2018). Auch auf die Dysregulation von T-Zell-Antworten bei verschiedenen (Auto)immun- und Tumorerkrankungen wurde bereits eingegangen. Eine solche T-Zell-Dysregulation kann ebenfalls mit der Änderung des Acetylierungsstatus von Histonen und Nicht-Histon-Proteinen assoziiert sein. Entsprechend konnte die Arbeitsgruppe um Göschl zeigen, dass Mäuse mit einer T-Zell-spezifischen Deletion von HDAC1 vollständig gegen EAE resistent waren. Zudem wurde beschrieben, dass HDAC1 defiziente T_H1-Zellen eine erhöhte IFN- γ Expression entwickelten (Ellmeier & Seiser, 2018; Göschl et al., 2018). Auch der Einfluss von HDACs auf T_{regs} wurde in mehreren Studien untersucht. Dabei ließ sich anhand von Maus-Knock-Out Modellen eruieren, dass der Verlust bestimmter HDAC Subgruppen (HDAC 6,9,11 und Sirtuin-1 (SIRT1)) zu einer vermehrten Acetylierung von Foxp3 mit folglich erhöhter Proteinexpression führte (erhöhte suppressive Aktivität von T_{regs}), während der Verlust anderer (HDAC 3,5 und SIRT3) mit einer beeinträchtigten Aktivität und Differenzierung von T_{regs} assoziiert war. Ein Verlust von SIRT1, welches in T_H17-Zellen stark exprimiert wird, verursachte *in vitro* eine Deacetylierung von ROR γ t, was eine verminderte T_H17 Differenzierung zur Folge hatte (Ellmeier & Seiser, 2018).

In Folge dieser Erkenntnisse wurde der Einsatz von HDAC-Inhibitoren auch bei Autoimmunerkrankungen (z.B. bei experimenteller Kolitis, (Glauben et al., 2014)), sowie bei chronisch entzündlichen und viralen Erkrankungen geprüft und wird aktuell in mehreren Studien unterschiedlicher Phasen getestet. Die bisherigen Ergebnisse

bestätigten die Annahme, dass HDAC-Inhibitoren eine Eindämmung von Entzündung vermitteln können, wobei diese Fähigkeit von der Spezifität des Inhibitor-Typs, dem Zelltyp, dem Kontext und der Dosierung abhängig war (Falkenberg & Johnstone, 2014; Hull et al., 2016).

2.4.4 Klinischer Einsatz von HDAC-Inhibitoren

Seit 2015 ist in Deutschland der pan-HDAC-Inhibitor Panobinostat für die Kombinationstherapie bei erwachsenen Patienten mit rezidiviertem und/oder refraktärem Multiplen Myelom zugelassen (European Medicines Agency, 2015). In den USA sind zusätzlich Vorinostat (*Suberoylanilide Hydroxamic Acid* (SAHA)), Romidepsin und Belinostat für die Behandlung von kutanen T-Zell-Lymphomen bzw. peripheren T-Zell-Lymphomen genehmigt (Falkenberg & Johnstone, 2014). Weitere HDAC-Inhibitoren sind Gegenstände mehrerer klinischer sowie präklinischer Studien in unterschiedlichen Phasen (Schnekenburger et al., 2019). Neben der synthetischen Herstellung von HDAC-Inhibitoren erfolgte die Isolierung einiger Substanzen aus natürlichen Quellen, so beispielsweise die des Pan-HDAC-Inhibitors TSA aus dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* (Tsuji et al., 1976). Ebenso natürlich vorkommend sind die als HDAC-Inhibitoren wirkenden kurzkettigen Fettsäuren, die im Folgenden beschrieben werden sollen.

2.5 Kurzkettige Fettsäuren (SCFAs) als Modulatoren des Immunsystems

Komplexe Kohlenhydrate wie resistente Stärke oder Ballaststoffe können von Menschen nicht enzymatisch abgebaut werden, sodass diese als unverdaute Nahrungsbestandteile in das Kolon gelangen. Dort entstehen daraus mittels anaerober Fermentation durch Mikroorganismen neben Gasen kurzkettige Fettsäuren (*short chain fatty acids*, SCFAs) (Tan et al., 2014).

Das intestinale Mikrobiom, welches ein immenses Repertoire an verschiedensten Mikroorganismen umfasst, ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Gesundheit in Organismen. Es beeinflusst nicht nur lokal die Darmhomöostase, sondern verschiedenste Systeme des Körpers wie Gehirn, Lunge, Herz, Gefäße und Immunsystem sowie viele weitere (Roy & Trinchieri, 2017). Ist das Gleichgewicht des Mikrobioms gestört, können daraus verschiedenste Erkrankungen resultieren, beispielsweise entzündliche Darmerkrankungen (*inflammatory bowel disease*, IBD) (Greer & O'Keefe, 2011), Tumore, Allergien und Autoimmunität sowie Adipositas und Diabetes mellitus (Buret, 2016; Greer & O'Keefe, 2011; Holmes et al., 2011; Puddu et al., 2014). Eine ballaststoffreiche Ernährung erhöht den Gehalt an SCFAs im Darm, was Mäuse vor allergischen und Autoimmunerkrankungen schützen kann (Mariño et al., 2017; Tan et al., 2016; Trompette et al., 2014).

In den letzten Jahrzehnten sind die Hauptmetabolite der kommensalen Bakteriengemeinschaft, die SCFAs, aufgrund dieser Erkenntnisse und aufgrund der Entdeckung ihrer HDAC-inhibitorischen Fähigkeiten in den Fokus der Forschung gerückt. SCFAs sind definitionsgemäß gesättigte Fettsäuren mit weniger als sechs Kohlenstoffatomen. Sie umfassen Formiat, Acetat, Propionat, Butyrat, Valerat und die Isoformen Isobutyrat und Isovalerat (Abb. 4).



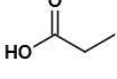
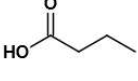
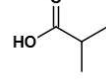
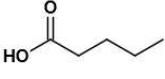
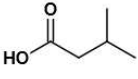
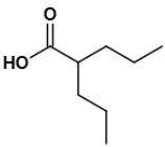
Strukturformel	Trivialname	Chemische Bezeichnung	Summenformel	Salz
	Ameisensäure	Methansäure	CH ₂ O ₂	Formiat
	Essigsäure	Ethansäure	C ₂ H ₄ O ₂	Acetat
	Propionsäure	Propansäure	C ₃ H ₆ O ₂	Propionat
	Buttersäure	Butansäure	C ₄ H ₈ O ₂	Butyrat
	Isobuttersäure	2-Methylpropansäure	C ₄ H ₈ O ₂	Isobutyrat
	Valeriansäure	Pentansäure	C ₅ H ₁₀ O ₂	Valerat
	Isovaleriansäure	3-Methylbutansäure	C ₅ H ₁₀ O ₂	Isovalerat
	Valproinsäure	2-Propylpentansäure	C ₈ H ₁₆ O ₂	Valproat

Abbildung 4 – Kurzkettige Fettsäuren (SCFAs)

Strukturformeln, Trivialnamen, chemische Bezeichnungen, Summenformeln und Salznamen aller SCFAs inklusive der verzweigten kurzkettigen Fettsäure Valproinsäure, die ein Derivat der Valeriansäure darstellt. Zu Vereinfachungszwecken wurden in dieser Arbeit ausschließlich die Salznamen verwendet.

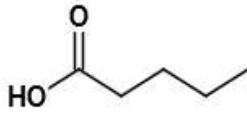
Unsere Forschungsgruppe untersuchte unter anderem den Einfluss bestimmter SCFAs, vornehmlich von Propionat (C3), Butyrat (C4), und Valerat (C5), auf Inflammation (in Kolitis- und EAE-Modellen) und Karzinogenese (bspw. in murinen Pankreaskrebs- und Melanommodellen). Dabei wurde deutlich, dass Butyrat und Valerat einen starken immunmodulatorischen Einfluss über HDAC-Inhibition und verschiedene metabolische Wege, z.B. durch mTOR-Induktion und Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (SCFA-Rezeptoren FFAR2 (GPR43)), aufweisen.

Dies offenbarte nicht nur Potenzial für einen Einsatz bei verschiedenen Autoimmun- und inflammatorischen Erkrankungen, sondern auch für einen Einsatz als Tumorthapeutikum, beispielsweise im Rahmen eines adoptiven Zell-Transfers mit gentechnisch veränderten T-Zellen mit synthetischen antigenspezifischen Rezeptoren (*chimeric antigen receptor* (CAR)-T-Zell-Therapie) (Luu et al., 2017, 2018, 2019). Dies führte uns zu der Frage, ob auch das strukturell verwandte, im klinischen Alltag vor allem als Antiepileptikum eingesetzte Valproat ähnlich immunmodulierend wirkt. Im Folgenden soll näher auf Valproat und insbesondere auf den aktuellen Forschungsstand zu dem Einfluss von SCFAs und Valproat auf verschiedene Zellen des adaptiven Immunsystems eingegangen werden.

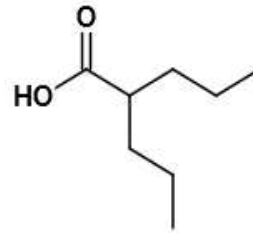
2.6 Valproinsäure als Antiepileptikum und potenzielles Tumorthapeutikum

Die Arbeitsgruppen um Göttlicher (2001) und Phiel (2001) beschrieben erstmalig bei einer weiteren kurzkettigen Fettsäure, der Valproinsäure, Histondeacetylase-inhibitorische Fähigkeiten. Dies ist besonders interessant, da Valproinsäure beziehungsweise ihr Salz Valproat seit Jahrzehnten weltweit als Antikonvulsivum Einsatz findet (Chateauvieux et al., 2010).

Valproinsäure (VPS, 2-Propylpentansäure) wurde 1882 erstmalig als Derivat der natürlich in geringen Mengen im menschlichen Darm vorkommenden, kurzkettigen Fettsäure Valeriansäure (Salz: Valerat) synthetisiert (Burton BS, 1882) (Abb. 4 und 5). Bei Raumtemperatur liegt sie als klare Flüssigkeit vor. Valproat wurde lange Zeit als Lösungsmittel für organische Substanzen verwendet (Chateauvieux et al., 2010). Erst nahezu ein Jahrhundert später entdeckte die Forschungsgruppe um Eymard (1963) durch Zufall während Studien über die antikonvulsive Aktivität anderer Substanzen, dass das Lösungsmittel Valproat selbst potent Anfälle kupieren konnte.



A Valeriansäure



B Valproinsäure

Abbildung 5 – Vergleich der chemischen Struktur von Valeriansäure und Valproinsäure

Die natürlich im humanen und murinen Darm und in der Wurzel des europäischen Baldrians vorkommende SCFA Valeriansäure (A) stellt das chemische Grundgerüst – eine gesättigte unverzweigte C5 Fettsäure – der synthetisch hergestellten Valproinsäure dar. An das C2 Atom ist hier zusätzlich eine Propylgruppe gebunden (B).

2.6.1 Wirkweise als Antiepileptikum

Das Salz der Valproinsäure, Valproat, wird als Mittel der ersten Wahl bei tonisch-klonischen Grand-Mal-Anfällen und Absencen, sowie bei weiteren epileptischen Konditionen als Alternativmedikation angewendet. In Deutschland ist es das am häufigsten verschriebene Antikonvulsivum (Hamer et al., 2012). Zudem wird Valproat auch bei nicht-epileptischen Erkrankungen eingesetzt, beispielsweise als Stimmungsstabilisator in der manischen Phase bipolarer Störungen. In einigen EU Mitgliedstaaten umfasst die Zulassung überdies die Migräneprophylaxe (European Medicines Agency, 2018).

Das antiepileptische Potenzial von Valproinsäure wird unter anderem über eine Aktivitätserhöhung des inhibitorischen Neurotransmitters Gammaaminobuttersäure (GABA) im Gehirn vermittelt. Dieser Effekt wird über verschiedene Mechanismen wie der Hemmung der GABA-Degeneration, der Erhöhung der GABA-Synthese und der Reduktion des GABA-Umsatzes koordiniert (Mesdjian et al., 1982). Des Weiteren hemmt Valproinsäure die N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-gesteuerte Exzitation im Gehirn (Gean, P.W. et al., 1994; Zeise, M.L. et al., 1991) und blockiert Na^+ -, Ca^{2+} - sowie spannungsabhängige K^+ -Kanäle (Chateauvieux et al., 2010; VanDongen et al., 1986).

2.6.2 Wirkweise als potenzielles Tumorthapeutikum

Im Zuge der genaueren Charakterisierung Valproats wurden in den letzten Jahrzehnten weitere Wirkweisen bis auf die molekulare Ebene hin entschlüsselt. Dazu zählen die Beeinflussung von Tumorzellen verschiedener Entitäten durch Induktion von Apoptose und Differenzierung, einer Erhöhung der Tumorummunogenität sowie der Hemmung von Angiogenese, Zellproliferation und dem Potenzial zur Metastasierung (Blaheta et al., 2005; Kostrouchova et al., 2007; Michaelis et al., 2004). Valproat scheint zudem über weitere Mechanismen abgesehen von der HDAC-Inhibition ein *Chromatin-Remodeling* zu induzieren. Die Arbeitsgruppe um Marchion (2005) propagierte eine Chromatindekondensation durch Valproat-induzierte Repression bestimmter Chromatin-assoziiierter Erhaltungsproteine wie DNA-Methyltransferasen (DNMTs). Eine DNMT bedingte Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen führt zu einer Stilllegung dieser Gene und spielt damit ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese maligner Tumoren (Esteller, 2002). In einem Brustkrebs-Xenograft-Modell potenzierte die Suppression der DNMTs durch Valproat die Wirkung bestimmter Chemotherapeutika, die für ihre Aktivität Zugang zu der DNA benötigten (Marchion et al., 2005). Auf die weiteren, zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen wird in diesem Rahmen nicht eingegangen.

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurden Erkrankungen identifiziert und untersucht, bei denen der Einsatz von Valproat einen positiven Effekt haben könnte. In der Datenbank der U.S. Nationalen Medizinbibliothek, die klinische Studien aus der ganzen Welt kategorisiert, sind aktuell 274 klinische Studien mit Valproat als „abgeschlossen“ und etwa 100 weitere als „aktuell laufend“ gelistet (vgl. *ClinicalTrials.gov*). Neben dem Einfluss auf verschiedenste Krankheitsbilder, von (auto)inflammatorischen Erkrankungen wie der *Graft-versus-Host Disease* (GvHD) über neurologische Pathologien wie M. Parkinson oder spinale Muskelatrophie bis hin zu AIDS, wurde dabei auch in präklinischen Studien vor allem der Einfluss Valproats auf verschiedene Tumorentitäten untersucht (Chateauvieux et al., 2010). Dabei zeigte sich insbesondere bei hämatologischen Malignitäten wie akuter myeloischer Leukämie, chronisch lymphatischer Leukämie und myelodysplastischen Syndromen eine Wirksamkeit von VPS (Karp et al., 2015; Kuendgen & Gattermann, 2007). Bei bestimmten soliden Tumoren könnte Valproat in Kombination mit Bestrahlung, klassischen Zytostatika oder anderen molekularen, zielgerichteten Medikamenten eine neue Behandlungsoption darstellen (Duenas-Gonzalez et al., 2008).

Die Vorteile einer potenziellen Tumorthherapie mit Valproat im Gegensatz zu der Verwendung neuartiger antineoplastisch wirkender Substanzen liegen in den umfangreichen Erfahrungen hinsichtlich der Nebenwirkungen, Wechselwirkungen, sowie der therapeutischen Breite und nicht zuletzt in ihren geringen Kosten und der oralen Applizierbarkeit. Valproat wird als eines der sichersten Antikonvulsiva angesehen (Lloyd, 2013). Jedoch zeigt sich auch eine Assoziation mit schweren Nebenwirkungen wie Hepatotoxizität (bis hin zu Thrombozytopenie und erhöhter Blutungsneigung) und vor allem Teratogenität (Kostrouchova et al., 2007). Als Reaktion auf das erhöhte Risiko für Malformationen und schwerwiegende Entwicklungsretardierungen bei Kindern, die *in utero* Valproat ausgesetzt waren, wurde zuletzt 2018 in Abstimmung mit der EMA ein Roter-Hand-Brief mit Informationen über neue Anwendungseinschränkungen von Valproat herausgegeben und ein Programm für die Prävention einer Verschreibung an Frauen und Mädchen im gebärfähigen Alter ins Leben gerufen (European Medicines Agency, 2018).

Aus der Vielzahl der Studien kristallisierte sich die bedeutende Rolle der HDAC-Inhibition durch VPS heraus, auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

2.6.3 Valproinsäure und SCFAs als HDAC-Inhibitoren

Kurzkettige Fettsäuren stellen eine Gruppe der HDAC-Inhibitoren dar, zu der auch Valproat zählt. Diese Substanz inhibiert spezifisch bestimmte Isoformen der Klasse I (HDAC 1-3 und 8) und Klasse IIa (HDAC 4, 5, und 7) (Sixto-López et al., 2020). Die Behandlung von Brust-, Blasen-, Leber-Karzinom-Zellen mit Valproat resultierte beispielsweise in einer dosisabhängigen Hyperacetylierung der Histone H3 und/oder H4 (Marchion et al., 2005; Sun et al., 2015; Wang et al., 2013). Riggs et al. (1977) identifizierten erstmalig die SCFA Butyrat als HDAC-Inhibitor. Es folgte die Beschreibung HDAC-inhibitorischer Fähigkeiten auch bei weiteren SCFAs wie Propionat, Valerat, Isobutytrat und Isovalerat. Im Vergleich zu diesen zeigte Butyrat die größte HDAC-inhibitorische Aktivität, wodurch die starke Fähigkeit zur Apoptoseinduktion auf Tumorzellen wie HT-29 Kolonkarzinom-Zellen erklärt werden kann (Hinnebusch, BF et al., 2002; Waldecker et al., 2008).

2.6.4 Effekte von Valproinsäure und SCFAs auf Immunzellen

In Kapitel 2.4.3. wurde der Einfluss einer HDAC-Inhibition auf T-Zellimmunantworten im Allgemeinen thematisiert. Im Folgenden soll speziell auf die durch Valproat und andere SCFAs vermittelte Modulation von Immunzellen eingegangen werden. Dabei liegt mittlerweile eine große Literaturlbasis zu Grunde, in der teilweise kontroverse Daten präsentiert werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Einfluss von SCFAs auf das Immunsystem komplexer sein könnte als bisher angenommen.

- **SCFAs:**

Für SCFAs sind Effekte auf verschiedene Zelltypen wie Kolonepithelzellen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, DCs und T-Zellen beschrieben, wodurch sie direkt die Immunantwort beeinflussen können (Kaisar et al., 2017; Kim et al., 2013, S.; Singh et al., 2014). Es ist bekannt, dass SCFAs periphere regulatorische T-Zellen induzieren können, die das Kolon vor proinflammatorischen Immunreaktionen schützen, und die Barrierefunktion des Darms stärken (Luu et al., 2019). So sind sie entscheidend in die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase involviert (Rooks & Garrett, 2016). Gleichzeitig sind sie möglicherweise auch in der Lage, von Epithelzellen oder T-Lymphozyten vermittelte Entzündungsreaktionen zu verstärken (Kespohl et al., 2017; Kim et al., 2013; Park et al., 2015).

- **Valproat:**

Der genaue Einfluss von Valproat auf einzelne Subtypen der T-Lymphozyten wurde bislang nicht systematisch in *in vitro* Studien untersucht und soll Ziel dieser Arbeit sein. Bisher bekannt ist, dass Valproat auch immunsuppressive Fähigkeiten aufweisen kann. So legen einige Daten nahe, dass VPS die zelluläre Viabilität von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten reduziert, während bei T_{regs} eine vermehrte Proliferation, Stabilisierung von Foxp3 und Erhöhung der suppressiven Aktivität festgestellt wurde. Dabei ist zu beachten, dass VPS diese Funktionen nur in Abhängigkeit von bestimmten immunologischen Umgebungen und Aktivierungsstimuli entwickeln konnte (Soria-Castro et al., 2019). Zudem wurde gezeigt, dass Valproat zu einer Verschiebung hin zu einem T_H2 Phänotyp und zu einer Apoptoseinduktion auch bei T_H17 Zellen führt, was mit einer Verminderung von ROR γ t und IL-17 verbunden war (Jin & Guo, 2016; Tao et al., 2007).

2.7 Immunonkologie

Durch die Erkenntnisse über die immunmodulatorischen Fähigkeiten Valproats auf der einen, und über die antineoplastischen Fähigkeiten auf der anderen Seite, stellt sich die Frage nach einer Kombinierbarkeit der beiden im Sinne einer „Immuntherapie“ mittels Valproat oder anderen SCFAs. So wird in unserer Forschungsgruppe aktuell ein murines Melanom-Modell mit durch Valerat stimulierte CAR-T-Zellen etabliert.

Mit dem Fortschreiten der Krebsforschung wurden in den letzten Jahren weitere „*Tumor-Escape*“-Mechanismen identifiziert. Manche Tumorzellen sind demnach in der Lage, sich durch unterschiedliche Faktoren der zentralen Wächterfunktion von Lymphozyten zu entziehen (Immunevasion) (Drake et al., 2006). Dabei spielen insbesondere zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) eine bedeutende Rolle (C. Li et al., 2020). Für ihre Entdeckung dieser „erworbenen immunologischen Toleranz“ erhielten Sir Frank MacFarlane Burnet und Peter Brian Medawar 1960 den Nobelpreis. Die entarteten Zellen können u.a. eine aktive Anergie unter den tumorinfiltrierenden T-Zellen (TILs) induzieren, Faktoren der Antigenpräsentation herunterregulieren, Suppressor-Immunezellen wie T_{regs} rekrutieren und/oder immunsupprimierende Zytokine wie TGF- β und IL-10 produzieren (Drake et al., 2006; Yang, 2015). Zum anderen nutzen die Zellen ein System, was den Körper eigentlich vor einer erhöhten Immunreaktion - also Allergie oder Autoimmunität - schützen soll. Sie entwickeln die Fähigkeit sogenannte *Immunecheckpointproteine* auf ihren Zelloberflächen zu exprimieren. Diese sorgen dafür, dass Immunezellen (v.a. TILs) diese Zellen als körpereigen einstufen und so keine Bekämpfung dieser Zellen eingeleitet wird. Die bekanntesten Vertreter sind CTLA-4 sowie *programmed death (ligand)-1* (PD(L)-1) (Yang, 2015). Auch für ihre Entdeckung wurde der Nobelpreis vergeben – nämlich 2018 an Allison und Honjo. Auf der Basis dieser Erkenntnisse sind in den letzten Jahren neue Therapiekonzepte entwickelt worden. Dabei soll durch Immuntherapien die Immunogenität der Tumore wieder gesteigert werden, sprich das Immunsystem soll zu der Bekämpfung von Tumoren (re)aktiviert und mobilisiert werden (sogenannte „Immunonkologie“) (Sarkizova & Hacohen, 2017). Inhibitorische Antikörper gegen CTLA-4 oder PD(L)-1 induzieren bei verschiedenen Tumorentitäten ein dauerhaftes Ansprechen und sind bei einer Reihe von metastasierten malignen Erkrankungen zum Goldstandard geworden. Gleichzeitig ist die Therapie bei vielen Patienten aufgrund einer z.B. durch eine immunsuppressive Tumormikroumgebung vermittelten Resistenz des Tumors unwirksam (Egen et al., 2020; Yang, 2015; Jingjing Zhu et al., 2017).

2.8 Ziel der Arbeit

Der Einfluss der SCFAs als Hauptmetabolite des Mikrobioms auf die Gesundheit von Organismen wurde durch intensive Forschung in den letzten Jahrzehnten verdeutlicht. Dabei konnte gezeigt werden, dass das intestinale Mikrobiom einen direkten Einfluss auf das Immunsystem hat. Eine Dysregulation des Immunsystems kann zu Tumoren und Autoimmunerkrankungen führen. Auf der Grundlage dieser Kenntnisse wurden neue Therapieansätze im Sinne einer Modulation des Immunsystems mittels verschiedener Techniken und Substanzen entworfen.

Unsere Forschungsgruppe untersuchte den Einfluss verschiedener SCFAs auf Inflammation und Karzinogenese. Dabei wurde der immunmodulatorische Einfluss v.a. von Butyrat und Valerat insbesondere auf T-Zellen, die als zentraler Pfeiler der adaptiven Immunantwort gelten, bestätigt. Dies führte uns zu der Frage, ob auch Valproat ähnlich immunmodulierend wirkt. Diese verzweigt kurzkettige Fettsäure wird als synthetisches Derivat der natürlich im Darm vorkommenden SCFA Valerat seit mehr als 50 Jahren als Antikonvulsivum eingesetzt und ist das am häufigsten verschriebene antiepileptische Pharmakon in Deutschland.

Der genaue Einfluss von Valproat auf einzelne Subtypen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten wurde bislang nicht systematisch in *in vitro* Studien untersucht und sollte Ziel dieser Arbeit sein. Dazu sollten aus murinen Lymphknoten und Milzen T-Zellen isoliert, in Zellkulturen zu den entsprechenden T-Zellsubklassen differenziert und mit Valproat sowie Valerat behandelt werden. Anschließend sollte der Einfluss der Substanzen auf die verschiedenen T-Zelltypen mittels zellbiologischer und proteinbiochemischer Methoden wie der durchflusszytometrischen Analyse und mittels *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) genauer charakterisiert werden. Ebenso sollte mit Hilfe eines HDAC-Aktivitätsassays evaluiert werden, ob Valproat auch auf T-Zellen HDAC-inhibierend wirkt. Zudem sollte eine mögliche Apoptoseinduktion in den Immunzellen anhand einer Annexin V-Färbung ermittelt werden. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten im Zusammenhang mit der bereits langjährigen therapeutischen Erfahrung mit Valproat und der umfassenden Kenntnis über die Neben- und Wechselwirkungen bei gleichzeitig geringen Kosten und oraler Applizierbarkeit Aufschluss darüber bieten, ob diese Substanz potenziell als Immuntherapeutikum eingesetzt werden könnte.

3 Material

3.1 Geräte

Tabelle 1 – Geräte

Gerät	Modell	Firma
Brutschrank	Heraeus BB6220	Kendro Laboratory Products, Hanau
Durchflusszytometer	BD FACS Calibur™	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
Magnetisches Gestell	MagneSphere®	Promega, Madison
Magnetrührer	RH basic 2 IKAMAG®	IKA, Staufen
Mehrkanalpipetten	50 µl, 100 µl, 300 µl	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop 1	Zeiss Standard 14	Carl Zeiss, Göttingen
Mikroskop 2	Leica DM IL	Leica, Wetzlar
Nanodrop	ND-1000	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
pH-Meter	InoLab pH Level2	WTW, Wertheim
PCR-Maschine	T-Personal	Biometra, Göttingen
Pipetten	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Accu-jet® pro	Brand, Wertheim
Plattenphotometer	FLUOstar® Omega	BMG Labtech, Ortenberg
Rotator	Grant-bio PTR 35	Grant, Cambridge
Spannungsquelle	PowerPac 1000	Biorad, München
Sterile Sicherheitswerkbank	HERAsafe® 18	Kendro Laboratory Products, Hanau
Thermocycler	Thermogradient	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge	Micro Centrifuge	Roth, Karlsruhe
Vortexer	Minishaker MS3 basic	IKA, Staufen
Waage	H51-D	Sartorius, Göttingen
Zellzählkammer	Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Megafuge® 1.0R (gekühlt)	Heraeus, Hanau

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 – Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
FACS-Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Glas Pipetten Pericolor 5 ml, 10 ml	HBG, Gießen- Lützelinden
Mikrotiterplatten 96-well Flachboden, Standard F (Maxisorp ELISA)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Mikrotiterplatten 96-well Flachboden, schwarz (Microlon®)	Greiner Bio-One, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	StarLab, Hamburg
Prä-Separations Filter 30 µm	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Spritze 1 ml	BD Biosciene, Heidelberg
Zellkulturplatten 96-Well Flachboden, Standard, F	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht

3.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3 – Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Firma
Ac-Arg-Gly-Lys(Ac)-AMC	Bachem, Bubendorf
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Roth, Karlsruhe
Annexin V FITC	eBioscience, Frankfurt a.M.
Annexin V Alexa Fluor 647	BioLegend, Fell
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Biotinylierte microBeads	Institut für medizinische Mikrobiologie, Marburg
Brefeldin A	Sigma Aldrich, Steinheim

Ethanol 96% (EtOH)	Otto Fischar, Saarbrücken
EDTA	Promega, Madison, USA
<i>Foxp3 Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent</i>	eBioscience, Frankfurt a.M.
Formaldehyd 36,5%	Sigma Aldrich, Steinheim
Fötiales Kälberserum	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycerol	Riedel-de Haën, Seelze
Destilliertes Wasser (H ₂ O)	Braun, Melsungen
HEPES	Roth, Karlsruhe
Instamed HANKS' Salz Trockensubstanz	Biochrom, Berlin
Ionomycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma Aldrich, Steinheim
Natrium Phosphat	Acros Organics, Geel, Belgien
Natrium Valerat	Merck Schuchardt, Hohenbrunn
Natrium Valproat	Sigma Aldrich, Steinheim
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAS) 100x	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin G/Streptomycinsulfat	Gibco, Karlsruhe
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Phosphat gepufferte Salzlösung 10x (PBS)	Biochrom, Berlin
RPMI 1640	Sigma Aldrich, Steinheim
Saponin	Sigma Aldrich, Steinheim
Streptavidin	Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA
Trichostatin A (TSA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypanblau 0,4%	Gibco, Karlsruhe
Trypsin	Sigma Aldrich, Steinheim
Tween® 20	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim

3.4 Puffer und Medien

Tabelle 4 – Puffer und Medien

Puffer/Medium	Zusammensetzung
Annexin V Färbe-Puffer	1 mg MgCl ₂ , 1,8 mM CaCl ₂ in HBSS (pH 7,3)
<i>Balanced Salts Solution</i> (BSS)	9,9 g/l <i>Hanks' Salt</i> , 1,425 g/l NaHCO ₃ , 10 mM HEPES in H ₂ O dest. (pH 7,2)
<i>Coatingbuffer</i> für Zellkultur	50 mM Tris-Base (pH 9,5) in H ₂ O dest.
Erythrozyten Lyse-Puffer	0,17 M NH ₄ Cl, 20mM HEPES in H ₂ O dest.
ELISA Block-Puffer	10% FCS [v/v] in 1x PBS (pH 7,0)
ELISA <i>Coatingbuffer</i>	0,2 M Natrium Phosphat in H ₂ O dest. (pH 8,2)
ELISA Stop-Lösung	2 N H ₂ SO ₄ in H ₂ O
ELISA Wasch-Puffer	0,05% Tween [v/v] in 1x PBS
HBSS	9,7 g/l HBS in H ₂ O dest. (pH 7,4)
HDAC Lyse-Puffer	1x Reaktionspuffer, 1% Triton X-100
HDAC Reaktions-Puffer	15 mM Tris-HCl, 250 µM EDTA, 250 mM NaCl, 10% Glycerol
HDAC Stop-Lösung	50 mM Tris-HCl, 10 mg/ml Trypsin, 100 mM NaCl, 2 µM TSA
Fötales Kälberserum (FCS)	Hitzeinaktiviert (30 Min. 56 °C)
MACS-Puffer	0,5% BSA [w/v], 2 mM EDTA in 1x PBS (pH 8,0)
PBS/1% FCS	1% FCS [v/v] in 1x PBS
<i>Phosphate Buffered Saline</i> 10x (PBS)	PBS-Trockensubstanz in H ₂ O dest. (pH 7,2)
<i>Phosphate Buffered Saline</i> 1x (PBS)	100 ml 10x PBS in 900 ml H ₂ O dest.
RPMI (Komplettmedium)	10% FCS [v/v], 2 mM L-Glutamin, 1% NEAS [v/v], 50 µM β-Mercaptoethanol, 60 mg/ml Penicillin G, 100 mg/ml Streptomycin in RPMI 1640
Saponin-Puffer	0,3% Saponin [w/v], 2% FCS [v/v] in PBS

3.5 Antikörper

3.5.1 Antikörper für die magnetische Separation (MACS) der T-Zellen

Tabelle 5 – MACS-Antikörper

Zielstruktur	Konjugat	Klon	Firma
α -B220	FITC	RA3-6B2	BD Pharmingen, Heidelberg
α -CD11b	FITC	M1/70	eBioscience, Frankfurt a.M.
α -CD11c	FITC	N418	eBioscience, Frankfurt a.M.
α -CD4	FITC	GK1.5	eBioscience, Frankfurt a.M.
α -CD49b	FITC	DX5	eBioscience, Frankfurt a.M.
α -CD8a	FITC	53-6.7	eBioscience, Frankfurt a.M.
α -FITC	Streptavidin- Biotin		Institut für medizinische Mikrobiologie, Marburg
α -Ter119	FITC	TER-119	eBioscience, Frankfurt a.M.

3.5.2 Antikörper für die Zellkultur

Tabelle 6 – Zellkultur-Antikörper

Zielstruktur	Isotyp/Klon	Firma
α -CD28	Hamster IgG 37.51	eigene Herstellung, Institut für medizinische Mikrobiologie Marburg
α -CD3	Hamster IgG 145-2C-11	eigene Herstellung, Institut für medizinische Mikrobiologie Marburg
α -IFN- γ	Ratte IgG1 XMG 1.2	eigene Herstellung, Institut für medizinische Mikrobiologie Marburg
α -IL4	11B11	eigene Herstellung, Institut für medizinische Mikrobiologie Marburg

3.5.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 7 – Durchflusszytometrie-Antikörper

Zielstruktur	Konjugat	Isotyp/Klon	Verdünnung	Firma
α -CD4	PerCP	Ratte IgG2a RM4-5	1:400	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
α -CD8a	PerCP	Ratte IgG2a 53-6.7	1:400	eBioscience, Frankfurt a.M.
α -Foxp3	PE	Ratte IgG2a FJK-16s	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
α -Granzym B	PE	Ratte IgG2b 16G6	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
α -IFN- γ	APC	Ratte IgG1 XMG 1.2	1:500	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
α -IFN- γ	PE	Ratte IgG1 XMG 1.2	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
α -IL-17A	APC	Ratte IgG2a eBio17B7	1:500	eBioscience, Frankfurt a.M.
α -IL-17A	PE	Ratte IgG2a eBio17B7	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.

3.6 Zytokine

Tabelle 8 – Zytokine

Zytokin	Firma
Rekombinant humanes (Rh) IL-2	Eurocetus Proleukin Chiron, Mailand, Italien
rh TGF- β 1	PeptoTech, Hamburg
Rekombinant murines (Rm) IL-6	PeptoTech, Hamburg
rm IL-12	PeptoTech, Hamburg

3.7 Mäusstämme

Tabelle 9 – Mäusstämme

Mäusstamm	Herkunft
C57BL/6	Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts, USA

3.8 Software

Tabelle 10 – Software

Name	Firma
<i>CellQuest Pro™</i>	BD Bioscience, San Jose, Kalifornien, USA
<i>FlowJo V10™</i>	Treestar, San Carlos, Kalifornien, USA
<i>FLUOstar® Omega</i>	BMG Labtech, Ortenberg
<i>GraphPad Prism 5</i>	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA
<i>MS Office 2011</i> (Word, Powerpoint, Excel)	Microsoft, Redmond, Washington, USA

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Organpräparation

Mäuse des Stammes C57BL/6 im Alter zwischen 8 und 12 Wochen wurden mittels zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurden die oberflächlichen und mesenterialen Lymphknoten sowie die Milz entnommen. Nach Aufnahme in *Balanced salt solution* (BSS) erfolgte die Lagerung auf Eis. Mithilfe von 30 µm Zellsieben wurden Einzelzellsuspensionen der einzelnen Organe hergestellt. Nach Waschen mit BSS erfolgte die Resuspension des Milzzellpellets in einem entsprechenden Volumen Ammoniumchlorid (NH₄Cl) für die Lyse der Erythrozyten für 5-7 Minuten (min) bei Raumtemperatur (RT). Um die Reaktion zu stoppen, erfolgte die Zugabe von MACS Puffer zu der Suspension. Die Zellen wurden abermals gewaschen, Milz- und Lymphknotensuspensionen vereinigt und zur Zellzahlbestimmung in einem bestimmten Volumen MACS Puffer resuspendiert.

4.1.2 Zellzahlbestimmung

Mithilfe einer Neubauer Zählkammer ist es möglich, mikroskopisch anhand eines geringen Zählvolumens auf die Gesamtzellzahl einer Suspension zu schließen. Durch Trypanblau ist eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen möglich, da dieses an Proteine toter Zellen bindet und abgestorbene Zellen somit anfärbt.

Zum Zählen wurden 5 µl der Zellsuspension in einem geeigneten Volumen Trypanblau verdünnt. 10 µl dieser Verdünnung wurden anschließend auf die 0,1 mm tiefe Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Es wurden die lebenden Zellen gezählt und die Gesamtzellzahl pro ml anhand folgender Formel errechnet:

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\sum \text{Zellen pro Quadrant}}{\text{Anzahl ausgezählter Quadranten (4)}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \text{ (Kammerfaktor)}$$

4.1.3 Magnetische Isolation der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Lymphozyten

Die Isolation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten aus einer heterogenen Zellsuspension kann mithilfe einer *magnetic activated cell separation* (MACS) erfolgen. Dazu kam eine laboreigene negative Aufreinigungsmethode zum Einsatz, bei der letztlich eine homogene Suspension mit dem gewünschten Zelltyp verbleibt.

Das Prinzip der Trennung der Zellen beruht auf der Fähigkeit von Antikörpern (AK) spezifische Oberflächenproteine zu binden. Es wird eine Folge dreier verschiedener AK-Mixe verwendet. Die ersten AK sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) gekoppelt. Sie richten sich gegen alle Zelltypen außer den gewünschten. Der AK-Mix für die CD4⁺ T-Lymphozyten Separation besteht folglich aus α -B220, α -CD11b, α -CD11c, α -CD49b, α -Ter119, sowie α -CD8a-AK, während der CD8⁺-Mix anstatt α -CD8a α -CD4-AK enthält. Die Kopplung an FITC erlaubt es den zweiten, Biotin-gekoppelten α -FITC-AK, welche zudem mit Streptavidin konjugiert sind, an die ersten AK zu binden. Als drittes führen biotinylierte, magnetische *microBeads* über die Bindung von Streptavidin und Biotin zu der Anziehung der AK-markierten Zellen an einen magnetischen Ständer. Der Überstand (ÜS) enthält die gewünschten, unmarkierten und unstimulierten CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Lymphozyten und kann abgenommen werden.

Die in MACS-Puffer suspendierten Zellen wurden gewaschen, der ÜS verworfen und das Zellpellet in 250 μ l MACS-Puffer pro 10^8 Zellen und 2,5 μ l des FITC-gekoppelten AK-Mix pro 10^8 Zellen resuspendiert. Nach 10 minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen in MACS-Puffer gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe von 100 μ l/ 10^8 Zellen MACS-Puffer und 1 μ l/ 10^8 Zellen des Kombi- α -FITC-Biotin/Streptavidin-AK. Nach 15 Minuten Inkubation bei 4°C wurden die Zellen zweimal in MACS-Puffer gewaschen. Danach erfolgte wiederum die Resuspension in 1,5 ml MACS-Puffer pro 10^8 Zellen mit 50 μ l/ 10^8 Zellen der biotinylierten *microBeads*, sowie die Aufteilung auf 2 ml Eppendorfgefäße. Diese Gefäße wurden für 15-20 Minuten bei 4°C auf einem Rotator platziert, um eine ausreichende Durchmischung der *microBeads* zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die magnetische Separation der Zellen für 15-20 Minuten auf einem magnetischen Ständer. Die ÜS mit den gewünschten Zellen wurden vorsichtig abgenommen. Nun wurde die Zellzahl nach Separation mithilfe der Neubauer-Zählkammer erneut bestimmt.

Um den Anteil der aufgereinigten Zellen an der Zellsuspension (entspricht der „Reinheit“) zu bestimmen, wurden zunächst 20 μ l der Zellen zu 100 μ l eines in

phosphate buffered saline/1% fetal calf serum (PBS/1% FCS) 1:300 verdünnten α -CD4- bzw. α -CD8a-Allophycocyanin (APC)-AK gegeben und so gefärbt. Es folgte eine 10 minütige Inkubation bei 4°C. Anschließend wurden die gefärbten Zellen in PBS/1% FCS gewaschen und im Rücklauf resuspendiert. Eine nicht gefärbte Negativ-Kontrolle mit 20 μ l Zellen in 200 μ l PBS/1% FCS wurde vorbereitet. Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde nun die Reinheit der aufgereinigten CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten überprüft (vgl. 4.1.6.4). Für die Versuche wurden nur Zellen mit einer Reinheit von über 85% verwendet.

4.1.4 Aktivierung und Differenzierung der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Lymphozyten

Um T-Zellen *in vitro* zu stimulieren, werden das Signal des TCR und das kostimulatorische CD28-Rezeptorvermittelte Signal mithilfe von AK gegen CD3 und CD28 initiiert. Das umgebende Zytokinmilieu spielt für die Differenzierung und Aktivierung eine entscheidende Rolle. Mithilfe verschiedener rekombinanter Zytokine, die über intrazelluläre Signalwege zu der Induktion spezifischer Transkriptionsfaktoren führen, sowie Antikörpern gegen unerwünschte Zytokine werden die T-Zellen in die verschiedenen Subtypen differenziert. Durch die Zugabe von rekombinant humanem TGF- β 1 (rhTGF- β 1) wird die Differenzierung zu T_{regs} gefördert. Werden CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Lymphozyten neben rhTGF- β 1 zusätzlich mit Interleukin 6 (IL-6) inkubiert, führt dies zu der Entwicklung des T_H- bzw. T_C17-Subtyps, während der T_H1-Subtyp durch die Zugabe von Interleukin 12 (IL-12) entsteht (Raphael et al., 2015).

Eine 96-Well-Platte wurde mit je 50 μ l α -CD3-AK in entsprechender Konzentration (Tabelle 11) beschichtet, über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend mit BSS gewaschen. Die Zytokine und AK wurden in RPMI-Medium verdünnt. Anschließend wurden je 100 μ l der entsprechenden Zytokin/AK-Kombination (Tabelle 11) pro Well vorgelegt, dann erfolgte die Zugabe von in je 100 μ l RPMI resuspendierten 200.000 CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen pro Well.

Tabelle 11 – Bestandteile der T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung

Zytokin/AK	CD4 ⁺ T-Zellen			CD8 ⁺ T-Zellen	
	T _{H1}	T _{H17}	T _{regs}	CTL	Tc17
α-CD3	5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml	5, 1 bzw. 0,5 µg/ml	5 µg/ml
α-CD28	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 bzw. 0,5 µg/ml	1 µg/ml
α-IFN-γ	-	5 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml
α-IL-4	10%	10%	10%	10%	10%
rhIL-2	50 U/ml	50 U/ml	100 U/ml	50 U/ml	50 U/ml
rhTGF-β1	-	1 ng/ml	2 ng/ml	-	10 ng/ml
IL-6	-	40 ng/ml	-	-	40 ng/ml
IL-12	10; 5; 2,5 bzw. 1 ng/ml	-	-	-	-

4.1.5 Behandlung der Zellen mit Natrium-Valproat oder Natrium-Valerat

Valproinsäure als Antikonvulsivum wird größtenteils in Form von dem besser wasserlöslichen Natriumvalproat oder als Kombination von Valproinsäure mit Natriumvalproat vertrieben (Handelsname beispielsweise Ergenyl®) (Sanofi-Aventis, 2018). Aus diesem Grund wurden die *in vitro* Experimente mit Natriumvalproat durchgeführt.

Das in Wasser gelöste Natriumvalproat bzw. Natriumvalerat wurde zu den Zellen gegeben. Valproat wurde nach Beachtung der in Abschnitt 5.1 beschriebenen Überlegungen titriert und in Konzentrationen zwischen 0,01 mM und 2,5 mM verwendet. Es wurden nur Daten aus Zellkulturen verwendet, bei welchen eine

moderate Letalitätsrate vorlag, was je nach Zelltyp unterschiedlich hohen Valproat Konzentrationen entsprach.

4.1.6 Nachweis von Proteinen mittels Durchflusszytometrie

Zur Detektion spezifischer Zytokine und Transkriptionsfaktoren wurden die CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Lymphozyten nach dreitägiger Aktivierung und Differenzierung geerntet und restimuliert, um sie dann mithilfe spezifischer Fluoreszenz-gekoppelter AK durchflusszytometrisch zu analysieren. Die Überstände wurden bei -20°C für Untersuchungen mittels *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) eingefroren.

4.1.6.1 Restimulation der CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Lymphozyten

Um die Zellen mittels Durchflusszytometrie zu analysieren, wurden diese zunächst restimuliert. Hierbei greifen Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) sowie Ionomycin an unterschiedlichen Stellen in die Signalkaskade des TCR ein und führen so zu einer erhöhten Proteinbiosynthese. Extrazelluläre Proteine können durchflusszytometrisch nicht erfasst werden. Um die Sekretion der Proteine zu verhindern, wird Brefeldin A eingesetzt. Dieses führt über eine Behinderung des Exports über den Golgi-Apparat zu einer intrazellulären Anhäufung der translatierten Proteine. Die Akkumulation der Zielproteine erleichtert die Detektion derselben mittels fluoreszenzgekoppelter AK.

Die geernteten, differenzierten Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und mit RPMI Medium gewaschen. Nach der Resuspension im Rückfluss wurde pro Probe je 1 ml Restimulationsmedium (Tabelle 12) zugegeben. Es folgte eine 4-stündige Inkubation bei 37°C im Brutschrank (5% CO₂).

Tabelle 12 – Bestandteile der T-Zell-Restimulation

PMA	50 ng/ml
Ionomycin	750 ng/ml
Brefeldin A	5 µg/ml
RPMI	

4.1.6.2 Intrazelluläre Färbung und intranukleäre Foxp3-Färbung

Um Zytokine und Proteine (wie Perforin oder Granzym B) durchflusszytometrisch zu detektieren, müssen diese intrazellulär angefärbt werden. Dazu werden die Zellen zunächst fixiert, um den Proteinstatus der Zelle zu konservieren. Für die intrazelluläre Färbung muss die Zellmembran mit dem Detergenz Saponin permeabilisiert werden.

Bei einer Reinheit der Zellsuspension zwischen 80 und 90% wurde vor der Fixierung eine Oberflächenfärbung auf CD8a bzw. CD4 durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach der Restimulation in PBS gewaschen und der Rückfluss mit 10 µl 1:400 verdünntem α -CD8a- bzw. α -CD4-Peridinin Chlorophyll Protein Complex (PerCP)-AK gefärbt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min. bei 4°C wurden die Zellen mit PBS gewaschen und wie unten beschrieben fixiert, gefärbt und analysiert.

Nach der Inkubation in dem Restimulationsmedium wurden die Zellen in PBS gewaschen und mit je 1 ml 2% Formaldehydlösung (36,5% Formaldehyd in PBS verdünnt) fixiert. Nach einer Inkubation (20 Minuten bei RT im Dunkeln) folgten zwei Waschschriffe, mit PBS/1% FCS sowie Saponin. Die intrazelluläre Färbung erfolgte mit den entsprechenden Antikörpern (vgl. Tabelle 7) durch Zugabe von 10 µl des Gemisches pro Probe in den Rückfluss (etwa 100 µl). Nach 20 Minuten bei 4°C wurden die Zellen in Saponin gewaschen, der Rücklauf resuspendiert und wiederum in PBS/1% FCS gewaschen. In 200 µl PBS/1% FCS resuspendiert konnte nun die durchflusszytometrische Analyse (vgl. 4.1.6.4) der zu T_H1- und T_H17-Subtypen differenzierten CD4⁺ T-Lymphozyten sowie der zytotoxischen und T_c17-CD8⁺ T-Lymphozyten erfolgen.

Um Transkriptionsfaktoren wie Foxp3 bei T_{regs} detektieren zu können, muss eine intranukleäre Färbung erfolgen. Diese erfolgt an nicht restimulierten Zellen. Die Fixation der Zellen erfolgt mittels 400 µl *Foxp3 Fixation/Permeabilization Concentrate & Diluent* (eBioscience™) für 20 Minuten im Dunkeln bei 4°C. Nach zwei Waschschriffen mit PBS/1% FCS wurden die Zellen mittels Saponin permeabilisiert und in 1:300 in Saponin verdünntem α -Foxp3-PE-AK für 20 Minuten bei 4°C gefärbt. Die durchflusszytometrische Analyse der T_{regs} erfolgte nach Waschen mit Saponin und PBS/1% FCS (vgl. 4.1.6.4).

4.1.6.3 Annexin V-Apoptose-Färbung

In frühen Apoptose-Stadien kommt es zu Veränderungen an der Zelloberfläche. Die Translokation von Phosphatidylserin (PS) von der Innenseite zu der Außenseite der Plasmamembran ist eine dieser Änderungen. Das Protein Annexin V bindet an der Außenseite befindliches PS, wodurch apoptotische Zellen detektiert werden können. Die Detektion kann durchflusszytometrisch erfolgen, wenn Annexin V an Fluorochrome wie FITC oder APC gekoppelt ist.

Die geernteten Zellen wurden nicht restimuliert. Nach einem Waschschrift mit *Hank's balanced salt solution* (HBSS) wurden die Zellen mit 3,5 µl Annexin V-FITC oder -APC pro 100 µl HBSS pro Probe gefärbt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation im Dunkeln bei RT. Die Apoptoserate der Zellen wurde durchflusszytometrisch (vgl. 4.1.6.4) analysiert.

4.1.6.4 Durchflusszytometrische Messung

Die Durchflusszytometrie (*Fluorescence-activated cell sorting* (FACS)) ermöglicht eine Analyse von oberflächlichen und intrazellulären Zellstrukturen. Es können somit Zellpopulationen quantifiziert und charakterisiert werden.

Die Zellen werden durch einen Hüllstrom fokussiert und nacheinander einzeln durch einen Mikrokanal geleitet. Dort passieren sie einen Argonlaser. Dieser regt die AK-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe wie APC, FITC, PE oder PerCP an. Die dabei entstehenden, spezifischen Fluoreszenzemissionen werden von Detektoren aufgefangen und in digitale Signale umgewandelt. Mithilfe dieser gekoppelten AK können so spezifische Strukturen und Proteine, wie IL-17A, IFN- γ , Granzym B oder Transkriptionsfaktoren, registriert werden. Je nach Größe und Granularität der Zelle ist die Lichtstreuung unterschiedlich, worüber der *forward* – (FSC) und der *side scatter* (SSC) Aufschluss geben.

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte am FACS-Calibur™ mithilfe der Software *CellQuestPro*™. Die Analyse der Messwerte und die graphische Darstellung erfolgte anhand des Programms *FlowJo*™.

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

Mithilfe eines *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) können Proteine wie die Zytokine (z.B. IFN- γ) in einer bestimmten Probe detektiert und quantifiziert werden.

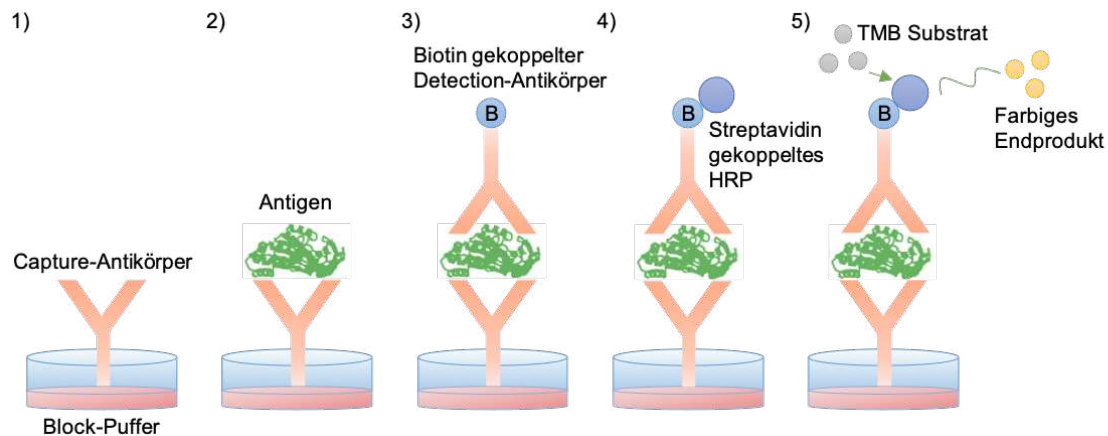


Abbildung 6 – Prinzip eines Sandwich ELISAs

Das Prinzip des verwendeten Sandwich ELISAs beruht auf der Fähigkeit von AK an spezifische Antigene wie die gesuchten Proteine zu binden. Dazu wird zunächst der erste AK- der *Capture* Antikörper- an eine 96-well Mikrotiter Platte gebunden. Mithilfe eines Block-Puffers werden die freigebliebenen Proteinbindungsstellen blockiert (Abb. 6.1). Anschließend werden die Proben sowie eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen der gesuchten Proteine auf die Platte aufgetragen (Abb. 6.2). In der folgenden Inkubationszeit binden die an die Platte gebundenen *Capture*-Antikörper das in den Proben vorhandene Antigen. Durch mehrmaliges Waschen werden nicht- oder unspezifisch gebundene Antigene entfernt, sodass eine falsch positive Testung vermieden wird. Im nächsten Schritt wird ein mit Biotin gekoppelter Zweit-AK - der *Detection*-Antikörper - zugefügt (Abb. 6.3), der ebenfalls an das Antigen bindet. An den Zweit-AK binden Streptavidin gekoppelte Enzyme wie Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) (Abb. 6.4). Wird nun ein entsprechendes Substrat wie Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben, ist das gebundene HRP in der Lage, das farblose Chromogen TMB zu seinem farbigen Endprodukt zu aktivieren (Abb. 6.5). Die Fluoreszenzintensität kann photometrisch erfasst werden – sie ist proportional zu der Menge des gebundenen nachzuweisenden Antigens.

Die Umsetzung der IFN- γ ELISAs mit den Überständen der jeweiligen Zellkulturen erfolgte nach Herstellerprotokoll. Die photometrische Messung wurde mit dem Plattenphotometer FLUOstar® Omega (BMG Labtech) bei 405 nm durchgeführt. Die erhaltenen Emissionsdaten wurden mit *Office Excel 2011* ausgewertet und die Proteinkonzentrationen der Proben anhand der durch die Standardreihe gewonnenen Kalibrierungskurve näherungsweise bestimmt.

4.2.2 HDAC-Aktivitätsassay

Um die Fähigkeit und Potenz der HDAC-Inhibition einer Substanz zu detektieren, findet ein HDAC-Aktivitätsassay Anwendung.

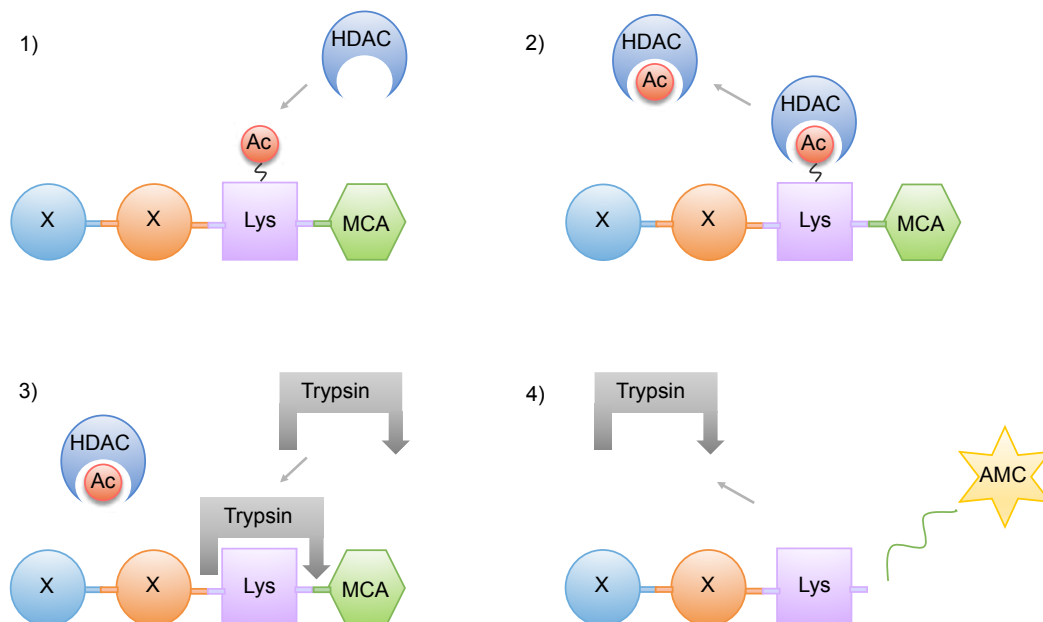


Abbildung 7 – Prinzip eines HDAC-Aktivitätsassays

Dieser basiert auf dem Einsatz von acetylierten fluorogenen Peptiden (MCA), die Substrate von HDACs sind (Abb. 7.1). Die sich in den Zelllysaten befindlichen HDACs deacetylieren die Lysinreste dieser Substrate (Abb. 7.2), wodurch Trypsin binden und das fluoreszierende 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) abspalten kann (Abb. 7.3 und 4). Die AMC Fluoreszenz korreliert antiproportional mit der Potenz eines HDAC-Inhibitors.

Zellpellets der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten wurden mithilfe des HDAC-Lyse-Puffers lysiert und für 10 Minuten auf Eis unter mehrmaligem Vortexen inkubiert. Nach 5

minütigem Zentrifugieren bei 10.000 g wurde der ÜS abgenommen und in einem entsprechenden Volumen HDAC-Reaktions-Puffer suspendiert. 35 µl des Zelllysats wurden pro Well auf eine schwarze 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert. Nun erfolgte die Zugabe der zu testenden Substanzen Valproat und Valerat (5mM). TSA (500 nM) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Nach 20 Min Inkubation bei RT im Dunkeln wurden 15 µl des fluorogenen Ac-Arg-Gly-Lys(Ac)-AMC-Substrats hinzugefügt. Nach 60 Min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch die Zugabe von Trypsin (50 µl) und weiteren 30 Min im Inkubator abgestoppt. Die Fluoreszenz wurde bei $\lambda_{\text{ex}} = 355$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm im Plattenphotometer FLUOstar® Omega (BMG Labtech) gemessen.

4.3 Statistische Analysen

Für die statistische Analyse wurden die Mittelwerte ungepaarter Gruppen mittels ungepaartem *Student's t-test* miteinander verglichen; es wurde von einer Gauß'schen Normalverteilung ausgegangen. Ein P-Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen (*** $p < 0,001$, ** $p = 0,001 - 0,01$, * $p = 0,01 - 0,05$), während $p > 0,05$ als statistisch nicht signifikant (n.s.) angesehen wurde. Die Analyse erfolgte mittels *GraphPad Prism 5*.

5 Ergebnisse

Die verzweigte SCFA Valproinsäure respektive ihr Salz Valproat moduliert verschiedenste antineoplastische Prozesse (Kostrouchova et al., 2007). Die langjährige therapeutische Erfahrung mit Valproat bei gleichzeitig geringen Kosten und oraler Applizierbarkeit macht diese Substanz zu einem überaus reizvollen potenziellen Tumorthapeutikum. Mit Zunahme der Erkenntnisse über die Fähigkeit von Tumoren, sich der Kontrolle des Immunsystems zu entziehen (Immunevasion), rückt auch immer mehr die Strategie der Immuntherapie in den Fokus, bei der das Immunsystem zu der Bekämpfung von Tumoren mobilisiert werden soll (vgl. Kapitel 2.7). Es ist bekannt, dass Valproat modulierend auf das Immunsystem wirkt, der genaue Einfluss auf verschiedene Subtypen der T-Lymphozyten ist bisher jedoch nicht gänzlich geklärt und wurde in dieser *in vitro* Studie genauer charakterisiert.

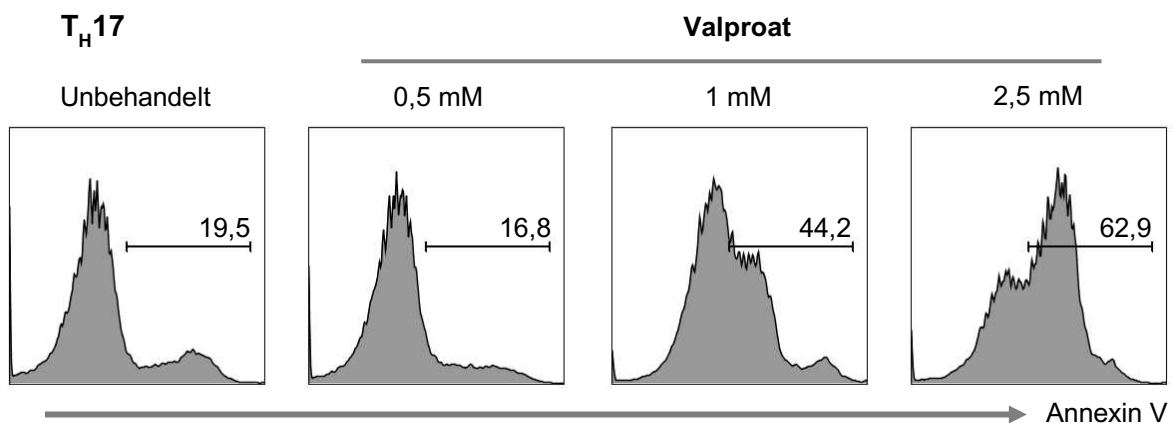
5.1 Valproat induziert konzentrationsabhängig die Apoptose bei T-Zellsubtypen

Zunächst musste evaluiert werden, welche Valproat Dosierungen für die Behandlung der einzelnen Lymphozyten Subklassen eingesetzt werden sollten. Dazu folgte eine Orientierung an den therapeutischen Serum-Valproatspiegeln bei Patienten mit Epilepsie. Bei der antiepileptischen Therapie mit diesem Wirkstoff wird dabei ein Talspiegel von 50 - 100 µg/ml angestrebt, was einer molaren Masse von 0,35 – 0,7 mM entspricht (Patsalos et al., 2008). Es wurde gezeigt, dass Valproinsäure in diesen Dosen als potenter HDAC-Inhibitor wirkt (Gottlicher et al., 2001). Zu beachten war, dass es sich hierbei um Serumkonzentrationen bei Menschen handelt, während unsere Experimente an murinen Zellen durchgeführt wurden. Um dies zu berücksichtigen, orientierten wir uns zusätzlich an für andere SCFA üblichen Konzentrationen für die Behandlung muriner T-Zellen.

Wie bereits beschrieben, weist Valproat verschiedene antineoplastische Fähigkeiten auf. Hierzu gehört auch die Induktion der Apoptose von Tumorzellen, welche durch mehrere *in vitro* und *in vivo* Studien belegt wurde (Kostrouchova et al., 2007). Folglich stellte sich die Frage, ob Valproat nicht nur bei Tumorzellen, sondern auch bei Immunsystem eigenen Zellen einen proapoptotischen Effekt aufweist. Um eine mögliche Apoptoseinduktion bei exemplarischen Subtypen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen – hier T_H17- und T_C17-Zellen – durch Valproat zu prüfen, und damit gleichzeitig

geeignete Dosierungen für die weiteren Experimente zu identifizieren, wurde eine Annexin V-Färbung angewendet, mittels derer frühapoptotische Zellen durchflusszytometrisch detektiert werden können (vgl. Methoden 4.1.6.3 und 4.1.6.4). Dazu wurden aus murinen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen T_H17 -Zellen bzw. T_C17 -Zellen generiert und mit ansteigenden Valproatkonzentrationen behandelt. Die geernteten Zellen wurden nicht restimuliert, sondern direkt mit fluoreszenzgekoppeltem Annexin V behandelt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

A



B

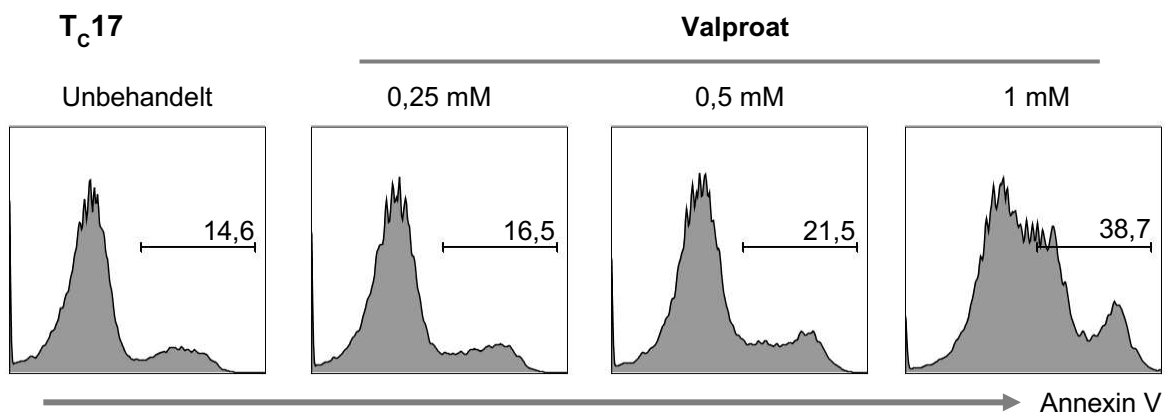


Abbildung 8 – Proapoptotischer Effekt von Valproat auf verschiedene T-Zellsubtypen

$CD4^+$ T-Zellen wurden aus murinen Lymphknoten und Milzen isoliert und in einem entsprechenden Zytokinmilieu (vgl. Tabelle 11, 4.1.4) für 3 Tage unter Zugabe von steigenden Valproatkonzentrationen zu T_H17 -Zellen differenziert. Analog dazu erfolgte die Differenzierung von $CD8^+$ T-Zellen zu T_C17 -Zellen. Nach dem Ernten der Zellen wurden die apoptotischen Zellen mittels Annexin V-Färbung durch Fluorochrom-gekoppelte AK durchflusszytometrisch detektiert. Die Graphiken zeigen repräsentativ das Ergebnis zweier unabhängiger Versuche.

Die Daten illustrieren, dass Valproat einen proapoptotischen Effekt auch auf Immunzellen ausübte, der jedoch abhängig vom Zelltyp unterschiedlich ausgeprägt war. Abbildung 8.A ist zu entnehmen, dass die Behandlung von T_H17-Zellen mit 2,5 mM Valproat zu einer Verdreifachung des Anteils apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle führte. Bei T_C17-Zellen hatte die Kultivierung zusammen mit 1 mM Valproat einen etwas geringeren proapoptotischen Effekt – es kam zu einem Anstieg der apoptotischen Zellen auf etwa 40% (Abb. 8.B). Diese Erkenntnisse dienten als Grundlage für den Dosierungsbereich von Valproat, der in den folgenden Experimenten angewandt wurde.

5.2 Valproat wirkt auf CD4⁺ T-Zellen als HDAC-Inhibitor

In den Publikationen von Göttlicher et al. (2001) sowie Phiel et al. (2001) wurde erstmalig die inhibitorische Wirkung von Valproat auf verschiedene HDAC-Klassen beschrieben. Es ist bekannt, dass die strukturell ähnlichen SCFA Butyrat (C4) und Propionat (C3) in der Lage sind, den epigenetischen Status von Immunzellen mittels HDAC-Inhibition zu beeinflussen (Arpaia et al., 2013; Chang et al., 2014). Unsere Arbeitsgruppe konnte zudem kürzlich zeigen, dass insbesondere Valerat (C5) als potenter HDAC-Inhibitor auf Lymphozyten wirkt (Luu et al., 2019).

Um zu prüfen, ob auch Valproat einen solchen Effekt auf Immunzellen, hier im Speziellen auf CD4⁺ T-Zellen, ausübt, wurden diese mit Valerat, Valproat und dem Pan-HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) behandelt und die HDAC-Aktivität mittels eines Fluoreszenz-basierten Assays (vgl. Methoden 4.2.2) relativ zu einer unbehandelten Probe verglichen (Abb. 9).

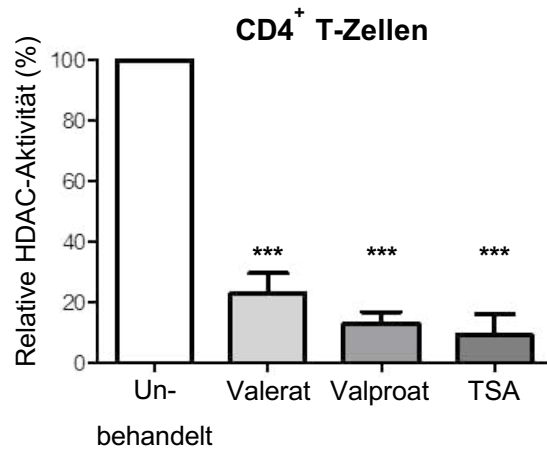


Abbildung 9 – Inhibition der HDAC-Aktivität durch Valproat und Valerat in CD4⁺ T-Zellen

Relative HDAC-Aktivität von Valerat, Valproat (je 5 mM) und TSA (500 nM). Die HDAC-Aktivität von CD4⁺ Zellysaten wurde mit einem Fluoreszenz-basierten HDAC-Aktivitätsassay relativ zu einer unbehandelten Kontrolle gemessen. TSA diente als Positivkontrolle. Es werden gepoolte Daten aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt (Die Balkendiagramme repräsentieren den Mittelwert \pm den Standardfehler des Mittelwertes (SEM)). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle: *** $p < 0,001$).

Es zeigte sich, dass alle eingesetzten Substanzen eine signifikante HDAC-inhibitorische Aktivität auf CD4⁺ T-Zellen aufwiesen. So konnten Valerat, Valproat und TSA die relative HDAC-Aktivität um mehr als 70% senken. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Potenz der HDAC-Inhibition der beiden SCFAs konnte nicht festgestellt werden.

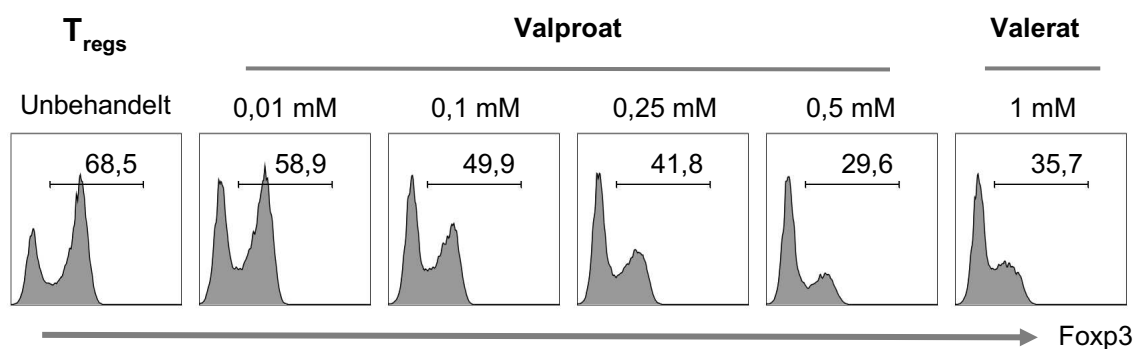
5.3 Die Generierung von Foxp3⁺ T_{regs} kann *in vitro* nicht durch Valproat gefördert werden

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass manche SCFAs in der Lage sind, die Generierung von peripheren regulatorischen T-Zellen (pT_{regs}) durch die Induktion epigenetischer Modifikationen am Foxp3-Locus zu fördern. Zu diesen zählten Butyrat und Propionat (Arpaia et al., 2013; Furusawa et al., 2013). Valerat hingegen, welches die chemische Grundstruktur für Valproat aufweist, war dazu nicht befähigt (Luu et al., 2019).

Um den Effekt Valproats zu validieren, wurden regulatorische T-Zellen aus murinen CD4⁺ T-Lymphozyten generiert. Die Differenzierung in regulatorische T-Zellen wurde

durch Inkubation der CD4⁺ T-Zellen in einem T_{reg}-induzierenden Zytokinmilieu erreicht (vgl. Tabelle 11, 4.1.4). In vorgehenden Versuchen konnte beobachtet werden, dass T_{regs} bei höheren Valproatkonzentrationen (von zB. 1 mM) einen größeren apoptotischen Anteil aufwiesen als die weiteren T-Zellsubtypen, weshalb hier die Behandlung mit maximal 0,5 mM Valproat durchgeführt wurde, gefolgt von einer 3-tägigen Kultivierung. Nach einer intranukleären Färbung auf den Transkriptionsfaktor Foxp3 wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zum Vergleich wurde 1 mM Valerat eingesetzt (Abb. 10).

A



B

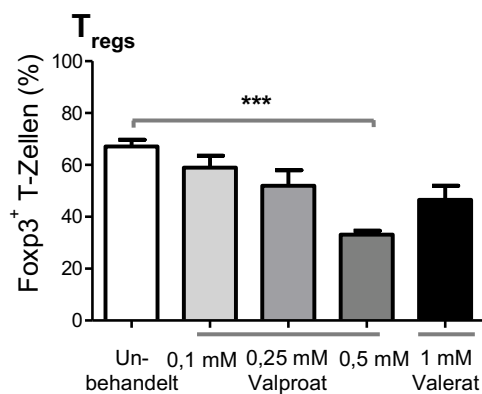


Abbildung 10 – Behandlung mit Valproat führt *in vitro* zu einer Reduktion von Foxp3⁺

T_{regs}

Regulatorische T-Zellen wurden durch Polarisierung von murinen CD4⁺ T-Zellen durch Zugabe von TGF-β1 und IL-2 generiert, mit steigenden Valproat Konzentrationen sowie Valerat behandelt und für 3 Tage kultiviert. Nach intranukleärer Färbung mit α-Foxp3-PE-AK wurde die Foxp3⁺-T_{reg}-Population mittels FACS-Calibur analysiert. **A:** Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. **B:** Die Balkendiagramme zeigen entsprechend den Mittelwert ± SEM. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle: *** p < 0,001.

Unsere Forschungsgruppe konnte in einer früheren Studie zeigen, dass Valerat keinen induzierenden Effekt auf Foxp3⁺-T_{regs} aufweist (Luu et al., 2019). Diese Ergebnisse konnten wir im Rahmen dieser Untersuchung verifizieren: Die Behandlung der Zellen mit 1 mM Valerat führte zu einer Reduktion der Foxp3⁺-T_{regs}. Valerat und Valproat präsentierten dabei eine vergleichbare Wirkung auf die Differenzierung: In den Zellpopulationen, die mit Valproat kultiviert wurden, zeigte sich mit steigender Dosis eine verminderte Population der Foxp3⁺-T_{regs}. Die Behandlung mit 0,5 mM Valproat bewirkte eine ca. als 50%-ige Reduktion im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Interessanterweise fiel zudem auf, dass Valproat in einer geringeren Dosierung (von 0,5 mM) zu einer stärkeren Reduktion der Foxp3⁺-T_{reg} führte als 1 mM Valerat (Abb. 10). Zusammenfassend weisen die Daten darauf hin, dass die SCFAs Valerat und Valproat, im Gegensatz zu Butyrat und Propionat, keinen positiven Effekt auf die Differenzierung regulatorischer T-Zellen haben.

Dies führte zu der Frage, ob statt des T_{reg} Phänotyps infolge der Plastizität der einzelnen T-Zell-Subpopulationen untereinander möglicherweise ein anderer Phänotyp entstanden sein könnte. Um dies zu evaluieren, folgte die Messung von IFN- γ und IL-17A, deren Expression für T_H1- bzw. T_H17-Zellen typisch ist. Dazu wurden entsprechend dem beschriebenen Prozedere T_{regs} generiert, mit steigenden Valproat Konzentrationen behandelt und für 3 Tage kultiviert. Nach intrazellulärer Färbung mit fluoreszenzgekoppelten AK gegen IFN- γ und IL-17A erfolgte die durchflusszytometrische Analyse.

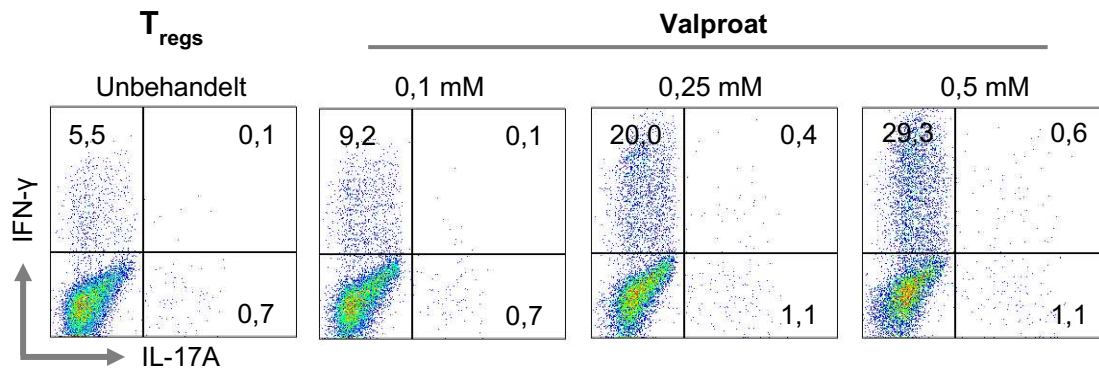


Abbildung 11 – Behandlung mit Valproat führt zu einer Induktion von IFN- γ in T_{regs}

Regulatorische T-Zellen wurden durch Polarisierung von murinen $CD4^+$ T-Zellen durch Zugabe von TGF- β 1 und IL-2 generiert, mit steigenden Valproat Konzentrationen behandelt und für 3 Tage kultiviert. Nach intrazellulärer Färbung auf IFN- γ und IL-17A erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

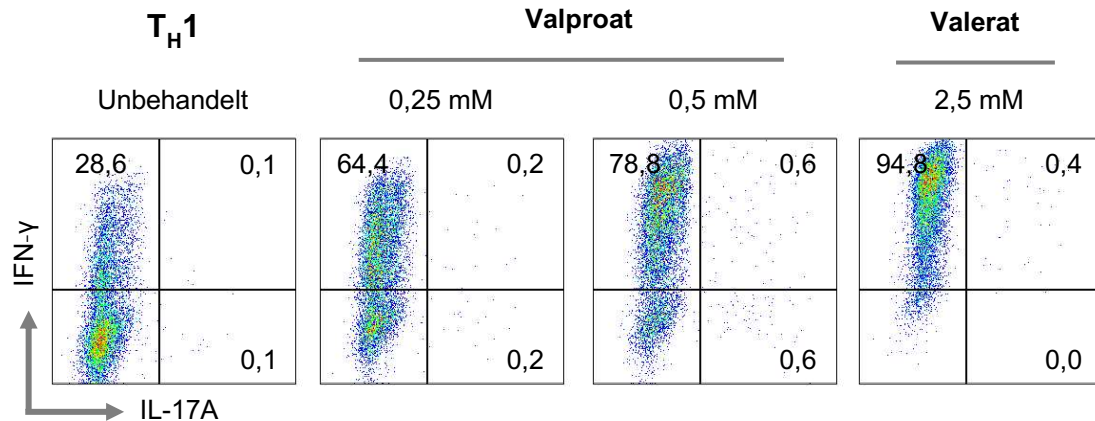
Die Daten legen eine signifikante, dosisabhängige Induktion von IFN- γ durch Valproat nahe. Dabei wurde die IFN- γ^+ -Population von im Mittel 5% (in der unbehandelten Gruppe) auf ca. 30% (bei Behandlung mit 0,5 mM Valproat) expandiert (Abb. 11). Dies könnte ein Hinweis auf die Plastizität der T_{regs} hin zu $T_{\text{H}1}$ -Zellen sein, oder aber Ausdruck von einer Expansion der ursprünglichen geringeren IFN- γ -Fraktion. Die Expression des Zytokins IL-17A, welches typischerweise von $T_{\text{H}17}$ -Zellen exprimiert wird, wurde durch die Behandlung mit Valproat nicht signifikant beeinflusst.

5.4 Die IFN- γ Expression in $T_{\text{H}1}$ -Zellen wird durch Valproat induziert

Unter T_{reg} induzierenden Bedingungen konnte eine starke Induktion der Expression von IFN- γ infolge der Behandlung mit Valproat beobachtet werden. IFN- γ weist immunstimulatorische, antivirale sowie antitumorale Eigenschaften auf und gilt als charakteristisches Effektormolekül unter anderem von $T_{\text{H}1}$ -Zellen (Chaplin, 2010; Kak et al., 2018; Ling Ni & Lu, 2018). Aus diesem Grunde sollte genauer beleuchtet werden, ob Valproat auch unter $T_{\text{H}1}$ Bedingungen auf IFN- γ induzierend wirkt. Dazu wurden wiederum aus murinen Lymphknoten und Milzen $CD4^+$ T-Zellen aufgereinigt. Diese wurden in verschiedenen Nährmedien für drei Tage kultiviert. Die Nährmedien enthielten neben dem zur $T_{\text{H}1}$ -Differenzierung benötigten IL-12 weitere zur Aktivierung und Proliferation erforderliche Zytokine und AK sowie die verschiedenen Konzentrationen von Valproat und Valerat. Nach dem Ernten der Zellen erfolgte die

Restimulation mittels Ionomycin und PMA. Um die Sekretion der Effektorproteine nach extrazellulär zu verhindern, wurde Brefeldin A hinzugegeben, sodass eine intrazelluläre Färbung auf IFN- γ und IL-17A ermöglicht wurde. Nach dieser wurde die Analyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt (Abb. 12).

A



B

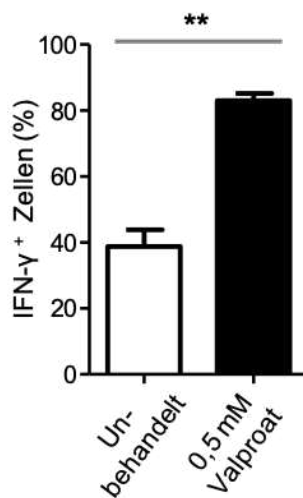


Abbildung 12 – Behandlung mit Valproat führt zu einer Induktion der IFN- γ Produktion in TH1-Zellen

A: Das repräsentative Punktdiagramm zeigt murine CD4⁺ T-Zellen, die unter TH1 induzierenden Bedingungen mit 0,25 mM und 0,5 mM Valproat für drei Tage kultiviert wurden, geerntet, restimuliert und nach Färbung mit α -IFN- γ -AK und α -IL-17A-AK durchflusszytometrisch untersucht wurden. Zum Vergleich werden die unbehandelte Kontrolle sowie mit 2,5 mM Valerat behandelte TH1-Zellen dargestellt. **B:** Das Balkendiagramm zeigt die IFN- γ ⁺ T-Zellfrequenz nach Zugabe von 0,5 mM Valproat und bei unbehandelten Zellen aus drei unabhängigen Experimenten (Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm SEM. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle: ** p = 0,001 - 0,01).

Wie Abbildung 12 zu entnehmen ist, führte die Behandlung mit Valproat auch bei T_H1-Zellen dosisabhängig zu einer Steigerung der Expression von IFN- γ . Ähnlich wie bei der Reduktion der Foxp3⁺-T_{reg}-Frequenz wies Valproat auch auf die Induktion der Expression von IFN- γ in T_H1-Zellen eine ähnliche Potenz wie Valerat auf.

5.5 Valproat vermittelt eine Induktion von IFN- γ und eine Suppression zellspezifischer Zytokine in T_H17-Zellen

Unsere Daten illustrieren, dass es bei verschiedenen T-Zellsubpopulationen durch die Behandlung mit Valproat immer wieder zu einer Induktion von IFN- γ kommt. Folglich sollte untersucht werden, ob auch T_H17-Zellen, eine weitere Subklasse, die bei der Bekämpfung extrazellulärer Erreger, bei Autoimmunität und bei Tumoren eine entscheidende Rolle spielt, zu einer vermehrten IFN- γ Expression angeregt werden können und ob auch die Expression des charakteristischen Effektormolüls IL-17A beeinflusst wird.

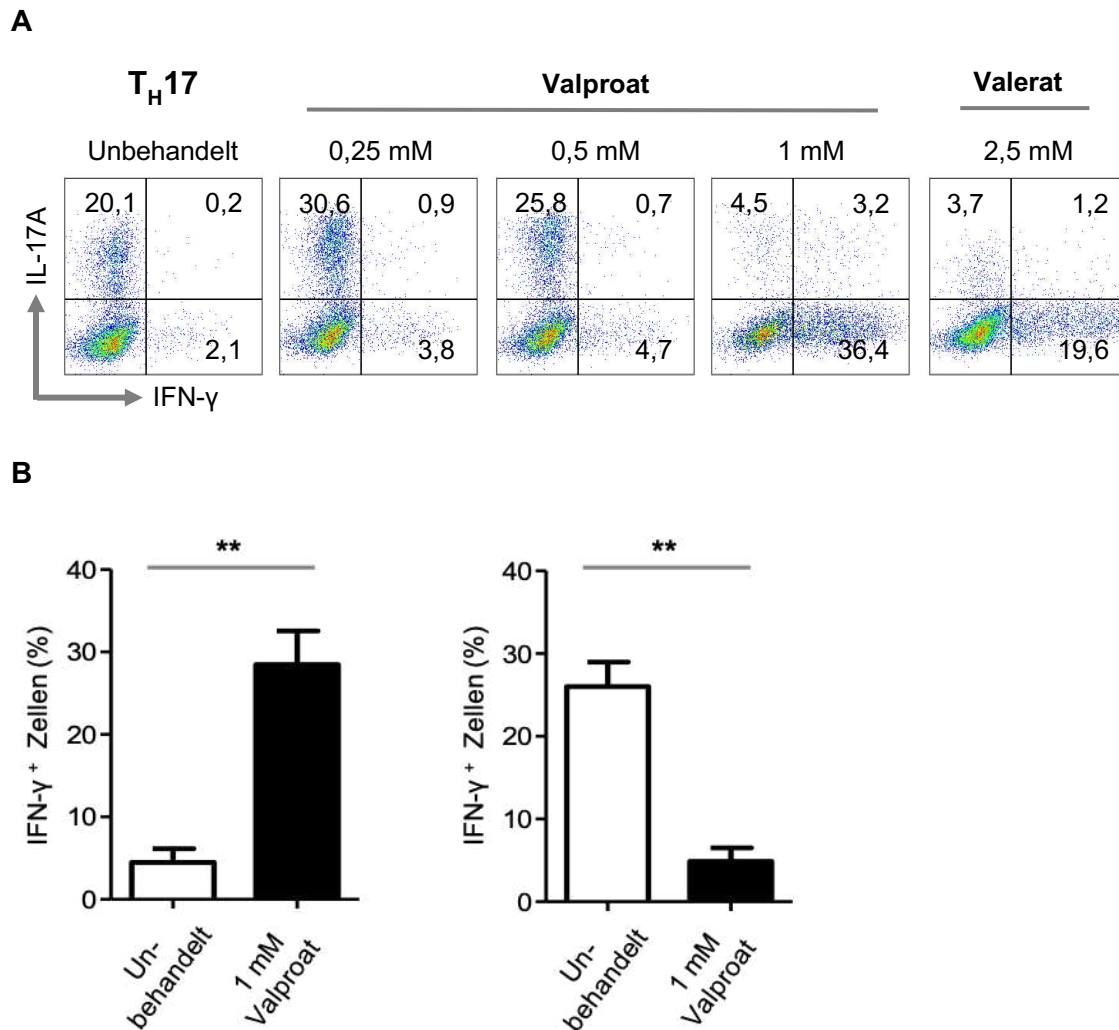


Abbildung 13 – Valproat induziert IFN- γ und supprimiert zellspezifische Zytokine in T_H17 -Zellen

A: Das repräsentative Punktdiagramm zeigt murine $CD4^+$ T-Zellen, die unter T_H17 induzierenden Bedingungen mit verschiedenen Valproatkonzentrationen für drei Tage kultiviert wurden und bei denen anschließend die Frequenz von IFN- γ und IL-17A nach intrazellulärer Färbung durchflusszytometrisch bestimmt wurde. Zum Vergleich werden die unbehandelte Kontrolle sowie mit 2,5 mM Valerat behandelte T_H17 -Zellen dargestellt. **B:** Die Balkendiagramme illustrieren die Frequenz von IFN- γ bzw. IL-17A produzierenden T-Zellen nach Behandlung mit 1 mM Valproat im Vergleich zu unbehandelten Zellen aus drei unabhängigen Experimenten (Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm SEM. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle: ** $p = 0,001 - 0,01$, * $p = 0,01 - 0,05$).

Niedrige Valproatkonzentrationen (0,25 – 0,5 mM) induzierten einen leichten Anstieg der IL-17A $^+$ -Zellen, wobei sich bei höheren Dosierungen ein gegenteiliger Effekt zeigte. Die Behandlung mit 1 mM oder mehr Valproat bewirkte eine Reduktion der IL-17A $^+$ -Zellen auf unter 10% (Abb. 13.A und B). Wie bereits bei T_{regs} und T_H1 -Zellen

beobachtet, führte Valproat dosisabhängig zu einer Hochregulation der IFN- γ exprimierenden Zellen. Zusammenfassend vermittelt die SCFA Valproat nicht nur die Induktion von IFN- γ in T_H17-Zellen, sondern auch die Suppression des zellspezifischen Zytokins IL-17A. Ähnliche Effekte konnten auch für die SCFA Valerat beobachtet werden.

5.6 Valproat wirkt auf CD8⁺ T-Zellen als HDAC-Inhibitor

Wie in den bereits beschriebenen Untersuchungen verifiziert, wirkt Valproat auf CD4⁺ T-Zellen als HDAC-Inhibitor. Um dies auch für CD8⁺ T-Zellen zu evaluieren, wurde ein entsprechender HDAC-Aktivitätsassay unter Verwendung von Valerat, Valproat sowie TSA durchgeführt (vgl. Methoden 4.2.2).

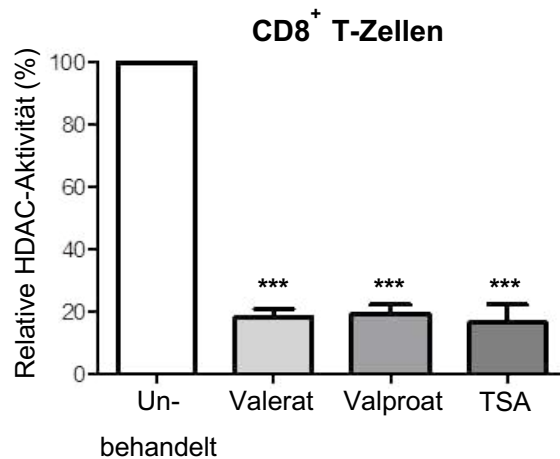


Abbildung 14 – Inhibition der HDAC-Aktivität durch Valproat und Valerat in CD8⁺ T-Zellen
Relative HDAC-Aktivität von Valerat, Valproat (je 5 mM) und TSA (500 nM). Die HDAC-Aktivität in murinen CD8⁺ Zelllysaten wurde mit einem Fluoreszenz-basierten HDAC-Aktivitätsassay relativ zu einer unbehandelten Kontrolle (UK) gemessen. TSA diente als Positivkontrolle. Es werden gepoolte Daten aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt (Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert ± SEM. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle: *** p < 0,001).

Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass Valproat auch in der Lage war, eine HDAC-Inhibition auf CD8⁺ T-Zellen zu bewirken. Beide SCFAs übten – ähnlich wie in den CD4⁺ T-Zellen - eine etwa 80%-ige Reduktion der HDAC-Aktivität aus. Diese Daten eröffneten die Frage, ob Valproat dementsprechend auch auf verschiedene CD8⁺ T-Zellsubtypen einen modulierenden Einfluss hat, der durch seine HDAC-inhibitorischen Fähigkeiten vermittelt werden könnte.

5.7 Valproat verstärkt die zytotoxischen Fähigkeiten von CTL

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) sind essentiell in die Bekämpfung virusinfizierter und neoplastischer Zellen involviert und gelten als zentrale Vermittler der antineoplastischen Fähigkeiten des Immunsystems (Chaplin, 2010). Dies gelingt unter anderem durch die Apoptoseinduktion in infizierten oder entarteten Zellen durch das Effektorprotein Granzym B (Cullen et al., 2010).

Die antineoplastischen Wirkungen Valproats konnten zum einen auf die Hemmung der Proliferation und Förderung der Apoptose entarteter Zellen zurückgeführt werden (Duenas-Gonzalez et al., 2008; Kostrouchova et al., 2007). Zum anderen könnte ein weiterer Mechanismus auch die Verstärkung der zytotoxischen Fähigkeiten von CTLs durch Valproat vermittelte HDAC-Inhibition sein. So könnten Tumorzellen durch effektivere CTLs bekämpft werden – als abgewandelte Form einer Immuntherapie.

Nachdem die Fähigkeit der HDAC-Inhibition auf CD8⁺ T-Zellen durch Valproat bewiesen wurde, sollte nun ebendiese Hypothese geprüft werden. Dazu wurden analog zu den bereits angeführten Untersuchungen zunächst CD8⁺ T-Zellen aus Milz und Lymphknoten der Mäuse aufgereinigt. Es folgte die Kultivierung dieser Zellen unter CTL-induzierenden Bedingungen mit 0,25 mM, 0,5 mM und 1 mM Valproat sowie 2,5 mM Valerat für 3 Tage. Anschließend wurde nach Restimulation der T-Zellen und intrazellulärer Färbung mit fluoreszenzgekoppelten α -IFN- γ -AK und α -IL-17A-AK eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt (Abb. 15.A). Außerdem wurde für die quantitative Evaluation der IFN- γ Produktion der CTL mit den Überständen der Zellkulturen ein IFN- γ ELISA nach Herstellerangaben durchgeführt (Abb. 15.C). Um eine Änderung in der Zytotoxizität der Zellen weitergehend zu ermitteln, wurde exemplarisch auch auf Granzym B gefärbt und dies durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 16).

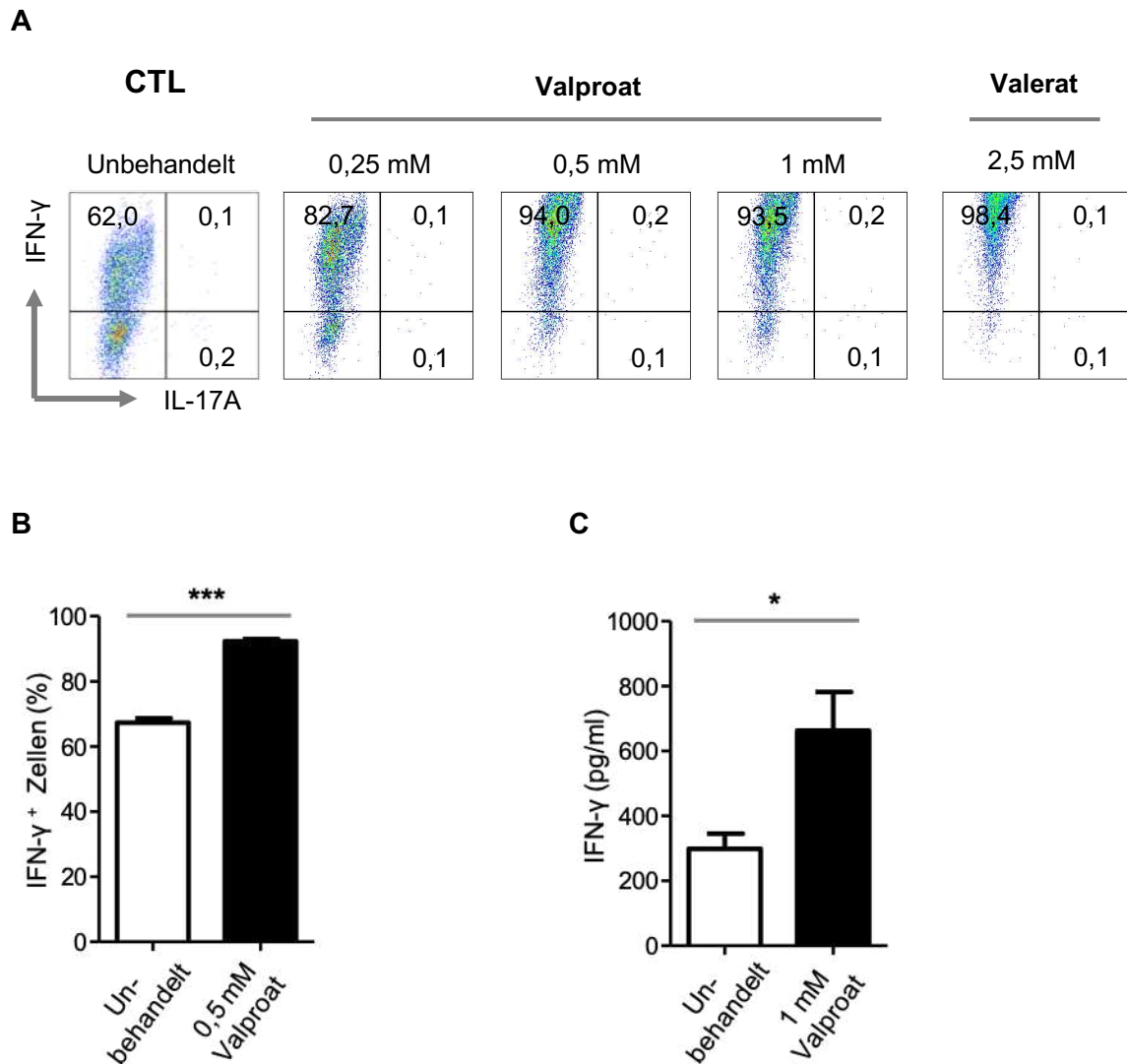


Abbildung 15 – Behandlung mit Valproat führt zu einer Induktion von IFN- γ in CTLs

Murine CD8⁺ T-Zellen wurden unter CTL induzierenden Konditionen mit Valproat in verschiedenen Konzentrationen für 3 Tage kultiviert. Zum Vergleich werden eine unbehandelte Kontrolle sowie eine mit 2,5 mM Valerat behandelte Probe gezeigt. **A:** Es folgte die intrazelluläre Färbung auf IFN- γ und IL-17A und die durchflusszytometrische Analyse. Gezeigt wird ein für 3 unabhängige Experimente repräsentatives Punktdiagramm. **B:** Die Balkendiagramme illustrieren die Frequenz von IFN- γ produzierenden CTLs nach Behandlung mit 0,5 mM Valproat im Vergleich zu unbehandelten Zellen aus drei unabhängigen Experimenten. **C:** Die Überstände aus der Zellkultur wurden zur Durchführung eines IFN- γ ELISAs für die Quantifizierung der IFN- γ Produktion angewendet (vgl. Methoden 4.2.1). Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle: *** $p < 0,001$, * $p = 0,01 - 0,05$.

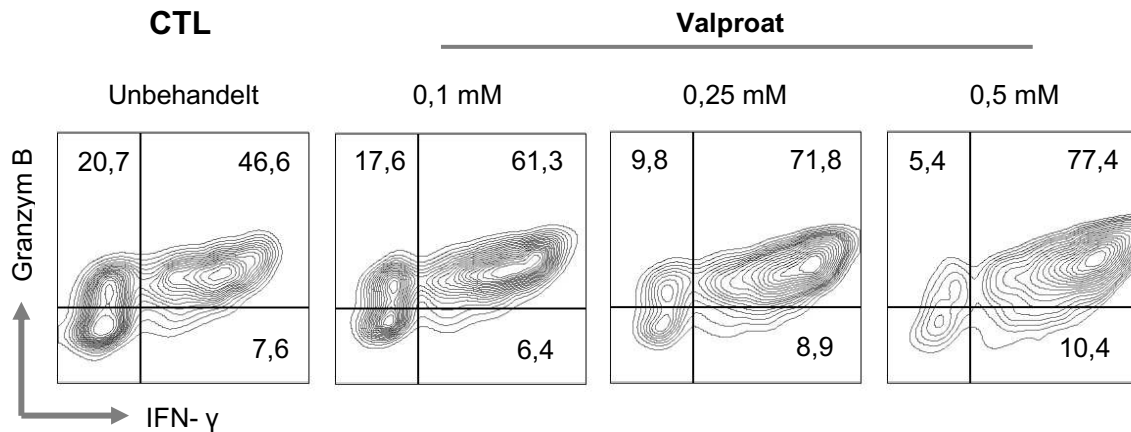


Abbildung 16 – Valproat verstärkt die zytotoxischen Fähigkeiten von CTL

Granzym B als ein von CTL produziertem zytotoxischem Effektorprotein wurde intrazellulär angefärbt, um Hinweise über den Effekt von Valproat auf die zytotoxische Aktivität der CTL zu erlangen. Die Granzym B exprimierenden Zellen auf der Y-Achse sind gegen IFN- γ ⁺-Zellen auf der X-Achse aufgetragen und zeigen repräsentativ das Ergebnis zweier unabhängiger Versuche.

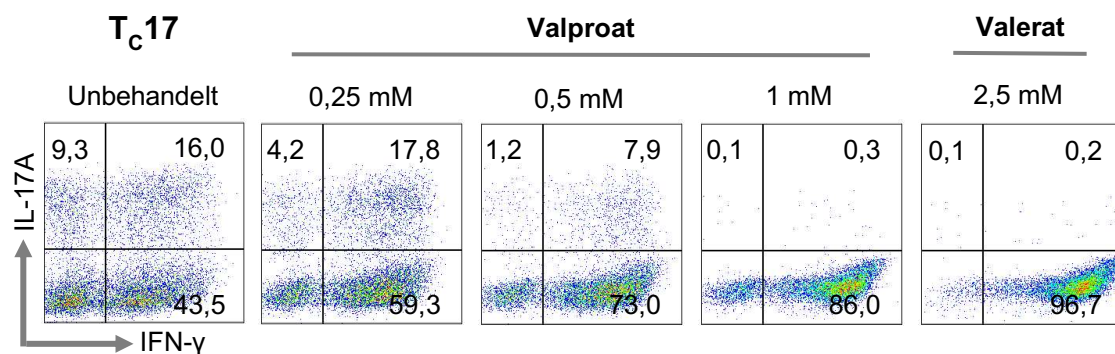
Eine konzentrationsabhängige Steigerung der IFN- γ positiven CTLs war nicht nur durchflusszytometrisch zu verzeichnen, sondern auch auf Proteinebene mittels ELISA nachvollziehbar. Die IFN- γ Produktion der Zellen wurde durch 1 mM Valproat auf mehr als das Doppelte angeregt (Abb. 15.C). Valerat führte ebenfalls zu einer erhöhten Frequenz der IFN- γ ⁺-CTL. In Abbildung 16 werden im rechten oberen Quadranten Granzym B⁺IFN- γ ⁺ zytotoxische T-Zellen gezeigt. Abhängig von der zugegebenen Valproatkonzentration wurde die Frequenz der Granzym B⁺IFN- γ ⁺-CTL signifikant von 47% auf 77% gesteigert. Zusammenfassend zeigte dies, dass Valproat die zytotoxischen Fähigkeiten von CTL durch die Induktion der IFN- γ Produktion sowie der Granzym B⁺ Expression potenziell verstärken konnte.

5.8 Valproat vermittelt eine Induktion von IFN- γ und eine Suppression zellspezifischer Zytokine in T_C17-Zellen

T_C17-Zellen stellen eine erst vor wenigen Jahren neu charakterisierte Subgruppe der CD8⁺ T-Lymphozyten dar, denen ähnlich wie T_H17-Zellen eine proinflammatorische Rolle bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen zugeschrieben wird (Menon et al., 2014; Saxena et al., 2012; Tzartos et al., 2008). Wie auch bei T_H17-Zellen gilt IL-17A für T_C17-Zellen als wichtiges Effektorprotein. Zudem verfügen T_C17-Zellen über ein zytotoxisches Potenzial, welches im Gegensatz zu CTLs ein geringes Ausmaß

erreicht, jedoch auch das im Gegensatz zu T_H17 -Zellen höhere Basislevel an IFN- γ erklärt (Huber et al., 2009). Auch für diese Zellen sollte der Einfluss von Valproat geprüft werden, wozu wiederum mittels der bereits beschriebenen Technik murine $CD8^+$ T-Zellen zu T_C17 -Zellen differenziert und mit 0,25 mM, 0,5 mM und 1 mM Valproat und zum Vergleich 2,5 mM Valerat behandelt wurden. Nach dem Ernten und der Restimulation der Zellen folgte die Färbung auf IL-17A und IFN- γ und die durchflusszytometrische Analyse.

A



B

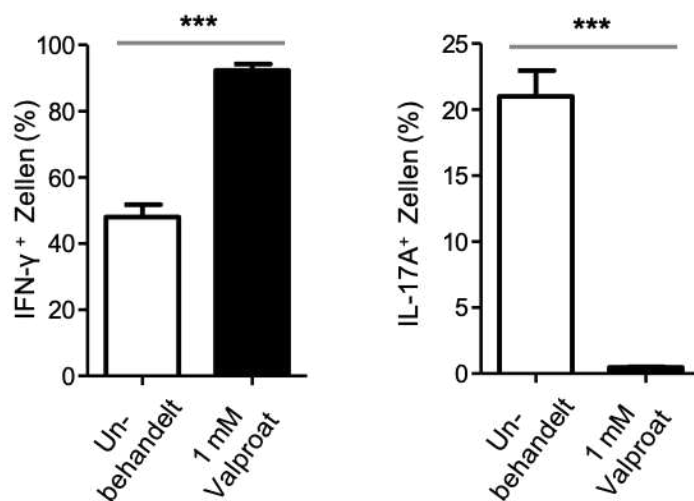


Abbildung 17 – Valproat induziert IFN- γ und supprimiert zellspezifische Zytokine in T_C17 -Zellen

A: Das repräsentative Punktdiagramm zeigt $CD8^+$ T-Zellen, die unter Zugabe von TGF- β 1 und IL-6 zu T_C17 -Zellen differenziert und mit ansteigenden Valproatkonzentrationen für drei Tage kultiviert wurden, im Vergleich zu der Kultivierung mit 2,5 mM Valerat. **B:** Die Balkendiagramme zeigen die Frequenz von IFN- γ bzw. IL-17A produzierenden T_C17 -Zellen, die mit 1 mM Valproat kultiviert wurden, im Vergleich zu der UK aus drei unabhängigen Experimenten (Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm SEM. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle: *** $p < 0,001$).

Valproat führte bei T_C17-Zellen zu einer nahezu vollständigen Unterdrückung ihres charakteristischen Zytokins IL-17A. Gleichzeitig zeigte sich eine stark signifikante Zunahme der IFN- γ Expression der Zellen, genauer gesagt beinahe eine Verdopplung der IFN- γ ⁺ T-Zellen (Abb. 17). Die gleichen Phänomene ließen sich wiederum bei Valerat erkennen. Die Behandlung der Zellen mit Valerat führte sogar zu einer noch stärkeren IFN- γ Induktion, wobei zu beachten ist, dass hier eine höhere Dosis (2,5 mM) als bei Valproat (max. 1 mM) eingesetzt wurde (Abb. 17.A).

Insgesamt ließ sich ein vergleichbarer Effekt auf T_C17-Zellen wie auch auf T_H17-Zellen durch Valproat und Valerat feststellen. Bei beiden Subtypen trat eine Suppression des charakteristischen IL-17A Zytokins bei gleichzeitiger Induktion von IFN- γ ein.

6 Diskussion

Die Hauptmetabolite des intestinalen Mikrobioms, die SCFAs, haben einen direkten Einfluss auf das Immunsystem. Eine Dysregulation dieses Systems kann zu Tumoren und Autoimmunerkrankungen führen. Auf der Grundlage dieser Kenntnisse wurden neue Therapieansätze im Sinne einer Modulation des Immunsystems mittels verschiedener Techniken und Substanzen, beispielsweise im Rahmen einer zellulären Immuntherapie, entworfen. Unsere Forschungsgruppe hat die Wirkung verschiedener SCFAs auf Inflammation und Karzinogenese intensiv untersucht. Dabei wurde der immunmodulatorische Einfluss v.a. von Butyrat und Valerat insbesondere auf T-Zellen, die als zentraler Pfeiler der adaptiven Immunantwort gelten und entscheidend in Anti-Tumor-Antworten involviert sind, deutlich. Dies führte uns zu der Frage, ob auch Valproat ähnlich immunmodulierend wirkt. Diese verzweigt kurzkettige Fettsäure wird als synthetisches Derivat der natürlich im Darm vorkommenden SCFA Valerat seit mehr als 50 Jahren als Antikonvulsivum eingesetzt und ist das am häufigsten verschriebene antiepileptische Pharmakon in Deutschland.

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Um diese Frage zu beantworten, wurde der direkte Einfluss Valproats auf einzelne Subtypen von murinen CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten systematisch *in vitro* untersucht. Dabei wurde zunächst evaluiert, ob Valproat nicht nur bei Tumorzellen, sondern auch bei körpereigenen Immunzellen konzentrationsabhängig Apoptose induziert, was sich mittels einer Annexin V-Färbung anhand eines exemplarischen Beispiels an T_H17- und T_C17-Zellen bestätigen ließ. Gleichzeitig erlaubte dies die Definierung des weiter angewendeten Dosierungsbereichs für Valproat. Weiterhin wurde mit Hilfe eines fluorometrischen HDAC-Aktivitätsassays validiert, dass Valproat die HDAC-Aktivität in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen signifikant unterdrückt. Möglicherweise durch diese HDAC-Inhibition erklärbar, konnte in den weiterführenden Untersuchungen gezeigt werden, dass in allen betrachteten T-Zell-Subpopulationen – T_{regs}, T_H1-Zellen, T_H17-Zellen, CTLs und T_C17-Zellen - eine Induktion des immunstimulierenden Zytokins IFN-γ durch die SCFAs Valproat und Valerat vermittelt wurde. Gleichzeitig illustrierten unsere Daten, dass die charakteristischen Effektorproteine bzw. Transkriptionsfaktoren von T_H17- und T_C17-Zellen bzw. T_{regs} durch Valproat und Valerat supprimiert wurden. Diese Ergebnisse zusammengenommen könnten auf eine potenzielle Wirksamkeit und

Anwendbarkeit Valproats als Immuntherapeutikum hinweisen, und sollen im Folgenden diskutiert werden.

6.2 Valproat vermittelt auch bei Immunzellen eine dosisabhängige Apoptose-Induktion

Eine große Datenbasis unterstützt die Annahme, dass Valproat in der Lage ist, dosisabhängig proapoptotisch auf Zellen zu wirken. Bisherige Studien untersuchten dabei vor allem den Einfluss auf Tumorzellen (Chateauvieux et al., 2010). Ihnen zufolge können die umfassend beschriebenen und charakterisierten antineoplastischen Eigenschaften Valproats u.a. auf die Fähigkeit der Apoptoseinduktion in Tumorzellen zurückgeführt werden (Kostrouchova et al., 2007). Vermittelt wird dies wahrscheinlich durch die VPS-bedingte Inhibition bestimmter Histondeacetylasen, welche neben Histonen auch weitere nicht histonische Ziele dynamisch deacetylieren können. Werden diese HDACs gehemmt, kommt es dementsprechend zu einer vermehrten Acetylierung und damit Chromatindekondensation, was die Erreichbarkeit bestimmter DNA-Abschnitte für bspw. Transkriptionsfaktoren oder auch Chemotherapeutika erhöht (Dawson & Kouzarides, 2012; Karp et al., 2015). Tumorzellen sind dabei anfälliger für eine HDAC-Inhibition (Dawson & Kouzarides, 2012), weswegen nicht *per se* von einer gleichen Wirkung auf normale Körperzellen ausgegangen werden konnte und der Einfluss auf die Apoptose von T-Zellen durch Valproat untersucht werden sollte.

Wir konnten feststellen, dass Valproat neben Tumorzellen auch auf körpereigene T-Zellen, und zwar auf alle von uns untersuchten T-Zellsubtypen, proapoptotisch wirkt. Dabei fiel eine unterschiedliche Empfindlichkeit der verschiedenen T-Zellsubtypen auf. Regulatorische T-Zellen unterlagen bei der Behandlung mit bestimmten Valproatkonzentrationen in einem größeren Ausmaß einer Apoptose als T_H17- und T_C17-Zellen sowie CTLs. Im Bezug auf die Apoptose von Immunzellen zeigte Valproat ähnliche Effekte wie die SCFAs Propionat (C3) und Butyrat (C4). Bei diesen ist bekannt, dass sie mittels Induktion der Caspasen 8 und 9 auf Neutrophile apoptoseauslösend wirken können (Aoyama et al., 2010). Außerdem ist Butyrat in der Lage, durch Inhibition von HDAC1, die an den Fas-Promotor gebunden ist, eine Hyperacetylierung dieses Promotors vermitteln. Dies resultiert in einer Fas-Hochregulation und kann so eine Apoptose in T-Zellen induzieren (Zimmerman et al., 2012). Es lässt sich mutmaßen, dass Valproat auf ebendiese Art mittels HDAC1-Inhibition wirken könnte. Valerat hingegen scheint einen verminderten Einfluss auf die

Apoptose von Immunzellen, bspw. von regulatorischen B-Zellen, zu haben (Luu et al., 2019). In unseren Untersuchungen konnte dies auch für die verschiedenen T-Zellsubtypen nachgewiesen werden.

Der Valproat-vermittelte Einfluss auf die Apoptose einiger T-Zelllinien ist für bestimmte Versuchsumgebungen bereits beschrieben. Auf der einen Seite wurde dabei in einem EAE-Modell beobachtet, dass aus Milzen und Blut entnommene CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten einer Caspase-8/-3-vermittelten Apoptose unterlagen, was zu einer Abmilderung der EAE-Symptomatik führte (Lv et al., 2012). In einer anderen Studie von Pietruczuk (2018) zeigte sich, dass T-Lymphozyten von Patienten mit Bipolarer Störung, die mit Valproat behandelt wurden, signifikant anfälliger für Apoptose waren als die T-Zellen gesunder Personen, wobei die Proliferationsfähigkeit nach *in vitro* Zugabe therapeutischer VPS Dosen unverändert blieb. Zusätzlich unterlagen aber auch die T-Lymphozyten der gesunden Kontrollgruppe nach *in vitro* Behandlung mit hohen VPS Dosierungen (von 250 µg/ml, was etwa 1,7 mM entspricht) einer erhöhten Apoptose. Auf der anderen Seite wurde in weiteren Arbeiten ein zytoprotektiver und antiapoptotischer Effekt von Valproat postuliert. So führte interessanterweise die Behandlung mit 1 mM VPS in Endothelzellen zu einer verminderten Apoptose, was über eine Aktivierungsinduktion der extrazellulären signalregulierten Kinase (ERK)1/2 erklärt wurde (Michaelis et al., 2006). Li et al. (2013) zeigten, dass VPS keinen Effekt auf die Viabilität oder Aktivierung von CD8⁺ T-Lymphozyten hatte, die viralen Peptiden ausgesetzt waren.

Zusammenfassend lässt sich in Anbetracht der kontroversen Literatur feststellen, dass Valproat in Abhängigkeit vom Zelltyp und der immunologischen Umgebung sowohl zytoprotektive als auch zytotoxische Effekte entfalten kann. Die Arbeitsgruppe um Chen (2011) konnte dies zudem in einen Kontext mit verschiedenen Valproatdosierungen setzen. Sie postulierte, dass VPS eine dosisabhängige, biphasische Wirkung auf die Apoptose aktivierter Lymphozyten aufweist. In niedrigen Dosierungen (< 1,1 mM) reduzierte Valproat in ihren Untersuchungen den aktivierungsinduzierten apoptotischen Zelltod, während es in hohen Dosen (≥ 3,3 mM) umgekehrt stark apoptotisch wirkte. Dies erklärte sie durch eine differentielle Modulation mehrerer Apoptose-bezogener Signalwege.

6.3 CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen werden durch Valproat über eine HDAC-Inhibition beeinflusst

Vor 20 Jahren wurde erstmalig die HDAC-inhibitorische Wirkung von Valproat beschrieben (Phiel et al., 2001). Die aktuelle Literaturlage bewertet Valproat vor allem als Inhibitor der HDAC Klassen I und IIa (Sixto-López et al., 2020). Seitdem wurde dieses Medikament in diversen Studien auf potenzielle, durch HDAC-Inhibition vermittelte positive Fähigkeiten im Bezug auf die Bekämpfung von Tumoren und Autoimmun- bzw. entzündlichen Erkrankungen untersucht. Dabei wurden viele Effekte identifiziert, unter anderem die durch epigenetische Modulation vermittelte Wirkung auf T-Zellen, die in dieser Arbeit differenziert in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zelllysaten untersucht werden sollte.

Es konnte im Rahmen dieser Dissertation gezeigt werden, dass Valproat in beiden Untergruppen die HDAC-Aktivität stark vermindert. Dabei war kein signifikanter Unterschied in der Inhibitionspotenz von Valproat und Valerat zu sehen. In verschiedenen Studien wurde der gleiche Effekt bereits für weitere SCFAs wie Propionat (C3), Butyrat (C4) und Valerat (C5) beschrieben (Arpaia et al., 2013; Haberland et al., 2009; Hinnebusch, BF et al., 2002; Luu et al., 2019).

Es ist bekannt, dass SCFAs verschiedene Zellen wie Kolonozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, DCs und T-Zellen durch HDAC-Inhibition beeinflussen können (Park et al., 2015). Die Wirkung von Butyrat und Valerat auf Immunzellen scheint jedoch neben der HDAC-Inhibition durch weitere, metabolische Wege vermittelt zu werden. Dazu zählen neben der Induktion des mTOR Signalweges und der Abhängigkeit von einer aeroben Glykolyse für die Produktion bestimmter Zytokine wie IFN- γ auch die Modulation bestimmter SCFA-spezifischer, G-proteingekoppelter Rezeptoren (GPR41 und GPR43). Diese werden selektiv u.a. auf der Oberfläche von T_{regs} im Kolon und auf Kolonozyten exprimiert und lösen Signalwege aus, die die Aktivierung, Differenzierung und/oder Proliferation bestimmter Zellen beeinflussen (Luu et al., 2018, 2019; Smith et al., 2013). Andere T-Zellsubtypen jedoch exprimieren GPRs in nicht signifikanter Höhe auf ihrer Oberfläche, weswegen die Beeinflussung dieser Zellen hauptsächlich auf die HDAC-Inhibition zurückgeführt wird (Park et al., 2015). Unsere Arbeitsgruppe konnte dies in einer früheren Studie bestätigen und verifizieren, dass die Butyrat-medierte Regulation von CD8⁺ T-Lymphozyten unabhängig von GPR41 und 43 geschieht (Luu et al., 2018).

Auch Valproat scheint in der Lage zu sein, Immunzellen über verschiedene zelluläre und molekulare Wege, beispielsweise über eine Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR Wegs oder mittels weiterer epigenetischer Veränderungen, zu modulieren (Gurpur et al., 2009; Soria-Castro et al., 2019). Aus diesen Gründen war es wichtig zu überprüfen, ob die Wirkung Valproats auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auch oder vor allem auf eine HDAC-Inhibition zurückzuführen ist. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die Valproat-vermittelte HDAC-Inhibition allgemein modulatorisch auf Immunzellen wirkt und kann somit die in dieser Arbeit untersuchten und beobachteten Effekte auf Immunzellen grundlegend erklären.

6.4 Valproat kann die Generierung von Foxp3⁺ T_{regs} *in vitro* nicht fördern, vermittelt jedoch die Induktion von IFN- γ in T_{regs}

T_{regs}, die den spezifischen Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimieren, gelten als zentrale Regulatoren von Immunantworten und Selbsttoleranz. Durch verschiedene Mechanismen sind sie in der Lage, vor überschießenden Immunreaktionen zu schützen (Noack & Miossec, 2014). Tumore können diese immunsupprimierenden Funktionen der T_{regs} ausnutzen, indem diese Zellen in der Tumormikroumgebung rekrutiert und differenziert werden, und so eine Herabsetzung der Tumorummunogenität vermitteln (C. Li et al., 2020). Im Darm sind T_{regs} für die Immunhomöostase beispielsweise durch Unterdrückung einer Entzündungsreaktion auf Nahrungsantigene essentiell. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass manche SCFAs wie Butyrat und Propionat die Generierung von peripheren regulatorischen T-Zellen (pT_{regs}) mittels Induktion epigenetischer Modifikationen am Foxp3-Locus fördern können (Arpaia et al., 2013; Furusawa et al., 2013).

Überraschenderweise konnte Valerat (C5) im Gegensatz zu Propionat und Butyrat *in vitro* nicht die Generierung der Foxp3⁺ T_{regs} vermitteln (Luu et al., 2019). In den von uns durchgeführten Experimenten ließ sich dieses bestätigen und auch für das strukturell ähnliche Valproat beobachten. Vielmehr kam es sogar zu einer Reduktion der Frequenz von Foxp3⁺ T_{regs}. Könnte Valproat auch im TME eine solche Reduktion der T_{regs} vermitteln, so wäre dies im Hinblick auf eine antineoplastische Therapie bedeutend.

Long et. al (2015) konnten im Einklang damit Ähnliches in einem murinen MHC-Mismatch Knochenmark-Transplantations-Modell, anhand dessen die Graft-versus-

Host-Disease erforscht werden kann, nachvollziehen. Sie beobachteten, dass die i.p. Verabreichung von VPS an Mäuse nach Transplantation zu keiner Induktion von T_{regs} führte, sondern die Frequenz der Foxp3⁺ Zellen sowie die Expression der Foxp3 mRNA in T-Zellen aus ihren Milzen im Vergleich zu der Kontrollgruppe leicht erniedrigt waren. Daten von Park et al. (2015) legten dar, dass SCFAs zwar die IL-10 Produktion erhöhen konnten, aber nicht zwangsläufig die Foxp3 Expression in T-Zellen, sodass es *in vitro* bei hohen T-Zell-Aktivierungskonditionen sogar zu einer Suppression der Foxp3⁺ T_{regs} kam. Im Kontrast dazu weisen andere Studien in bestimmten Kontexten jedoch eher auf eine VPS-vermittelte T_{reg}-Induktion hin, welche mit einer Hyperacetylierung des Foxp3 Locus begründet wurde und über eine Unterdrückung der endogenen IL-2 Produktion und eine Hochregulation der IL-10 Produktion mit der Erhöhung der Suppressor-Aktivität dieser Zellen assoziiert war (Akimova et al., 2012; Fayyad-Kazan et al., 2010; Saouaf et al., 2009; Tao et al., 2007).

Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der Ergebnisse könnte die starke Abhängigkeit der Effekte von bestimmten immunologischen Konstellationen und Aktivierungsstimuli sein, die bereits in mehreren Studien thematisiert wurde (Soria-Castro et al., 2019). Möglicherweise differierten in dem von uns eingesetzten Modell bestimmte Zytokine oder Faktoren, die in anderen Versuchskontexten die Proliferation und Verstärkung der Foxp3 Expression vermittelten. Beispielsweise könnte ein solcher Faktor der Zugabezeitpunkt Valproats auf die Zellen sein, der bei uns bei Tag 0, in anderen Settings bei Tag 3 lag (Lv et al., 2012), oder das Fehlen von Substraten, die VPS für HDAC unabhängige metabolische Wirkwege benötigen könnte. Zudem könnten möglicherweise weitere in der Zellkultur vorhandene Zellen (z.B. APCs) zu einer Beeinflussung der T_{regs} geführt haben. Ein weiterer Grund für die diskrepanten Ergebnisse könnte darin liegen, dass wir das Salz "Natrium Valproat" verwendeten, welches die Hauptsubstanz der am häufigsten vertriebenen Epilepsiemedikamente darstellt, während in manchen Studien "Valproinsäure" zum Einsatz kam.

Abhängig von verschiedenen Faktoren, ist der Phänotyp der einzelnen T-Zellsubtypen veränderlich. So kann ein gewisses Zytokinmilieu dazu führen, dass bestimmte linienbestimmende Transkriptionsfaktoren vermehrt exprimiert werden. Ebenso können epigenetische Modulationen eine solche veränderte Transkription bedingen und die Verschiebung von einem T-Zell-Phänotyp hin zu einem anderen vermitteln (Wilson et al., 2009; Zhou et al., 2009). Es lässt sich vermuten, dass auch Valproat durch die Inhibition bestimmter Histondeacetylasen das Schicksal der Zellen in Abhängigkeit von weiteren Umgebungsfaktoren beeinflussen kann. Um die Frage zu beantworten, ob *in*

vitro durch die Behandlung mit Valproat statt des T_{reg} Phänotyps möglicherweise ein anderer Phänotyp entstanden sein könnte, wurden die Expression von IFN- γ und IL-17A untersucht. Diese sind die charakteristischen Zytokine von T_H1 - bzw. T_H17 -Zellen, deren mögliche Plastizität untereinander und reziprok zu T_{regs} bekannt ist (Lee et al., 2009). In der durchflusszytometrischen Analyse konnte eine signifikante, dosisabhängige Induktion von IFN- γ festgestellt werden, während die Frequenz von IL-17A unbeeinflusst niedrig blieb. Dies könnte mit der bereits diskutierten HDAC-inhibitorischen Aktivität von Valproat auf $CD4^+$ Zellen erklärt werden, welche diesen Effekt durch epigenetische Modifikation entsprechender Genloki (z.B. des Transkriptionsfaktors T-bet für IFN- γ) vermitteln könnte und somit eine Plastizität der T_{regs} hin zu T_H1 ähnlichen Zellen ermöglicht. Eine solche Veränderung hin zu T_H1 ähnlichen Zellen durch die Induktion von T-bet wurde von Kespol et al. (2017) bereits für T_{regs} beschrieben, die mit hohen Butyrat-Konzentrationen behandelt wurden. Eine andere Interpretation könnte von der Beobachtung abgeleitet werden, dass die unbehandelten Zellen zu etwa 5% IFN- γ produzierten, also gewissermaßen ein IFN- γ -„Hintergrundrauschen“ vorlag. Es wäre möglich, dass es zu einer Expansion dieser IFN- γ^+ Fraktion kam, die dann für die verstärkte IFN- γ Expression verantwortlich war, und weniger zu einem epigenetisch vermittelter Switch des Phänotyps der T-Zellen.

Interessant sind diese Daten besonders im Hinblick auf eine mögliche Tumor-Immuntherapie mit Valproat. So wurde erst kürzlich bekräftigt, dass eine Produktion von IFN- γ durch regulatorische T-Zellen für den Erfolg einer Immuntherapie essentiell sei. In der betreffenden Studie offenbarte sich während einer Anti-PD1-Immuntherapie eine IFN- γ -Induktion in murinen T_{regs} , wodurch eine für die Tumor-Clearance durch Anti-PD1 notwendige T_{reg} -Dysfunktion vermittelt wurde. Mäuse mit IFN- γ -defizienten T_{regs} waren in diesem Modell vollständig resistent gegen eine Anti-PD1-Immuntherapie (Gocher et al., 2020). Dies könnte darauf hinweisen, dass die Erzeugung eines Effektor-ähnlichen T_{reg} -Status, so wie er nach der Behandlung mit Valproat beobachtet werden konnte, Voraussetzung für eine effektive Anti-Tumor-Antwort sein könnte.

6.5 Induktion von IFN- γ bei verschiedenen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellsubtypen durch eine Valproat-vermittelte HDAC-Inhibition

In nachfolgenden Untersuchungen zeigte sich auch bei allen weiteren betrachteten T-Zell-Subpopulationen – T_H1 -Zellen, T_H17 -Zellen, CTL und T_C17 -Zellen - eine Induktion von IFN- γ durch die SCFA Valerat sowie Valproat.

Als Erklärung sollte ebenfalls eine durch HDAC-Inhibition vermittelte Plastizität der Zellen diskutiert werden. Es ist bekannt, dass die T-Zell-spezifische Deletion der HDAC-Klasse-I-Isoformen HDAC1 und 2 in CD4⁺ T-Zellen die Expression von Genen induziert, die für die CD8-Linie charakteristisch sind, wie Granzym B, Perforin 1 und Eomes (Boucheron et al., 2014). Dies entspricht Isoformen, für die eine Inhibition durch Valproat beschrieben ist (Sixto-López et al., 2020). Die Erklärung wird zudem durch Daten von der Arbeitsgruppe um Park (2015) unterstützt, die die Expression der charakteristischen Transkriptionsfaktoren von murinen T_H1- und T_H17-Zellen (T-bet und ROR γ t) in Folge einer Behandlung mit den SCFAs Butyrat und Propionat durchflusszytometrisch analysierte und eine Induktion dieser feststellen konnte. Für humane CD4⁺ T-Zellen wurde in einer früheren Studie festgestellt, dass Butyrat durch die Acetylierung von dem Histon H3 der Tbx21- und IFN- γ -Promotorregionen eine vermehrte Expression dieser und einen molekularen Switch vom T_H2 zum T_H1 Phänotyp vermittelte (Morinobu et al., 2004). Auch unsere Arbeitsgruppe konnte die tiefgreifende Wirkung Butyrats auf murine CD8⁺ T-Zellen auf seine HDAC-hemmende Aktivität zurückführen, indem eine Butyrat-vermittelte Erhöhung der Histon H4 Acetylierung der Promotorregionen von Tbx21 (Synonym von T-bet) und IFN- γ mittels quantitativer Chromatin Immunopräzipitations-(ChIP) Analyse nachgewiesen werden konnte (Luu et al., 2018). Auf Proteinebene zeigten Park et al. (2015), dass die Zugabe der SCFAs zu CD8⁺ T-Zellen unter CTL- bzw. T_C17-induzierenden Konditionen in einer erhöhten Expression von antiinflammatorischem IL-10, aber auch von IFN- γ bzw. IL-17 resultierte. In einem murinen Dextran-Sulfat-Natrium-induzierten *in vivo* Kolitis-Modell beschrieben Glauber et al. (2006) kontrovers zu unseren Daten eine Suppression proinflammatorischer Zytokine im Darm in Folge einer oralen VPS-Gabe.

Wieder verdeutlichen unsere Daten, dass Valproat möglicherweise eine wirksame Substanz hinsichtlich einer Immuntherapie darstellen könnte. Das Zytokin IFN- γ besitzt viele differentielle Funktionen und weist immunstimulierende, antivirale sowie insbesondere antineoplastische Eigenschaften auf (Chaplin, 2010; Kak et al., 2018; Ling Ni & Lu, 2018). Die Tumorbekämpfung mittels IFN- γ kann durch eine Erhöhung der *Immunosurveillance* erreicht werden. IFN- γ , was beispielsweise durch aktivierte CD8⁺ T-Zellen im TME sezerniert wird, ist in der Lage, natürliche Killerzellen gezielt in die Tumorumgebung zu rekrutieren, wo diese Tumorzellen ohne MHC-I Expression eliminieren können (Wendel et al., 2008). Es kann zudem, abhängig von dem Tumor-Modell, in sogenannten Bystander Tumorzellen phänotypische Veränderungen induzieren, wie die Überexprimierung von PD-L1 und MHC-I oder den Zelltod, und zwar sogar in solchen Tumorzellen, die sich durch negative Oberflächenmoleküle der

Kontrolle des Immunsystems entzogen haben. Dieser als „Antigen-Escape“ bezeichnete Prozess kann Tumorzellen unempfindlich und refraktär gegenüber einer Immuntherapie oder konventioneller Chemotherapie machen. Durch die IFN- γ -Signalwege konnte das Tumorstadium, welches von Antigen-negativen Bystander Tumorzellen ausging, über Mechanismen wie der Erhöhung der Antigenpräsentation durch Hochregulierung von MHC-I, der Induktion des Zelltodes und der Arretierung des Zellzyklus partiell bis vollständig kontrolliert werden (Hu & Krummel, 2020). Die Arbeitsgruppe um West (2013) konnte anhand von Kolonadenokarzinom- sowie Leukämie/Lymphom-Modellen zeigen, dass ein intaktes Immunsystem für die antineoplastischen Effekte von HDAC-Inhibitoren (wie Vorinostat) wichtig ist, und dass dabei insbesondere IFN- γ Signale synergistisch mit HDAC-Inhibitoren die Tumorummunogenität erhöhen können.

Gleichwohl scheint IFN- γ , abhängig von dem verwendeten Modellsystem und dem TME-Kontext, auch eine Immunevasion von Tumoren beispielsweise über die Hochregulierung der immunsuppressiven Faktoren PD-L1 und CTLA-4 erleichtern zu können. Somit könnten IFN- γ -Felder in der Tumormikroumgebung Krebszellen potenziell auf einen immunsuppressiven Zustand vorbereiten, noch bevor die T-Zellen eintreffen, was u.a. die häufigen primären und erworbenen Resistenzen gegen Immuntherapien erklären könnte (Mojic et al., 2017).

6.6 Valproat-vermittelte Suppression zellspezifischer Zytokine in T_H17- und T_C17-Zellen

Neben der Induktion von IFN- γ illustrierten unsere Daten, dass die charakteristischen Effektorproteine von T_H17- und T_C17-Zellen durch die Behandlung mit Valproat und Valerat dosisabhängig unterdrückt werden.

Für T_H17 Zellen wurde in einigen Quellen im Einklang mit unseren Daten eine Suppression von IL-17A durch SCFAs beschrieben (Glauben et al., 2014; Luu et al., 2019). Auch für Valproat konnten Jin und Guo (2016) in einem murinen viralen Myokarditis-Modell eine Reduktion der IL-17A Expression in T_H17-Zellen feststellen, was die Entzündung abmildern konnte. Im Gegensatz dazu zeigten andere Gruppen eine SCFA-vermittelte Induktion von IL-17A (Ivanov et al., 2009; Park et al., 2015). Interessanterweise konnte in unseren Versuchen bei geringen Dosierungen Valproats (bis 0,5 mM) ebenfalls ein Anstieg von IL-17A gemessen werden. Dieser war leicht,

aber signifikant und zeigte sich auch bei niedrigen Valerat Dosierungen. Erklärbar ist dies eventuell durch eine dosisabhängige, differentielle Wirkung der HDAC-Inhibitoren. Es könnte jedoch ebenfalls diskutiert werden, ob der bei höheren VPS Dosierungen beobachtete Effekt der IL-17A Suppression nicht auch auf die Valproat-vermittelte Apoptose dieser Zellen zurückzuführen ist. Hierbei kann wiederum entkräftend angeführt werden, dass Valerat, welches nicht stark apoptoseinduzierend wirkt, mit Valproat vergleichbare Effekte auf T-Zellen zeigte. Die kontroversen Daten könnten alternativ auch durch unterschiedliche Differenzierungsprotokolle erklärt werden.

Park et al. (2015) beschrieben für CD8⁺ T-Zellen eine signifikante SCFA-induzierte Expression von IL-10, IFN- γ und IL-17, wobei unsere Arbeitsgruppe (2018) einen Butyrat-vermittelten molekularen Switch von T_C17-Zellen hin zum CTL Phänotyp beobachtete. Dieser ging mit einer erhöhten Produktion von Granzym B, einer Herunterregulierung des T_C17-verwandten Transkriptionsfaktors ROR γ t und einer signifikanten Induktion der CTL-assoziierten Gene Tbx21, Eomes und Perforin 1 einher. Dieser Phänotypenwechsel konnte nun in unseren Untersuchungen mit Valproat und Valerat beispielhaft anhand der Expression des Effektorzytokins IFN- γ ebenfalls nachvollzogen werden. Durch Zugabe von 1 mM Valproat bzw. 2,5 mM Valerat wurden die zellspezifischen Zytokine der T_C17-Zellen nahezu vollständig supprimiert, wohingegen sich die IFN- γ Produktion vervielfacht hatte. Während unbehandelte T_H17-Zellen kaum IFN- γ produzieren, verfügen T_C17-Zellen über ein gewisses zytotoxisches Potenzial, was sich u.a. in einem höheren IFN- γ Basislevel widerspiegelt (Huber et al., 2009). Dieses Grundmaß an IFN- γ (etwa 40-50% der Kontroll-T_C17-Zellen exprimierten IFN- γ) könnte den phänotypischen Wandel von T_C17-Zellen hin zu CTLs vereinfachen.

Aktuell werden therapeutische Möglichkeiten erforscht, die auf die Nutzung dieses Phänotypenwechsels hin zu T_H1- oder CT-Zellen abzielen, um Typ-17-Zellen zu einer effektiven Tumoreliminierung zu bewegen (Kuen et al., 2020). So wurde in einer Studie von Arra et al. (2017) wurde kürzlich gezeigt, dass eine Hemmung der CTLA-4-induzierten STAT3 Aktivität die charakteristischen T_C17-Genprodukte reduziert und T_C17-Zellen anfällig für die Umwandlung in T_C1-ähnliche Zellen mit erhöhtem zytotoxischen Potenzial macht, was nach adoptivem Zelltransfer erfolgreich zu einer effektiveren antigenspezifischen Bekämpfung von murinen OVA-exprimierenden B16 Melanomen beigetragen hat. Für Valproat wurde bei NK-Zellen ebenfalls eine STAT3 Suppression beschrieben, was potenziell eine weiterer Mechanismus der gesehenen Effekte sein könnte (Lulu Ni et al., 2017).

Die klinische Relevanz einer Suppression von IL-17A wird zudem deutlich, wenn die Schlüsselrolle dieses Zytokins bei der Bildung, dem Wachstum, der Metastasierung und der Entwicklung von Chemoresistenz von einer Vielzahl von malignen Erkrankungen betrachtet wird (Zhao et al., 2020). Hervorzuheben ist dabei auch die Relevanz dieses Zytokins bei Entzündungsreaktionen, da Tumore Entzündungsumgebungen unter anderem für ihr Wachstum und zur Umgehung der Immunantwort nutzen können (Fabre et al., 2017). Bei Mammakarzinomen beispielsweise können TILs IL-17A produzieren und damit eine Chemoresistenz und Proliferation vermitteln (Cochaud et al., 2013). Diese kritische Rolle von IL-17 bei der Tumorprogression und -entwicklung wird von dem Großteil der Literatur unterstützt. Die Valproat vermittelte Reduktion der IL-17A Produktion durch T_H17- und T_C17-Zellen könnte somit einen weiteren potenziellen Vorteil für eine potente zelluläre Immuntherapie mit dieser Substanz darstellen.

6.7 Potenzielle Verstärkung der zytotoxischen Fähigkeiten von CTL durch Valproat

CD8⁺ T-Zellen, insbesondere CTL, sind entscheidend in die Eliminierung und Eindämmung virusinfizierter und neoplastischer Zellen involviert und gelten als zentrale Vermittler der antineoplastischen Fähigkeiten des Immunsystems. Die Bekämpfung gelingt durch die Bildung einer juxtakrinen Signalstruktur, bekannt als "Immun-Synapse", in welcher Tumorzellen mittels Sekretion von Effektormolekülen wie Perforinen und Granzymen direkt eliminiert werden (Cullen et al., 2010; Hu & Krummel, 2020). Diese direkte Lyse wird außerdem von der Sekretion eines gewissen Zytokinmilieus begleitet, in dem IFN- γ eine besondere Bedeutung bei der Anti-Tumor-Antwort zukommt (vgl. Diskussion, Abschnitt 6.5).

Das Medikament Valproat weist starke antineoplastische Fähigkeiten auf, die hauptsächlich auf die Hemmung der Proliferation und Förderung der Apoptose entarteter Zellen zurückgeführt werden (Duenas-Gonzalez et al., 2008; Kostrouchova et al., 2007). Ein weiterer Mechanismus könnte aber auch die Verstärkung der zytotoxischen Fähigkeiten von CTLs durch VPS-vermittelte HDAC-Inhibition sein. So könnten Tumorzellen in Form von einer Immuntherapie mit Valproat durch potentere CTLs effizienter bekämpft werden. Nachdem wir bereits zeigen konnten, dass die Expression des wichtigen Zytokins IFN- γ durch die Behandlung mit Valproat von allen betrachteten T-Zellsubtypen induziert wurde, sollte die Frage näher beleuchtet werden,

ob auch andere Effektormoleküle des CTL Programms VPS-vermittelt vermehrt sezerniert werden. Exemplarisch wurde dafür Granzym B untersucht, für das sich eine signifikante Hochregulation in CTLs zeigte, was für eine optimierte Effektorfunktion sprechen könnte. Für die verwandten SCFAs Butyrat, Valerat und zu einem geringeren Maß Propionat wurde ebenfalls eine Erhöhung der Expression von Granzym B und IFN- γ in CTLs gezeigt (Luu et al., 2018).

Ob diese Effekte als Konzept für eine zelluläre Immuntherapie mit Valproat genutzt werden könnten, ist bislang noch nicht beleuchtet worden. Bisherige Studien fokussierten sich auf den Ansatz einer VPS-medierten Erhöhung der Immunogenität, oder aber auf einen kombinierten Einsatz von HDAC-Inhibitoren mit anderen Immuntherapeutika (Kroesen et al., 2014). So beobachtete die Forschungsgruppe um Mora-Garcia (2006) in Zervixkarzinomzellen, dass die HLA-1 Expression durch VPS hochreguliert wurde, was die Antigenerkennung durch CTLs erhöhte. Ähnlich dazu konnte durch eine Valproat- und Azacitidin- (einem Nukleosidanalogon) vermittelte Hochregulierung von Melanom-assozierten Antigenen auf AML- und myelodysplastischen Zellen eine verstärkte CTL-Antwort erreicht werden (Goodyear et al., 2010). Ebenso konnte Valproat durch eine Erhöhung von aktivierenden Liganden für die NK-Zell-Erkennung und eine Induktion von Tumor-assozierten Antigenen in einem onkolytischen Virus-Modell die angeborene NK-Zelltötung und das CTL-Priming verstärken (Jennings et al., 2019).

6.8 Limitationen

In dem verwendeten *in vitro* Modell konnte der Einfluss von Valproat auf verschiedene CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellsubtypen untersucht werden. Dabei ist zu beachten, dass *in vivo* Modelle möglicherweise realistischer physiologische Zusammenhänge abbilden können, weswegen die beobachteten Valproat-vermittelten Effekte im nächsten Schritt im Sinne einer Valproat-Behandlung von CD8⁺ T-Zellen im Rahmen einer zellulären Immuntherapie eingesetzt werden sollte, was im folgenden Kapitel thematisiert wird. Auf der anderen Seite ist es in *in vivo* Modellen schwierig, differenziert die Wirkung einer Substanz auf einen Zelltyp zu analysieren. So konnte unser „einfaches“ Modell durch eine möglichst große Ausschaltung potenzieller Störgrößen einer Konfundierung entgegenwirken.

Als nächsten Punkt konnten wir einen Zusammenhang zwischen den Zelleffekten und der HDAC-hemmenden Aktivität von Valproat darstellen. Es sollte jedoch genauer geprüft werden, ob nicht zusätzlich auch noch weitere metabolische Wege mechanistisch zu Grunde liegen könnten. Es ist bekannt, dass die SCFA Valerat nicht in der Lage war, den Transkriptionsfaktor Foxp3 in T_{regs} zu induzieren, es zeigte sich jedoch eine Hochregulation der IL-10-exprimierenden T_{regs} im Kolon (Luu et al., 2019). Aus diesem Grund sollte in weiteren Studien der Einfluss Valproats auf dieses antiinflammatorische Zytokin evaluiert werden. Um die Verstärkung der zytotoxischen Fähigkeiten der CTLs tiefergehend zu prüfen, sollte zusätzlich ein Zytotoxizitätsassay durchgeführt werden.

6.9 Klinische Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengenommen könnten darauf hinweisen, dass das Antiepileptikum Valproat potenziell als Immuntherapeutikum eingesetzt werden könnte. So offenbarte sich bei allen betrachteten T-Zelllinien eine Valproat-vermittelte Induktion der IFN- γ Expression, was Rückschlüsse auf einen möglichen Phänotypenwechsel hin zu T_H1 -Zellen bzw. CTLs geben könnte. Zudem wurde in T_H17 - und T_C17 -Zellen das in die Tumorprogression involvierte Zytokin IL-17A durch Valproat nahezu vollständig supprimiert, und auch diese Zellen wiesen eine erhöhte IFN- γ Produktion auf. Wir konnten zeigen, dass CTLs in der Gegenwart von Valproat Schlüsseffektormoleküle zur Bekämpfung von Tumoren hochregulierten. Dazu zählte neben dem Zytokin IFN- γ auch das für die Apoptoseeinleitung in Tumorzellen essentielle Granzym B. Als eine grundlegende mechanistische Erklärung der Immunmodulation durch Valproat konnten wir seine HDAC-inhibitorische Wirkung identifizieren.

Eine Kombination dieser Effekte könnte eine Optimierung der Effektorfunktionen von CTLs vermitteln und damit eine noch effektivere und potentere Tumorbekämpfung ermöglichen. Somit möchten wir hiermit einen Einsatz Valproats im Rahmen eines adoptiven Zelltransfers mit CAR-(chimäre Antigenrezeptor-)gekoppelten T-Zellen vorschlagen. Bei dieser innovativen Technik werden patienteneigene T-Lymphozyten *ex vivo* mit synthetischen Rezeptoren für spezifische tumorassoziierte Antigene gentechnisch gekoppelt und anschließend expandiert. Somit können die CAR-T-Zellen nach Reinfusion gezielt in das TME eindringen und die Tumorzellen eliminieren. Klinisch erzielte diese Technik bereits bei der Behandlung von hämatologischen

Malignomen und in geringerem Maße auch von soliden Tumoren große Erfolge, was zu immensen Forschungsanstrengungen zu diesem Verfahren führte. Eine neue Generation von CAR-T-Zellen wurde beispielsweise dazu befähigt, aktive Zytokine zu sezernieren und/oder bestimmte Liganden zu exprimieren. Die so entstandenen „gepanzerten“ Zellen sind in ihrer Wirksamkeit und Persistenz in einem immunsuppressiven TME den CAR-T-Zellen erster Generation weit überlegen (Yeku & Brentjens, 2016). Ein ebensolches Konzept könnte durch die *in vitro* Behandlung entnommener T-Zellen mit Valproat realisiert werden. VPS könnte über die beschriebenen Effekte die T-Zellen hin zu effektiveren Anti-Tumor-Antworten optimieren. Bei der Betrachtung all dessen ist es wichtig, die Limitationen zu berücksichtigen, die sich durch die Valproat vermittelte Apoptoseinduktion in T-Zellen ergeben (vgl. 5.1 und 6.2). Diese könnten im Rahmen eines adoptiven Zelltransfers jedoch irrelevant werden, da die Reinfusion der T-Zellen in die Patienten nur mit lebenden, hocheffizienten Effektorzellen erfolgen könnte. Aktuell wurde eine solche Immuntherapie mit adoptivem Zelltransfer in einem murinen *in vivo* Melanommodell mit der „Schwestersubstanz“ Valproats, Valerat, von unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit dem Universitätsklinikum Würzburg etabliert. Dabei konnten bereits Erfolge in der Tumorelimination gezeigt werden, die Hoffnung darauf machen, auch Valproat in einem solchen Kontext erfolgreich einsetzen zu können. In zukünftigen Studien sollte dieser Ansatz näher beleuchtet werden.

7 Zusammenfassung

Valproinsäure, beziehungsweise ihr Salz Valproat, wird seit mehr als 50 Jahren als Antikonvulsivum eingesetzt und ist das am häufigsten verschriebene antiepileptische Pharmakon in Deutschland. In den letzten Jahren ist diese Substanz aufgrund der Entdeckung ihrer antineoplastischen Wirkungen, wie zum Beispiel der Induktion von Apoptose in Tumorzellen, verstärkt in den Fokus der Forschung gerückt. In diesem Zusammenhang wurde entdeckt, dass Valproat ein potenter Histondeacetylase (HDAC)-Inhibitor ist. HDACs sind Enzyme, die durch epigenetische Veränderungen verschiedene zelluläre Prozesse wie die Apoptose, Differenzierung und Proliferation modulieren können. Eine Inhibition dieser führt somit zu weitreichenden Veränderungen, und zwar insbesondere in Tumorzellen, in denen HDACs häufig dysreguliert sind. Strukturell gesehen ist die Valproinsäure eine synthetisch hergestellte, verzweigte kurzkettige Fettsäure (SCFA). SCFAs entstehen physiologisch mittels anaerober Fermentation unverdauter Nahrungsbestandteile im Kolon und gelten als Hauptmetabolite des intestinalen Mikrobioms. Unsere Forschungsgruppe hat die Wirkung verschiedener SCFAs wie Butyrat und Valerat auf Inflammation und Karzinogenese intensiv untersucht. Dabei wurde ein weitreichender modulatorischer Einfluss auf das Immunsystem deutlich, dessen Dysregulation zu der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Tumoren führen kann. Eine besondere Rolle kommt dabei T-Lymphozyten zu, die einen zentralen Pfeiler der adaptiven Immunantwort bilden und entscheidend in Anti-Tumor-Antworten involviert sind. Auf der Basis dieser Erkenntnisse wurden neue Therapieansätze im Sinne einer Modulation des Immunsystems mittels verschiedener Techniken und Substanzen entworfen. Dazu zählt beispielsweise der adoptive Zelltransfer von gentechnisch veränderten *chimäre Antigenrezeptor* (CAR-)gekoppelten T-Zellen im Rahmen einer Immuntherapie.

Die Fragestellung, ob auch Valproat ähnlich immunmodulierend wirken und somit potenziell im Rahmen einer solchen zellulären Immuntherapie zur Bekämpfung von Tumoren eingesetzt werden könnte, sollte in dieser Dissertation systematisch beleuchtet werden. Dazu wurde mit Hilfe eines HDAC-Aktivitätsassays validiert, dass Valproat die HDAC-Aktivität in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen signifikant unterdrücken kann. Mittels zellbiologischer und proteinbiochemischer Methoden wie der Durchflusszytometrie und *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISAs) sollte anschließend der Einfluss der Substanz auf die verschiedenen T-Zellsubtypen *in vitro* genauer charakterisiert werden. Dazu wurden aus murinen Lymphknoten und Milzen T-Zellen isoliert, in Zellkulturen zu den entsprechenden T-Zellsubklassen differenziert

und mit Valproat sowie Valerat behandelt. Wir konnten zeigen, dass in allen betrachteten Linien die Expression des immunstimulierenden Zytokins IFN- γ induziert wurde, was Rückschlüsse auf einen möglichen Phänotypenwechsel hin zu T_H1-Zellen bzw. zytotoxischen T-Zellen (CTLs) geben könnte. Zudem wurde in T_H17- und T_C17-Zellen das in die Tumorprogression involvierte Zytokin IL-17A durch Valproat nahezu vollständig supprimiert, ebenso wie der für regulatorische T-Zellen (T_{regs}) charakteristische Transkriptionsfaktor Foxp3. Gleichzeitig konnten unsere Daten illustrieren, dass CTLs in der Gegenwart von Valproat Schlüsseffektormoleküle zur Bekämpfung von Tumoren hochregulieren können. Dazu zählt neben dem Zytokin IFN- γ auch das für die Apoptoseeinleitung in Tumorzellen essentielle Granzym B. Als eine grundlegende mechanistische Erklärung konnten wir die HDAC-inhibitorische Wirkung Valproats identifizieren. Eine Kombination dieser Effekte könnte eine Optimierung der Effektorfunktionen von CTLs vermitteln und damit eine noch potentere Tumorbekämpfung ermöglichen.

Zusammenfassend werfen unsere Daten ein Licht auf die immunmodulatorischen Einflüsse Valproats und identifizieren diese als eine Substanz mit potenziellem therapeutischen Nutzen im Kontext einer zellulären Immuntherapie. Aktuell wurde ein solcher adoptiver Zelltransfer in einem murinen *in vivo* Melanommodell mit der „Schwestersubstanz“ Valproats, Valerat, von unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit dem Universitätsklinikum Würzburg etabliert. Dabei konnten bereits Erfolge in der Tumorelimination gezeigt werden, die Hoffnung darauf machen, dass auch Valproat in einem solchen Kontext erfolgreich eingesetzt werden könnte. In zukünftigen Studien sollte dieser Ansatz näher beleuchtet werden.

Summary

Valproic acid, or its salt valproate, has been used as an anticonvulsant for more than 50 years and is the most commonly prescribed antiepileptic pharmaceutical in Germany. In recent years, this substance has increasingly become the focus of research due to the discovery of its antineoplastic effects, such as the induction of apoptosis in tumor cells. In this context, it was discovered that valproate is a potent histone deacetylase (HDAC) inhibitor. HDACs are enzymes that can modulate various cellular processes such as apoptosis, differentiation and proliferation through epigenetic changes. Inhibition of these thus leads to widespread changes, particularly in tumor cells where HDACs are often dysregulated. Structurally, valproic acid is a synthetically produced branched short-chain fatty acid (SCFA). SCFAs are physiologically produced via anaerobic fermentation of undigested food components in the colon and are considered major metabolites of the intestinal microbiome. Our research group has intensively studied the effect of various SCFAs such as butyrate and valerate on inflammation and carcinogenesis. This has revealed a wide-ranging modulatory influence on the immune system, for which it is known that dysregulation can lead to the development of autoimmune diseases and tumors. A special role is played by T-lymphocytes, which are form a central column of the adaptive immune response and are crucially involved in anti-tumor responses. Based on these findings, new therapeutic approaches have been designed in terms of modulating the immune system using various techniques and substances, for example in the context of immunotherapy using adoptive cell transfer of genetically engineered chimeric antigen receptor (CAR)-coupled T cells.

This led us to ask whether valproate could also have a similar immunomodulatory effect and thus potentially be used in the context of such cellular immunotherapy to combat tumors. This should be systematically elucidated in this dissertation, since the influence of valproate on different subtypes of T lymphocytes has not yet been fully clarified. To this end, an HDAC activity assay validated that valproate can significantly suppress HDAC activity in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Cell biological and protein biochemical methods such as flow cytometry and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) were then used to further characterize the influence of the substance on the different T cell subtypes. For this purpose, T cells were isolated from murine lymph nodes and spleens, differentiated to the corresponding T cell subtypes in cell cultures and treated with valproate as well as valerate. We demonstrated that in all

lines considered expression of the immunostimulatory cytokine IFN- γ was induced, which could provide conclusions about a possible phenotype switch toward T_H1 cells or cytotoxic T cells (CTLs). Moreover, in T_H17 and T_C17 cells, the cytokine IL-17A involved in tumor progression was almost completely suppressed by valproate, as was the transcription factor Foxp3 characteristic of regulatory T cells (T_{regs}). At the same time, our data illustrated that CTLs can upregulate key effector molecules to combat tumors in the presence of valproate. These included the cytokine IFN- γ as well as granzyme B, which is essential for apoptosis initiation in tumor cells. We identified the HDAC inhibitory effect of valproate as a basic mechanistic explanation. A combination of these effects could mediate optimization of the effector functions of CTLs, allowing even more potent tumor targeting.

In summary, our data shed light on the immunomodulatory influences of valproate and identify it as a compound with potential therapeutic utility in the context of cellular immunotherapy. Currently, such an adoptive cell transfer has been established in a murine *in vivo* melanoma model with valproate's "sister substance", valerate, by our research group in cooperation with the University Hospital of Würzburg. Successful tumor elimination has already been demonstrated, raising hopes that valproate may also be used successfully in such a context. This approach should be further investigated in future studies.

8 Literaturverzeichnis

- Akimova, T., Beier, U. H., Liu, Y., Wang, L., & Hancock, W. W. (2012). Histone/protein deacetylases and T-cell immune responses. *Blood*, 119. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-292003>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Aoyama, M., Kotani, J., & Usami, M. (2010). Butyrate and propionate induced activated or non-activated neutrophil apoptosis via HDAC inhibitor activity but without activating GPR-41/GPR-43 pathways. *Nutrition*, 26(6), 653–661. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.07.006>
- Arens, R., & Schoenberger, S. P. (2010). Plasticity in programming of effector and memory CD8⁺ T-cell formation: Plasticity in CD8⁺ T-cell formation. *Immunological Reviews*, 235(1), 190–205. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00899.x>
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., deRoos, P., Liu, H., Cross, J. R., Pfeffer, K., Coffey, P. J., & Rudensky, A. Y. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504(7480), 451–455. <https://doi.org/10.1038/nature12726>
- Arra, A., Lingel, H., Kuropka, B., Pick, J., Schnoeder, T., Fischer, T., Freund, C., Pierau, M., & Brunner-Weinzierl, M. C. (2017). The differentiation and plasticity of Tc17 cells are regulated by CTLA-4-mediated effects on STATs. *Oncot Immunology*, 6(2), e1273300. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1273300>
- Avni, O., Lee, D., Macian, F., Szabo, S. J., Glimcher, L. H., & Rao, A. (2002). TH cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nature Immunology*, 3(7), 643–651. <https://doi.org/10.1038/ni808>
- Bantscheff, M., Hopf, C., Savitski, M. M., Dittmann, A., Grandi, P., Michon, A.-M., Schlegl, J., Abraham, Y., Becher, I., Bergamini, G., Boesche, M., Delling, M., Dümpelfeld, B., Eberhard, D., Huthmacher, C., Mathieson, T., PoECKel, D., Reader, V., Strunk, K., Drewes, G. (2011). Chemoproteomics profiling of HDAC inhibitors reveals selective targeting of HDAC complexes. *Nature Biotechnology*, 29(3), 255–265. <https://doi.org/10.1038/nbt.1759>
- Blaheta, R. A., Michaelis, M., Driever, P. H., & Cinatl, J. (2005). Evolving anticancer drug valproic acid: Insights into the mechanism and clinical studies. *Medicinal Research Reviews*, 25(4), 383–397. <https://doi.org/10.1002/med.20027>

- Boniface, K., Blumenschein, W. M., Brovont-Porth, K., McGeachy, M. J., Basham, B., Desai, B., Pierce, R., McClanahan, T. K., Sadekova, S., & de Waal Malefyt, R. (2010). Human Th17 Cells Comprise Heterogeneous Subsets Including IFN- γ -Producing Cells with Distinct Properties from the Th1 Lineage. *The Journal of Immunology*, *185*(1), 679–687. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000366>
- Boucheron, N., Tschisnarov, R., Göschl, L., Moser, M. A., Lagger, S., Sakaguchi, S., Winter, M., Lenz, F., Vitko, D., Breitwieser, F. P., Müller, L., Hassan, H., Bennett, K. L., Colinge, J., Schreiner, W., Egawa, T., Taniuchi, I., Matthias, P., Seiser, C., & Ellmeier, W. (2014). CD4⁺ T cell lineage integrity is controlled by the histone deacetylases HDAC1 and HDAC2. *Nature Immunology*, *15*(5), 439–448. <https://doi.org/10.1038/ni.2864>
- Bowers, J. S., Nelson, M. H., Kundimi, S., Bailey, S. R., Huff, L. W., Schwartz, K. M., Cole, D. J., Rubinstein, M. P., & Paulos, C. M. (2015). Dendritic Cells in Irradiated Mice Trigger the Functional Plasticity and Antitumor Activity of Adoptively Transferred Tc17 Cells via IL12 Signaling. *Clinical Cancer Research*, *21*(11), 2546–2557. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2294>
- Brillantes, M., & Beaulieu, A. M. (2020). Memory and Memory-Like NK Cell Responses to Microbial Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 102. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00102>
- Buret, A. G. (2016). Good Bugs, Bad Bugs in the Gut: The Role of Microbiota Dysbiosis in Chronic Gastrointestinal Consequences of Infection. *The American Journal of Gastroenterology Supplements*, *3*(2), 25–32. <https://doi.org/10.1038/ajgsup.2016.11>
- Burton BS. (1882). On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetoacetate. *American Chemical Journal*, *3*, 385–395.
- Campos Carrascosa, L., Klein, M., Kitagawa, Y., Lückel, C., Marini, F., König, A., Guralnik, A., Raifer, H., Hagner-Benes, S., Rädler, D., Böck, A., Kang, C., Lohoff, M., Garn, H., Schaub, B., Berberich-Siebelt, F., Sakaguchi, S., Bopp, T., & Huber, M. (2017). Reciprocal regulation of the I19 locus by counteracting activities of transcription factors IRF1 and IRF4. *Nature Communications*, *8*, 15366. <https://doi.org/10.1038/ncomms15366>
- Chang, P. V., Hao, L., Offermanns, S., & Medzhitov, R. (2014). The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(6), 2247–2252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322269111>
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S3–S23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>

- Chateauvieux, S., Morceau, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2010). Molecular and Therapeutic Potential and Toxicity of Valproic Acid. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2010/479364>
- Chen, Q., Ouyang, D., Geng, M., Xu, L., Zhang, Y., Wang, F., & He, X. (2011). Valproic acid exhibits biphasic effects on apoptotic cell death of activated lymphocytes through differential modulation of multiple signaling pathways. *Journal of Immunotoxicology*, 8(3), 210–218. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2011.568979>
- Cochaud, S., Giustiniani, J., Thomas, C., Laprevotte, E., Garbar, C., Savoye, A.-M., Curé, H., Mascaux, C., Alberici, G., Bonnefoy, N., Eliaou, J.-F., Bensussan, A., & Bastid, J. (2013). IL-17A is produced by breast cancer TILs and promotes chemoresistance and proliferation through ERK1/2. *Scientific Reports*, 3(1), 3456. <https://doi.org/10.1038/srep03456>
- Crotty, S. (2014). T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity*, 41(4), 529–542. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.004>
- Cullen, S. P., Brunet, M., & Martin, S. J. (2010). Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death & Differentiation*, 17(4), 616–623. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.206>
- Dardalhon, V., Korn, T., Kuchroo, V. K., & Anderson, A. C. (2008). Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 31(3), 252–256. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2008.04.017>
- Dawson, M. A., & Kouzarides, T. (2012). Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell*, 150(1), 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>
- Drake, C. G., Jaffee, E., & Pardoll, D. M. (2006). Mechanisms of Immune Evasion by Tumors. In *Advances in Immunology* (Bd. 90, S. 51–81). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)90002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)90002-9)
- Duenas-Gonzalez, A., Candelaria, M., Perez-Plascencia, C., Perez-Cardenas, E., de la Cruz-Hernandez, E., & Herrera, L. A. (2008). Valproic acid as epigenetic cancer drug: Preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treatment Reviews*, 34(3), 206–222. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2007.11.003>
- DuPage, M., & Bluestone, J. A. (2016). Harnessing the plasticity of CD4+ T cells to treat immune-mediated disease. *Nature Reviews Immunology*, 16(3), 149–163. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.18>
- Egen, J. G., Ouyang, W., & Wu, L. C. (2020). Human Anti-tumor Immunity: Insights from Immunotherapy Clinical Trials. *Immunity*, 52(1), 36–54. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.12.010>

- Ellmeier, W., & Seiser, C. (2018). Histone deacetylase function in CD4+ T cells. *Nature Reviews Immunology*, 18(10), 617–634. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0037-z>
- Esteller, M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: A booming present, a brighter future. *Oncogene*, 21(35), 5427–5440. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205600>
- European Medicines Agency. (2015). *European public assessment report (EPAR) for Farydak*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/farydak-epar-summary-public_en.pdf
- European Medicines Agency. (2018). *Neue Maßnahmen zur Vermeidung einer Valproatexposition in der Schwangerschaft befürwortet*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/valproate-article-31-referral-new-measures-avoid-valproate-exposure-pregnancy-endorsed_de.pdf
- Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., Durham, S. R., Schmidt-Weber, C. B., & Cavani, A. (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI40202>
- Fabre, J., Giustiniani, J., Servagi-Vernat, S., Garbar, C., Merrouche, Y., Antonicelli, F., & Bensussan, A. (2017). Interleukin 17 in the tumor microenvironment: A potent target for anticancer immunotherapy? *Journal of Clinical Oncology*, 35(7_suppl), 115–115. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.7_suppl.115
- Falkenberg, K. J., & Johnstone, R. W. (2014). Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(9), 673–691. <https://doi.org/10.1038/nrd4360>
- Fayyad-Kazan, H., Rouas, R., Merimi, M., El Zein, N., Lewalle, P., Jebbawi, F., Mourtada, M., Badran, H., Ezzeddine, M., Salaun, B., Romero, P., Burny, A., Martiat, P., & Badran, B. (2010). Valproate Treatment of Human Cord Blood CD4-positive Effector T Cells Confers on Them the Molecular Profile (MicroRNA Signature and FOXP3 Expression) of Natural Regulatory CD4-positive Cells through Inhibition of Histone Deacetylase. *Journal of Biological Chemistry*, 285(27), 20481–20491. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.119628>
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N. N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., ... Ohno, H. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504(7480), 446–450.

- Gean, P.W., Huang, C.C., Hung, C.R., & Tsai J.J. (1994). Valproic acid suppresses the synaptic response mediated by the NMDA receptors in rat amygdalar slices. *Brain Research Bulletin*, 33(3), 333–336.
- Glauben, R., Batra, A., Fedke, I., Zeitz, M., Lehr, H. A., Leoni, F., Mascagni, P., Fantuzzi, G., Dinarello, C. A., & Siegmund, B. (2006). Histone Hyperacetylation Is Associated with Amelioration of Experimental Colitis in Mice. *The Journal of Immunology*, 176(8), 5015–5022. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.8.5015>
- Glauben, R., Sonnenberg, E., Wetzel, M., Mascagni, P., & Siegmund, B. (2014). Histone Deacetylase Inhibitors Modulate Interleukin 6-dependent CD4(+) T Cell Polarization in Vitro and in Vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(9), 6142–6151. PMC. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.517599>
- Gocher, A. M., Handu, S., Workman, C. J., & Vignali, D. A. A. (2020). Interferon gamma production by regulatory T cells is required for response to cancer immunotherapy. *The Journal of Immunology*, 204(1 Supplement), 244.8.
- Goodyear, O., Agathangelou, A., Novitzky-Basso, I., Siddique, S., McSkeane, T., Ryan, G., Vyas, P., Cavenagh, J., Stankovic, T., Moss, P., & Craddock, C. (2010). Induction of a CD8+T-cell response to the MAGE cancer testis antigen by combined treatment with azacitidine and sodium valproate in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Blood*, 116(11), 1908. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-249474>
- Göschl, L., Preglej, T., Hamminger, P., Bonelli, M., Andersen, L., Boucheron, N., Gülich, A. F., Müller, L., Saferding, V., Mufazalov, I. A., Hirahara, K., Seiser, C., Matthias, P., Penz, T., Schuster, M., Bock, C., Waisman, A., Steiner, G., & Ellmeier, W. (2018). A T cell-specific deletion of HDAC1 protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Autoimmunity*, 86, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.09.008>
- Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O. H., Schimpf, A., & Giavara, S. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *The EMBO journal*, 20. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.6969>
- Greer, J. B., & O’Keefe, S. J. (2011). Microbial induction of immunity, inflammation, and cancer. *Frontiers in Physiology*, 1, 168. <https://doi.org/10.3389/fphys.2010.00168>
- Gurpur, P. B., Liu, J., Burkin, D. J., & Kaufman, S. J. (2009). Valproic Acid Activates the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Muscle and Ameliorates Pathology in a Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *The American Journal of Pathology*, 174(3), 999–1008. PMC. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080537>

- Haberland, M., Montgomery, R. L., & Olson, E. N. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: Implications for disease and therapy. *Nature reviews Genetics*, *10*. <https://doi.org/10.1038/nrg2485>
- Hamer, H. M., Dodel, R., Strzelczyk, A., Balzer-Geldsetzer, M., Reese, J.-P., Schöffski, O., Graf, W., Schwab, S., Knake, S., Oertel, W. H., Rosenow, F., & Kostev, K. (2012). Prevalence, utilization, and costs of antiepileptic drugs for epilepsy in Germany—A nationwide population-based study in children and adults. *Journal of Neurology*, *259*(11), 2376–2384. <https://doi.org/10.1007/s00415-012-6509-3>
- Harari, A., Dutoit, V., Cellerai, C., Bart, P., Du Pasquier, R. A., & Pantaleo, G. (2006). Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunological Reviews*, *211*(1), 236–254. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00395.x>
- Hinnebusch, BF, Meng, S, Wu, JT, Archer, SY, & Hodin, RA. (2002). The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr.*, *132*(5), 1012–1017.
- Holmes, E., Li, J. V., Athanasiou, T., Ashrafiyan, H., & Nicholson, J. K. (2011). Understanding the role of gut microbiome–host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends in Microbiology*, *19*(7), 349–359. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.05.006>
- Hu, K. H., & Krummel, M. F. (2020). Carpet-bombing tumors with IFN- γ . *Nature Cancer*, *1*(3), 270–272. <https://doi.org/10.1038/s43018-020-0042-6>
- Huber, M., Heink, S., Grothe, H., Guralnik, A., Reinhard, K., Elflein, K., Hünig, T., Mittrücker, H.-W., Brüstle, A., Kamradt, T., & Lohoff, M. (2009). A Th17-like developmental process leads to CD8⁺ Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *European Journal of Immunology*, *39*(7), 1716–1725. <https://doi.org/10.1002/eji.200939412>
- Huber, M., Heink, S., Pagenstecher, A., Reinhard, K., Ritter, J., Visekruna, A., Guralnik, A., Bollig, N., Jeltsch, K., Heinemann, C., Wittmann, E., Buch, T., da Costa, O. P., Brüstle, A., Brenner, D., Mak, T. W., Mittrücker, H.-W., Tackenberg, B., Kamradt, T., & Lohoff, M. (2013). IL-17A secretion by CD8⁺ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Clinical Investigation*, *123*(1), 247–260. <https://doi.org/10.1172/JCI63681>
- Hull, E. E., Montgomery, M. R., & Leyva, K. J. (2016). HDAC Inhibitors as Epigenetic Regulators of the Immune System: Impacts on Cancer Therapy and Inflammatory Diseases. *BioMed Research International*, *2016*, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2016/8797206>

- Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C., Santee, C. A., Lynch, S. V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., & Littman, D. R. (2009). Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell*, *139*(3), 485–498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>
- Jennings, V. A., Scott, G. B., Rose, A. M. S., Scott, K. J., Migneco, G., Keller, B., Reilly, K., Donnelly, O., Peach, H., Dewar, D., Harrington, K. J., Pandha, H., Samson, A., Vile, R. G., Melcher, A. A., & Errington-Mais, F. (2019). Potentiating Oncolytic Virus-Induced Immune-Mediated Tumor Cell Killing Using Histone Deacetylase Inhibition. *Molecular Therapy*, *27*(6), 1139–1152. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.04.008>
- Jin, H., & Guo, X. (2016). Valproic acid ameliorates coxsackievirus-B3-induced viral myocarditis by modulating Th17/Treg imbalance. *Virology Journal*, *13*(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0626-z>
- Kaisar, M. M. M., Pelgrom, L. R., van der Ham, A. J., Yazdanbakhsh, M., & Everts, B. (2017). Butyrate Conditions Human Dendritic Cells to Prime Type 1 Regulatory T Cells via both Histone Deacetylase Inhibition and G Protein-Coupled Receptor 109A Signaling. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1429. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01429>
- Kak, G., Raza, M., & Tiwari, B. K. (2018). Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomolecular Concepts*, *9*(1), 64–79. <https://doi.org/10.1515/bmc-2018-0007>
- Kaplan, M. H. (2013). Th9 cells: Differentiation and disease. *Immunological Reviews*, *252*(1), 104–115. <https://doi.org/10.1111/imr.12028>
- Karp, M., Kosior, K., Karczmarczyk, A., Zając, M., Zaleska, J., Tomczak, W., Chocholska, S., Hus, M., Dmoszyńska, A., & Giannopoulos, K. (2015). Cytotoxic activity of valproic acid on primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ Wroclaw Medical University*, *24*(1), 55–62. <https://doi.org/10.17219/acem/29264>
- Kemp, R. A., & Ronchese, F. (2001). Tumor-Specific Tc1, But Not Tc2, Cells Deliver Protective Antitumor Immunity. *The Journal of Immunology*, *167*(11), 6497–6502. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6497>
- Kespohl, M., Vachharajani, N., Luu, M., Harb, H., Pautz, S., Wolff, S., Sillner, N., Walker, A., Schmitt-Kopplin, P., Boettger, T., Renz, H., Offermanns, S., Steinhoff, U., & Visekruna, A. (2017). The Microbial Metabolite Butyrate Induces Expression of Th1-Associated Factors in CD4⁺ T Cells. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1036. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01036>

- Kim, M. H., Kang, S. G., Park, J. H., Yanagisawa, M., & Kim, C. H. (2013). Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology*, *145*(2), 396-406.e1-10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.04.056>
- Knochelmann, H. M., Dwyer, C. J., Bailey, S. R., Amaya, S. M., Elston, D. M., Mazza-McCrann, J. M., & Paulos, C. M. (2018). When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. *Cellular & Molecular Immunology*, *15*(5), 458–469. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0004-4>
- Kondo, K., Ohigashi, I., & Takahama, Y. (2019). Thymus machinery for T-cell selection. *International Immunology*, *31*(3), 119–125. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy081>
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*, *27*(1), 485–517. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132710>
- Kostrouchova, M., Kostrouch, Z., & Kostrouchova, M. (2007). Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *Folia biologica*, *53*.
- Kroesen, M., Gielen, P. R., Brok, I. C., Armandari, I., Hoogerbrugge, P. M., & Adema, G. J. (2014). HDAC inhibitors and immunotherapy; a double edged sword? *Oncotarget*, *5*(16), 6558–6572. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2289>
- Kryczek, I., Bruce, A. T., Gudjonsson, J. E., Johnston, A., Aphale, A., Vatan, L., Szeliga, W., Wang, Y., Liu, Y., Welling, T. H., Elder, J. T., & Zou, W. (2008). Induction of IL-17⁺ T Cell Trafficking and Development by IFN- γ : Mechanism and Pathological Relevance in Psoriasis. *The Journal of Immunology*, *181*(7), 4733–4741. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.7.4733>
- Kuen, D.-S., Kim, B.-S., & Chung, Y. (2020). IL-17-Producing Cells in Tumor Immunity: Friends or Foes? *Immune Network*, *20*(1), e6. <https://doi.org/10.4110/in.2020.20.e6>
- Kuendgen, A., & Gattermann, N. (2007). Valproic acid for the treatment of myeloid malignancies. *Cancer*, *110*(5), 943–954. <https://doi.org/10.1002/cncr.22891>
- Lee, Y. K., Mukasa, R., Hatton, R. D., & Weaver, C. T. (2009). Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Current Opinion in Immunology*, *21*(3), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.05.021>
- Li, C., Jiang, P., Wei, S., Xu, X., & Wang, J. (2020). Regulatory T cells in tumor microenvironment: New mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Molecular Cancer*, *19*(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01234-1>

- Li, G., Nowak, M., Bauer, S., Schlegel, K., Stei, S., Allenhöfer, L., Waschbisch, A., Tackenberg, B., Höllerhage, M., Höglinger, G. U., Wegner, S., Wang, X., Oertel, W. H., Rosenow, F., & Hamer, H. M. (2013). Levetiracetam but not valproate inhibits function of CD8⁺ T lymphocytes. *Seizure - European Journal of Epilepsy*, 22(6), 462–466. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2013.03.006>
- Lloyd, K. A. (2013). A scientific review: Mechanisms of valproate-mediated teratogenesis. *Bioscience Horizons*, 6(0), hzt003–hzt003. <https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzt003>
- Long, J., Chang, L., Shen, Y., Gao, W.-H., Wu, Y.-N., Dou, H.-B., Huang, M.-M., Wang, Y., Fang, W.-Y., Shan, J.-H., Wang, Y.-Y., Zhu, J., Chen, Z., & Hu, J. (2015). Valproic Acid Ameliorates Graft-versus-Host Disease by Downregulating Th1 and Th17 Cells. *The Journal of Immunology*, 195(4), 1849–1857. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500578>
- Lu, L., & Cantor, H. (2008). Generation and Regulation of CD8⁺ Regulatory T Cells. *Cellular & Molecular Immunology*, 5(6), 401–406. <https://doi.org/10.1038/cmi.2008.50>
- Lu, Y., Hong, B., Li, H., Zheng, Y., Zhang, M., Wang, S., Qian, J., & Yi, Q. (2014). Tumor-specific IL-9–producing CD8⁺ Tc9 cells are superior effector than type-I cytotoxic Tc1 cells for adoptive immunotherapy of cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(6), 2265–2270. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317431111>
- Luu, M., Pautz, S., Kohl, V., Singh, R., Romero, R., Lucas, S., Hofmann, J., Raifer, H., Vachharajani, N., Carrascosa, L. C., Lamp, B., Nist, A., Stiewe, T., Shaul, Y., Adhikary, T., Zaiss, M. M., Lauth, M., Steinhoff, U., & Visekruna, A. (2019). The short-chain fatty acid pentanoate suppresses autoimmunity by modulating the metabolic-epigenetic crosstalk in lymphocytes. *Nature Communications*, 10(1), 760. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08711-2>
- Luu, M., Steinhoff, U., & Visekruna, A. (2017). Functional heterogeneity of gut-resident regulatory T cells. *Clinical & Translational Immunology*, 6(9), e156. PMC. <https://doi.org/10.1038/cti.2017.39>
- Luu, M., Weigand, K., Wedi, F., Breidenbend, C., Leister, H., Pautz, S., Adhikary, T., & Visekruna, A. (2018). Regulation of the effector function of CD8⁺ T cells by gut microbiota-derived metabolite butyrate. *Scientific Reports*, 8(1), 14430. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32860-x>
- Lv, J., Du, C., Wei, W., Wu, Z., Zhao, G., Li, Z., & Xie, X. (2012). The Antiepileptic Drug Valproic Acid Restores T Cell Homeostasis and Ameliorates Pathogenesis of

- Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(34), 28656–28665. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.356584>
- Maddur, M. S., Miossec, P., Kaveri, S. V., & Bayry, J. (2012). Th17 Cells. *The American Journal of Pathology*, 181(1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.03.044>
- Marchion, D. C., Bicaku, E., Daud, A. I., Sullivan, D. M., & Munster, P. N. (2005). Valproic Acid Alters Chromatin Structure by Regulation of Chromatin Modulation Proteins. *Cancer Research*, 65(9), 3815–3822. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2478>
- Mariño, E., Richards, J. L., McLeod, K. H., Stanley, D., Yap, Y. A., Knight, J., McKenzie, C., Kranich, J., Oliveira, A. C., Rossello, F. J., Krishnamurthy, B., Nefzger, C. M., Macia, L., Thorburn, A., Baxter, A. G., Morahan, G., Wong, L. H., Polo, J. M., Moore, R. J., ... Mackay, C. R. (2017). Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes. *Nature Immunology*, 18(5), 552–562. <https://doi.org/10.1038/ni.3713>
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 14(S2), 49. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>
- Martinez, N. E., Sato, F., Kawai, E., Omura, S., Chervenak, R. P., & Tsunoda, I. (2012). Regulatory T cells and Th17 cells in viral infections: Implications for multiple sclerosis and myocarditis. *Future virology*, 7. <https://doi.org/10.2217/fvl.12.44>
- Marwaha, A. K., Crome, S. Q., Panagiotopoulos, C., Berg, K. B., Qin, H., Ouyang, Q., Xu, L., Priatel, J. J., Levings, M. K., & Tan, R. (2010). Cutting Edge: Increased IL-17–Secreting T Cells in Children with New-Onset Type 1 Diabetes. *The Journal of Immunology*, 185(7), 3814–3818. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001860>
- Menon, B., Gullick, N. J., Walter, G. J., Rajasekhar, M., Garrood, T., Evans, H. G., Taams, L. S., & Kirkham, B. W. (2014). Interleukin-17+CD8+ T Cells Are Enriched in the Joints of Patients With Psoriatic Arthritis and Correlate With Disease Activity and Joint Damage Progression: IL-17+CD8+ T Cell Enrichment in the PsA Joint. *Arthritis & Rheumatology*, 66(5), 1272–1281. <https://doi.org/10.1002/art.38376>
- Mesdjian, E., Ciesielski, L., Valli, M., Bruguerolle, B., Jadot, G., Bouyard, P., & Mandel, P. (1982). Sodium valproate: Kinetic profile and effects on GABA levels in various brain areas of the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and*

- Biological Psychiatry*, 6(3), 223–233. [https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(82\)80172-3](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(82)80172-3)
- Meunier H, Carraz G, Meunier Y, Eymard P, Aimard M. (1963). Propriétés pharmacodynamiques de l'acide n-dipropylacétique. Ter Mémoire: Propriétés antiépileptiques. *Thérapie*, 18, 435–438.
- Michaelis, M, Suhan, T., Michaelis, U. R., Beek, K., Rothweiler, F., Tausch, L., Werz, O., Eikel, D., Zörnig, M., Nau, H., Fleming, I., Doerr, H. W., & Cinatl, J. (2006). Valproic acid induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation and inhibits apoptosis in endothelial cells. *Cell Death & Differentiation*, 13(3), 446–453. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401759>
- Michaelis, Martin, Michaelis, U. R., Fleming, I., Suhan, T., Cinatl, J., Blaheta, R. A., Hoffmann, K., Kotchetkov, R., Busse, R., Nau, H., & Cinatl, J. (2004). Valproic Acid Inhibits Angiogenesis in Vitro and in Vivo. *Molecular Pharmacology*, 65(3), 520–527. <https://doi.org/10.1124/mol.65.3.520>
- Mittrücker, H.-W., Visekruna, A., & Huber, M. (2014). Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62(6), 449–458. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0293-y>
- Mojic, M., Takeda, K., & Hayakawa, Y. (2017). The Dark Side of IFN- γ : Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 89. <https://doi.org/10.3390/ijms19010089>
- Mora-García, M. de L., Duenas-González, A., Hernández-Montes, J., De la Cruz-Hernández, E., Pérez-Cárdenas, E., Weiss-Steider, B., Santiago-Osorio, E., Ortiz-Navarrete, V. F., Rosales, V. H., Cantú, D., Lizano-Soberón, M., Rojo-Aguilar, M. P., & Monroy-García, A. (2006). Up-regulation of HLA class-I antigen expression and antigen-specific CTL response in cervical cancer cells by the demethylating agent hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid. *Journal of Translational Medicine*, 4, 55–55. PMC. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-4-55>
- Morinobu, A., Kanno, Y., & O'Shea, J. J. (2004). Discrete Roles for Histone Acetylation in Human T Helper 1 Cell-specific Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40640–40646. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407576200>
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., & Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*, 136(7), 2348–2357.

- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., & Janeway, C. (2012). *Janeway's immunobiology* (8th ed). Garland Science.
- Nabekura, T., & Lanier, L. L. (2014). Antigen-specific expansion and differentiation of natural killer cells by alloantigen stimulation. *Journal of Experimental Medicine*, 211(12), 2455–2465. <https://doi.org/10.1084/jem.20140798>
- Ni, Ling, & Lu, J. (2018). Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Medicine*, 7(9), 4509–4516. <https://doi.org/10.1002/cam4.1700>
- Ni, Lulu, Wang, L., Yao, C., Ni, Z., Liu, F., Gong, C., Zhu, X., Yan, X., Watowich, S. S., Lee, D. A., & Zhu, S. (2017). The histone deacetylase inhibitor valproic acid inhibits NKG2D expression in natural killer cells through suppression of STAT3 and HDAC3. *Scientific Reports*, 7(1), 45266. <https://doi.org/10.1038/srep45266>
- Noack, M., & Miossec, P. (2014). Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmunity reviews*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.12.004>
- Nurieva, R. I., Liu, X., & Dong, C. (2009). Yin-Yang of costimulation: Crucial controls of immune tolerance and function. *Immunological Reviews*, 229(1), 88–100. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00769.x>
- O'Shea, J. J., & Paul, W. E. (2010). Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4+ T Cells. *Science*, 327(5969), 1098–1102. <https://doi.org/10.1126/science.1178334>
- Park, J., Kim, M., Kang, S. G., Jannasch, A. H., Cooper, B., Patterson, J., & Kim, C. H. (2015). Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR–S6K pathway. *Mucosal Immunology*, 8(1), 80–93. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.44>
- Patsalos, P. N., Berry, D. J., Bourgeois, B. F. D., Cloyd, J. C., Glauser, T. A., Johannessen, S. I., Leppik, I. E., Tomson, T., & Perucca, E. (2008). Antiepileptic drugs best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 49(7), 1239–1276. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01561.x>
- Phiel, C. J., Zhang, F., Huang, E. Y., Guenther, M. G., Lazar, M. A., & Klein, P. S. (2001). Histone Deacetylase Is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36734–36741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101287200>
- Pietruczuk, K., Lisowska, K. A., Grabowski, K., Landowski, J., & Witkowski, J. M. (2018). Proliferation and apoptosis of T lymphocytes in patients with bipolar disorder. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21769-0>

- Puddu, A., Sanguineti, R., Montecucco, F., & Viviani, G. L. (2014). Evidence for the Gut Microbiota Short-Chain Fatty Acids as Key Pathophysiological Molecules Improving Diabetes. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/162021>
- Raphael, I., & Forsthuber, T. G. (2012). Stability of T-cell lineages in autoimmune diseases. *Expert Review of Clinical Immunology*, 8(4), 299–301. <https://doi.org/10.1586/eci.12.22>
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N., & Forsthuber, T. G. (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, 74(1), 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>
- Ratajczak, W., Niedźwiedzka-Rystwej, P., Tokarz-Deptuła, B., & Deptuła, W. (2018). Immunological memory cells. *Central European Journal of Immunology*, 43(2), 194–203. <https://doi.org/10.5114/ceji.2018.77390>
- Riggs, M. G., Whittaker, R. G., Neumann, J. R., & Ingram, V. M. (1977). N-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature*, 268(5619), 462–464. <https://doi.org/10.1038/268462a0>
- Rooks, M. G., & Garrett, W. S. (2016). Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature Reviews Immunology*, 16(6), 341–352. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.42>
- Roy, S., & Trinchieri, G. (2017). Microbiota: A key orchestrator of cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(5), 271–285. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.13>
- Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 531–562. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122>
- Sanofi-Aventis. (2018). *Fachinformation Ergenyl® 150mg/300mg/500mg*. <https://mein.sanofi.de/produkte/Ergenyl/Downloads?id=0d99225a-92cc-4dfa-9e78-9dc6357bf32c>
- Saouaf, S. J., Li, B., Zhang, G., Shen, Y., Furuuchi, N., & Hancock, W. W. (2009). Deacetylase inhibition increases regulatory T cell function and decreases incidence and severity of collagen-induced arthritis. *Experimental and molecular pathology*, 87. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.06.003>
- Sarkizova, S., & Hacohen, N. (2017). How T cells spot tumour cells. *Nature*, 551(7681), 444–446. <https://doi.org/10.1038/d41586-017-07267-9>
- Saxena, A., Desbois, S., Carrié, N., Lawand, M., Mars, L. T., & Liblau, R. S. (2012). Tc17 CD8⁺ T Cells Potentiate Th1-Mediated Autoimmune Diabetes in a Mouse

- Model. *The Journal of Immunology*, 189(6), 3140–3149.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103111>
- Schnekenburger, M., Dicato, M., & Diederich, M. F. (2019). Anticancer potential of naturally occurring immunoepigenetic modulators: A promising avenue?: Cancer Immunoediting by Natural Products. *Cancer*.
<https://doi.org/10.1002/cncr.32041>
- Schuster, M., Plaza-Sirvent, C., Visekruna, A., Huehn, J., & Schmitz, I. (2019). Generation of Foxp3+CD25- Regulatory T-Cell Precursors Requires c-Rel and IκBNS. *Frontiers in Immunology*, 10, 1583.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01583>
- Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., Thangaraju, M., Prasad, P. D., Manicassamy, S., Munn, D. H., Lee, J. R., Offermanns, S., & Ganapathy, V. (2014). Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity*, 40(1), 128–139.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.007>
- Sixto-López, Y., Bello, M., & Correa-Basurto, J. (2020). Exploring the inhibitory activity of valproic acid against the HDAC family using an MMGBSA approach. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 34(8), 857–878.
<https://doi.org/10.1007/s10822-020-00304-2>
- Skurkovich, S., & Skurkovich, B. (2005). Anticytokine Therapy, Especially Anti-Interferon-γ, as a Pathogenetic Treatment in TH-1 Autoimmune Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1051(1), 684–700.
<https://doi.org/10.1196/annals.1361.113>
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J. N., & Garrett, W. S. (2013). The microbial metabolites, short chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6145), 10.1126/science.1241165. PMC.
<https://doi.org/10.1126/science.1241165>
- Soria-Castro, R., Schcolnik-Cabrera, A., Rodríguez-López, G., Campillo-Navarro, M., Puebla-Osorio, N., Estrada-Parra, S., Estrada-García, I., Chacón-Salinas, R., & Chávez-Blanco, A. D. (2019). Exploring the Drug Repurposing Versatility of Valproic Acid as a Multifunctional Regulator of Innate and Adaptive Immune Cells. *Journal of Immunology Research*, 2019, 1–24.
<https://doi.org/10.1155/2019/9678098>
- Sun, G., Mackey, L. V., Coy, D. H., Yu, C.-Y., & Sun, L. (2015). The Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Induces Cell Growth Arrest in Hepatocellular

- Carcinoma Cells via Suppressing Notch Signaling. *Journal of Cancer*, 6(10), 996–1004. <https://doi.org/10.7150/jca.12135>
- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A. N., Mackay, C. R., & Macia, L. (2014). The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. In *Advances in Immunology* (Bd. 121, S. 91–119). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9>
- Tan, J., McKenzie, C., Vuillermin, P. J., Goverse, G., Vinuesa, C. G., Mebius, R. E., Macia, L., & Mackay, C. R. (2016). Dietary Fiber and Bacterial SCFA Enhance Oral Tolerance and Protect against Food Allergy through Diverse Cellular Pathways. *Cell Reports*, 15(12), 2809–2824. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.047>
- Tang, X.L., Smith, T.R., & Kumar, V. (2005). Specific control of immunity by regulatory CD8 T cells. *Cellular & Molecular Immunology*, 2(1), 11–19.
- Tang, Y., Guan, S. P., Chua, B. Y. L., Zhou, Q., Ho, A. W. S., Wong, K. H. S., Wong, K. L., Wong, W. S. F., & Kemeny, D. M. (2012). Antigen-specific effector CD8 T cells regulate allergic responses via IFN- γ and dendritic cell function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(6), 1611-1620.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.12.976>
- Tao, R., de Zoeten, E. F., Özkaynak, E., Chen, C., Wang, L., Porrett, P. M., Li, B., Turka, L. A., Olson, E. N., Greene, M. I., Wells, A. D., & Hancock, W. W. (2007). Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nature Medicine*, 13(11), 1299–1307. <https://doi.org/10.1038/nm1652>
- Trompette, A., Gollwitzer, E. S., Yadava, K., Sichelstiel, A. K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., Blanchard, C., Junt, T., Nicod, L. P., Harris, N. L., & Marsland, B. J. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature Medicine*, 20(2), 159–166. <https://doi.org/10.1038/nm.3444>
- Tsuji, N., Kobayashi, M., Nagashima, K., Wakisaka, Y., & Koizumi, K. (1976). A new antifungal antibiotic, trichostatin. *The Journal of Antibiotics*, 29(1), 1–6. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.29.1>
- Tzartos, J. S., Friese, M. A., Craner, M. J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M. M., & Fugger, L. (2008). Interleukin-17 Production in Central Nervous System-Infiltrating T Cells and Glial Cells Is Associated with Active Disease in Multiple Sclerosis. *The American Journal of Pathology*, 172(1), 146–155. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070690>

- van Duijn, J., de Jong, M. J. M., Benne, N., Lebox, R. J. T., van Ooijen, M. E., Kruit, N., Foks, A. C., Jiskoot, W., Bot, I., Kuiper, J., & Slütter, B. (2020). Tc17 CD8+ T cells accumulate in murine atherosclerotic lesions, but do not contribute to early atherosclerosis development. *Cardiovascular Research*, cvaa286. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa286>
- VanDongen, A. M. J., VanErp, M. G., & Voskuyl, R. A. (1986). Valproate Reduces Excitability by Blockage of Sodium and Potassium Conductance. *Epilepsia*, 27(3), 177–182. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1986.tb03525.x>
- Visekruna, A., Ritter, J., Scholz, T., Campos, L., Guralnik, A., Poncette, L., Raifer, H., Hagner, S., Garn, H., Staudt, V., Bopp, T., Reuter, S., Taube, C., Loser, K., & Huber, M. (2013). Tc9 cells, a new subset of CD8 + T cells, support Th2-mediated airway inflammation: Cellular immune response. *European Journal of Immunology*, 43(3), 606–618. <https://doi.org/10.1002/eji.201242825>
- Waldecker, M., Kautenburger, T., Daumann, H., Busch, C., & Schrenk, D. (2008). Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(9), 587–593. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.08.002>
- Wang, D., Jing, Y., Ouyang, S., Liu, B., Zhu, T., Niu, H., & Tian, Y. (2013). Inhibitory effect of valproic acid on bladder cancer in combination with chemotherapeutic agents in vitro and in vivo. *Oncology Letters*, 6(5), 1492–1498. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1565>
- Weichert, W. (2009). HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Letters*, 280(2), 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.10.047>
- Wendel, M., Galani, I. E., Suri-Payer, E., & Cerwenka, A. (2008). Natural Killer Cell Accumulation in Tumors Is Dependent on IFN- γ and CXCR3 Ligands. *Cancer Research*, 68(20), 8437–8445. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1440>
- West, A. C., Mattarollo, S. R., Shortt, J., Cluse, L. A., Christiansen, A. J., Smyth, M. J., & Johnstone, R. W. (2013). An Intact Immune System Is Required for the Anticancer Activities of Histone Deacetylase Inhibitors. *Cancer Research*, 73(24), 7265–7276. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0890>
- Wilson, C. B., Rowell, E., & Sekimata, M. (2009). Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nature Reviews Immunology*, 9(2), 91–105. <https://doi.org/10.1038/nri2487>
- Yang, Y. (2015). Cancer immunotherapy: Harnessing the immune system to battle cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 125(9), 3335–3337. <https://doi.org/10.1172/JCI83871>

- Yeku, O. O., & Brentjens, R. J. (2016). Armored CAR T-cells: Utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy. *Biochemical Society Transactions*, 44(2), 412–418. <https://doi.org/10.1042/BST20150291>
- Yen, H.-R., Harris, T. J., Wada, S., Grosso, J. F., Getnet, D., Goldberg, M. V., Liang, K.-L., Bruno, T. C., Pyle, K. J., Chan, S.-L., Anders, R. A., Trimble, C. L., Adler, A. J., Lin, T.-Y., Pardoll, D. M., Huang, C.-T., & Drake, C. G. (2009). Tc17 CD8 T Cells: Functional Plasticity and Subset Diversity. *The Journal of Immunology*, 183(11), 7161–7168. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900368>
- Yoo, C. B., & Jones, P. A. (2006). Epigenetic therapy of cancer: Past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(1), 37–50. <https://doi.org/10.1038/nrd1930>
- Zeise, M.L., Kasparow, S., & Zieglgänsberger, W. (1991). Valproate suppresses N-methyl-D-aspartate-evoked, transient depolarizations in the rat neocortex in vitro. *Brain Research*, 544(2), 345–348.
- Zhao, J., Chen, X., Herjan, T., & Li, X. (2020). The role of interleukin-17 in tumor development and progression. *Journal of Experimental Medicine*, 217(1), e20190297. <https://doi.org/10.1084/jem.20190297>
- Zhou, L., Chong, M. M. W., & Littman, D. R. (2009). Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity*, 30(5), 646–655. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.001>
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: Fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5), 1557–1569. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>
- Zhu, Jingjing, Powis de Tenbossche, C. G., Cané, S., Colau, D., van Baren, N., Lurquin, C., Schmitt-Verhulst, A.-M., Liljeström, P., Uyttenhove, C., & Van den Eynde, B. J. (2017). Resistance to cancer immunotherapy mediated by apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00784-1>
- Zimmerman, M. A., Singh, N., Martin, P. M., Thangaraju, M., Ganapathy, V., Waller, J. L., Shi, H., Robertson, K. D., Munn, D. H., & Liu, K. (2012). Butyrate suppresses colonic inflammation through HDAC1-dependent Fas upregulation and Fas-mediated apoptosis of T cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(12), G1405–G1415. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00543.2011>

9 Anhang

9.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg:

Adamkiewicz	Fuchs-	Meyer-Wittkopf	Schratt
Barth	Winkelmann	Milani	Schu
Bartsch	Geks	Mittag	Schütz
Bauer	Geraedts	Moll	Schulze
Baum	Görg	Morin	Schütt
Bäumlein	Gress	Mueller	Schüttler
Becker A.	Grgic	Mutters	Schwalbe
Becker K.	Grundmann	Nenadic	Seifart
Becker S.	Haas	Neubauer	Seitz
Best	Halaszovich	Neumüller	Sekundo
Bette	Hertl	Nikolaizik	Sevinc
Bien	Hildebrandt	Nimsky	Sommer
Bliemel	Hoch	Nockher	Stahl
Bonattera	Hofmann	Oberkircher	Steinfeldt
Bösner	Hoyer	Oberwinkler	Steiniger
Brehm	Jerrentrup	Oertel	Strik
Bücking	Josephs	Oliver	Stuck
Carl	Kalder	Opitz	Tackenberg
Cetin	Kann	Pagenstecher	Teymoortash
Czubayko	Kanngießer	Pankuweit	Thieme
Daut	Karatolios	Parahuleva	Thum
Decher	Kill	Patrascan	Timmermann
Del Rey	Kinscherf	Peterlein	Timmesfeld
Dettmeyer	Kircher	Pfestroff	Vannucchi
Dietz	Kirschbaum	Pfützner	Vogelmeier
Dinges	Kluge	Plant	Vogt
Donner-	Kolb-Niemann	Preisig-Müller	Vorwerk
Banzhoff	Kortus-Götze	Reese	Wagner
Duda	Kostev	Renz	Walter
Eberhart	Köhler	Richter	Weber
Eggers	König	Rinne	Weihe
El-Zayat	Kruse	Riße	Westermann
Engenhardt-	Kühnert	Roelcke	Wiesmann
Cabillic	Lechler	Roeßler	Wilhelm
Eschbach	Leonhardt	Rost	Wißniowski
Eubel	Lill	Ruchholtz	Wolff
Fendrich	Lohoff	Sahmland	Worzfeld
Feuser	Mahnken	Schäfer	Wrocklage
Figiel	Maier	Schieffer	Wulf
Frink	Meißner	Schierl	Zavorotny
Fritz	Menzler	Schneider	Ziring
	Meyer	Schoner	Zwiorek

9.2 Danksagung

Für die herausragende Betreuung von Professor Dr. Alexander Visekruna möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken. Danke, dass Du mir jederzeit mit weisen Ratschlägen, unglaublichem Fachwissen und aufmunterenden Worten zur Seite standest.

Danke an Dr. Maik Luu, der mir die immunologischen Zusammenhänge und Forschungsmethoden nahegebracht hat.

Danke an die Laborgemeinschaft, die mir in dieser Zeit sehr ans Herz gewachsen ist.

Danke an Vanessa und insbesondere Hanna, die sich immer wieder als geduldige Erklärerin, kluge Forscherin und vor allem auch als gute Freundin bewiesen hat.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und meinen Freunden danken. Ohne eure Liebe, Unterstützung und der von euch beigebrachten Gewissheit, dass alles erreichbar ist, hätte ich diese Arbeit nie fertiggestellt.