

Aus dem CharitéCentrum 13 für Innere
Medizin mit Gastroenterologie und
Nephrologie
Medizinische Klinik für
Gastroenterologie, Infektiologie und
Rheumatologie
Direktorin: Prof. Dr. Britta Siegmund

Habilitationsschrift

Die Hemmung von Histondeazetylasen in chronisch- entzündlichen Darmerkrankungen

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle
Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Rainer Glauben

Eingereicht:	06/2020
Dekan:	Prof. Dr. med. Axel R. Pries
1. Gutachter/in:	Prof. Dr. Raja Atreya, Erlangen
2. Gutachter/in:	Prof. Dr. Roland Rad, München

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen:	3
Einleitung	4
Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	4
Morbus Crohn.....	4
Colitis ulcerosa	4
Pathogenese	4
Epigenetik.....	5
Krebsrisiko	6
Therapie.....	6
Histondeazetylasen.....	7
Histondeazetylase-Inhibitoren.....	8
Klinische Studien.....	9
Präklinische Studien	10
Natürliche Histondeazetylase-Inhibitoren	13
Zielsetzung	14
Eigene Arbeiten.....	15
Histondeazetylase-Inhibitoren in Modellen experimenteller Kolitis.....	16
Histondeazetylase-Inhibitoren in Modellen inflammationsassoziiierter Tumorgenese.....	25
Wirkung von Histondeazetylase-Inhibitoren auf T-Helferzellen und Makrophagen	36
Bedeutung der Histondeazetylase 5 auf die inflammatorische Antwort von Makrophagen	48
Bedeutung von Histondeazetylasen für die intestinale epitheliale Barriere in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	59
Diskussion	73
HDAC-Inhibition in Modellen experimenteller Kolitis	73
Therapeutischer Effekt von HDAC-Inhibitoren in intestinaler Entzündung.....	73
HDAC-Inhibitor-Wirkung auf T-Zellen und Makrophagen.....	74
HDAC und HDAC-Inhibitoren in intestinalen Epithelzellen.....	76
HDAC-Inhibition als Wirkmechanismus	76
Funktionen einzelner HDAC.....	77
Wirkung von HDAC-Inhibitoren.....	80
Spezifische HDAC-Inhibitoren	82
HDAC-Inhibitoren in <i>Drug Delivery</i> -Systemen.....	85
HDAC-Inhibitoren in Kombinationstherapien	85
Nebenwirkungen.....	86
Zusammenfassung.....	88
Literaturangaben.....	90
Danksagung	99
Erklärung.....	100

Abkürzungen:

AOM	Azoxymethan
APC	Antigen-präsentierende Zelle
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CRC	kolorektales Karzinom
CU	Colitis ulcerosa
DDS	<i>Drug Delivery</i> -System
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DSS	Dextran-Natriumsulfat
EAE	experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
FoxP3	<i>forkhead box P3</i>
HDAC	Histondeazetylase
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
IFN γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IL-6R	IL-6-Rezeptor
MC	Morbus Crohn
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cells</i>
miRNA	mikro-RNA
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
SAHA	<i>Suberanilohydroxamic acid</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLE	systemischen Lupus erythematodes
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAM	tumorassoziierte Makrophagen
TGF β	Transforming growth factor β
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
TSA	Trichostatin A

Einleitung

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), einschließlich Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU), handelt es sich um komplexe, chronisch entzündliche Erkrankungen unklarer Ätiologie. Als Ursache werden gleichermaßen Umwelteinflüsse, Genom, Mikrobiota und immunologische Faktoren angenommen (1-3). In Deutschland liegt die Inzidenz für CU bei 3,0-3,9 und für MC bei 5,2-8,6 jährlichen Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (3).

Morbus Crohn

MC ist eine Krankheit, unter der Patienten ihr Leben lang leiden und welche durch verschiedene klinische Symptome wie Bauchschmerzen, Durchfall, Gewichtsverlust und Fieber gekennzeichnet ist. Es handelt sich um eine chronisch-rezidivierende entzündliche Erkrankung, die jeden Abschnitt des Magen-Darm-Traktes vom Mund bis zum Anus befallen kann. MC ist gekennzeichnet durch eine diskontinuierliche und ulzerative, transmurale Entzündungen, welche sich bei 30-40% der Patienten auf den Dünndarm beschränkt, unter häufiger Beteiligung des terminalen Ileums (1). Bei 15-25% der Patienten hingegen beschränkt sich die Entzündung auf den Dickdarm (4).

Colitis ulcerosa

Klinische Merkmale von CU sind blutiger Durchfall und chronische Bauchschmerzen, bei schweren Krankheitsschüben können auch hohe Temperatur, Tachykardie, Gewichtsverlust, Druckempfindlichkeit des Dickdarms, Blähungen oder verminderte Darmgeräusche auffallen. Die Entzündung ist bei der CU auf die Schleimhautoberfläche also die Mukosa und Submukosa beschränkt, kann aber im schweren Krankheitsverlauf auch transmural auftreten. Die Entzündung beginnt am Rektum und kann sich nach proximal kontinuierlich über den gesamten Dickdarm erstrecken oder auch nur die linke Seite betreffen (2).

Pathogenese

Die Ätiologie der CED ist noch nicht vollständig verstanden. Mehrere Studien stützen jedoch die Hypothese, dass der Auslöser eine Kombination von genetischen Faktoren, Immunfehlregulation und Umweltfaktoren darstellt (5, 6). Genom-weite Assoziationsstudien haben zur Entdeckung von über 230 Genen geführt, die für CED prädisponieren (7). Bezeichnenderweise sind die meisten dieser genetischen Polymorphismen entweder mit der Barrierefunktion des intestinalen Epithels assoziiert oder an Wechselwirkungen zwischen Wirt und Mikrobiota beteiligt (8-10). Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass Veränderungen der Darmmikrobiota für die Auslösung chronischer Entzündungen kausal sind und nicht nur eine Folge (11). Für die zentrale Rolle der Darmmikrobiota beim Auftreten von CED spricht auch eine charakteristische Dysbiose, die im Wesentlichen durch eine Abnahme der

Diversität charakterisiert ist (12-14). Die Transplantation von fäkaler Mikrobiota kann bei aktivem CU in einer Subgruppe von Patienten eine Remission induzieren (15). Neuere Studien zeigen überdies, dass der Einsatz von Antibiotika in der Kindheit für eine spätere Entwicklung von CED im Erwachsenenalter prädisponiert (16).

Umweltfaktoren scheinen ausschlaggebend für den Ausbruch von CED zu sein, während der genetische Hintergrund den Patienten für die Krankheit prädisponiert. Diese Schlussfolgerung ergibt sich aus der Konkordanz von CED bei eineiigen Zwillingen von unter 50% sowie der unvollständigen Penetranz von CED-prädisponierenden Genvarianten in der Allgemeinbevölkerung (17, 18). Die Rolle von Umweltfaktoren wurde auch durch Trendanalysen in epidemiologischen Daten abgeleitet. Die höhere Inzidenz und Prävalenz von CED in Nordamerika und den USA sowie das erhöhte CED-Risiko für Menschen, die in solche Regionen auswandern und deren Nachkommen, stützen eine Korrelation zwischen der Inzidenz von CED und dem Leben nach einem „westlichen“ Lebensstil (19). Neben der geografischen Lage scheinen die wichtigsten Umweltfaktoren, die den Ausbruch von CED beeinflussen, Ernährung, Rauchen, Alkohol und Medikamente (wie nicht-steroidale entzündungshemmende Medikamente und orale Kontrazeptiva) zu sein (20). Diese Faktoren sollen einerseits Eigenschaften der epithelialen Darmbarriere verändern (5) und andererseits auch die Zusammensetzung der Mikrobiota beeinflussen (21). Die exakten Mechanismen, die einer solchen Korrelation zugrunde liegen, sind jedoch nicht gut verstanden.

Epigenetik

Bei Entstehung und Verlauf der CED spielen aber auch epigenetischen Modifikationen, wie nichtkodierende mikro-RNA (miRNA), DNA-Methylierung oder Histon-Azetylierung eine Rolle (22, 23). Einige Umweltfaktoren, welche im Verdacht stehen zur Entstehung von CED beizutragen, können das Risiko der Entwicklung von CED durch epigenetische Modifikationen modulieren (24). Gegenwärtig gibt es Hinweise auf epigenetische Veränderungen bei CED-Patienten, in der differentiellen Expression spezifischer miRNA in Darmschleimhautproben von Patienten im Vergleich zu Kontrollpatienten und der Anwesenheit spezifischer miRNA im peripheren Blut und Gewebe von CED-Patienten (22, 25). miRNA sind kleine nichtkodierende RNA-Moleküle mit ungefähr 22 Nukleotiden, die intrazellulär zur Regulierung mancher Zielgene oder Signalwege eingesetzt werden. Unterschiede in der DNA-Methylierung wurden sowohl bei CU- als auch bei MC-Patienten beschrieben. So wurden in einer Studie von Taman *et al.* Muster der Hypermethylierung auf die Pathogenese von MC zurückgeführt (26). Diese Daten werden gestützt durch die Ergebnisse mit einer großen pädiatrischen CED-Kohorte, in der spezifische epigenetische Variationen im Darmepithel das Fortschreiten der Krankheit beeinflussen und sogar als Biomarker diskutiert werden (27). Auch die Mikrobiota beeinflusst die Aktivierung einiger Gene, die mit hypomethylierten, aktiven regulatorischen Regionen assoziiert sind, und induziert so die Expression von Genen, die mit CED assoziiert sind (28). Die Rolle von Histon-Azetylierungen wird in einem eigenen Abschnitt

beschrieben.

Krebsrisiko

Die Assoziation von Darmkrebs und CU ist seit der Zeit von Crohn und Rosenberg (29) seit fast einem Jahrhundert bekannt. Es wird geschätzt, dass Darmkrebs 10% bis 15% der Todesfälle bei Patienten mit CED verursacht (30). Chronische Entzündungen sind ein wichtiger Faktor bei der Pathogenese von kolorektalen Karzinomen (CRC). Spezielle Risikofaktoren für die Entwicklung von CRC sind ausgedehnte Erkrankungen, lange Krankheitsdauer, junges Alter bei Diagnose, Familienanamnese von CRC, post-inflammatorische Polypen und Strikturen sowie das gleichzeitige Vorhandensein einer primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) (31, 32). Es wird angenommen, dass sich das CRC über einen chronischen Entzündungs-Dysplasie-Karzinom-Weg entwickelt (33). Zellen aus der Darmschleimhaut bei Patienten mit Kolitis können jedoch die molekularen Anzeichen von Dysplasie und Krebs aufweisen, einschließlich Aneuploidie, aberranter DNA-Methylierung und p53-Mutationen, noch bevor histologische Hinweise auf Dysplasie oder Krebs vorliegen. Dieses Phänomen wird als Feldeffekt bezeichnet (32).

Die Daten zur Inzidenz von CRC in CU sind geografisch und in Bezug auf das Studiendesign unterschiedlich. In einer Metaanalyse von Eaden et al. betrug die Gesamtinzidenz von CRC in CU 5/1000 Personenjahre in den USA, 4/1000 in Großbritannien und 2/1000 in Skandinavien (34). Neuere Studien aus einer skandinavischen Kohorte erscheinen etwas weniger dramatisch und geben für CU eine Inzidenz von 1,29/1000 Personenjahre an gegenüber 0,82/1000 in der Kontrollgruppe (35).

Therapie

Während Steroide in der Mitte des letzten Jahrhunderts die Therapie entscheidend verändert haben, kamen dann in den weiteren Dekaden 5-Aminosalizylate sowie die klassischen Immunsuppressiva, wie Thiopurine, Methotrexat und Calcineurininhibitoren hinzu. Die in den verschiedenen Phasen der Erkrankung also zur Induktion einer Remission oder einer Remissionserhaltung eingesetzt wurden und auch heute noch ihren Platz in der Therapie haben (36).

In den letzten Jahrzehnten wurden mehrere neue Medikamente auf Basis monoklonaler Antikörper in die klinische CED-Therapie eingeführt. Hierzu gehören als erstes die Antikörper gegen den Tumornekrose-Faktor- α (TNF α), wie Infliximab, Adalimumab und Golimumab. Erst über ein Jahrzehnt später kam es zur Zulassung des darmspezifischen Anti-Integrin-Antikörpers Vedolizumab und kurz darauf der Antikörper gegen die Interleukine (IL)-12/-23. Als letztes wurden als neues *small molecule* ein Januskinase-Inhibitor, das Tofacitinib, für die Therapie der CU zugelassen. Alle diese Substanzen haben dazu beigetragen den Einsatz von Kortikosteroiden zu reduzieren und die Ansprech- und Remissionsraten zu erhöhen. Es gibt Hinweise, dass sowohl bei MC als auch bei CU, einige dieser Medikamente synergistisch die Aktivierung von Immunzellen und Darmentzündungen (z. B.

Azathioprin plus Infliximab) unterdrücken, was das Potenzial von Kombinationstherapien hervorhebt (37, 38). Es besteht jedoch immer noch ein großer ungedeckter Bedarf an Therapieansätzen, da viele Patienten nicht auf die klinisch zugelassenen Arzneimittel ansprechen (37, 39, 40). Daher wird derzeit eine Vielzahl neuer Medikamente in klinischen Studien bei CED getestet (41). Viele dieser neuen Therapieansätze wurden auf der Grundlage von Studien in CED-Mausmodellen, genetischen Studien, Analysen von CED-Geweben und neuen Einblicken in Entzündungswege bei anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis und Psoriasis entwickelt (42-45).

In diesem Zusammenhang haben neue Zytokin- und Signblocker vielversprechende Ergebnisse erbracht und werden wahrscheinlich zukünftig die klinischen Möglichkeiten bei Patienten mit CED erweitern (46, 47). Für die zukünftige Einführung und Zulassung weiterer Medikamente wird die Identifizierung neuer Biomarker von entscheidender Bedeutung sein, um den therapeutischen Erfolg individueller vorherzusagen aber auch zu überwachen, um eine individualisierte Therapie bei CED zu ermöglichen.

Histondeazetylasen

Solche neuen Biomarker oder *Drug Targets* könnten Histondeazetylasen (HDAC) darstellen, welche in den letzten Jahren als Modulatoren der Genexpression nicht nur in der Krebsbiologie in den Vordergrund gerückt sind und für die chemischen Inhibitoren existieren, welche bereits klinisch zugelassen sind, wenn auch bisher ausschließlich für onkologische Anwendungsfälle. HDAC stellen eine hoch konservierte Enzymgruppe dar, die eine wichtige Rolle bei der Genexpression spielen, indem sie den Azetylierungszustand von Lysinresten verändern, welche an den aminoterminalen Enden der Histone lokalisiert sind. Histone setzen sich aus Nukleosomen zusammen, welche wiederum aus je vier Histonen bestehen und die grundlegenden Verpackungseinheiten von Chromosomen darstellen. Durch die Azetylierung der aminoterminalen Enden wird deren positive Ladung neutralisiert und somit die Bindung zwischen Histonen und der negativ-geladenen genomischen Deoxyribonukleinsäure (DNA) geschwächt. Hierdurch wird das Chromatin dekondensiert, Transkriptionsfaktoren können binden und die Gen-Transkription wird erleichtert. Die Bindung an die DNA und somit auch der Packungsgrad des Chromatins hingegen werden gesteigert, wenn Histone deazetyliert werden, was folglich den Kontakt von Transkriptionsfaktoren an deren Zielsequenzen und somit letztlich Transkription erschwert. Die enzymatische Wirkung von HDAC wird deshalb generell mit einer reduzierten Genexpression in Verbindung gebracht.

Die Enzym-Familie der HDAC besteht in Säugetieren aus insgesamt 18 Mitgliedern. Diese werden über verschiedene Kriterien wie Lokalisierung in der Zelle, Anzahl der katalytisch aktiven Zentren, der Homologie zu den entsprechenden Enzymen der Hefe, sowie nicht zuletzt Proteingröße in vier Klassen aufgeteilt. Klasse I setzt sich zusammen aus HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8. Klasse II besteht aus sechs HDAC, die wiederum in zwei Unterklassen unterteilt sind. Hiervon zählt

man HDAC4, HDAC5, HDAC7 und HDAC9 zur Klasse IIa, da diese nur ein einzelnes katalytisch aktives Zentrum aufweisen, während HDAC6 und HDAC10 beide jeweils zwei aktive Zentren enthalten und somit zur Klasse IIb gezählt werden. HDAC11 stellt als einziges Mitglied seine eigene Klasse dar, die Klasse IV HDAC, definiert über phylogenetische Ähnlichkeiten mit Hefe-HDAC. HDAC der Klasse III, die Sirtuine (SIRT1-7), arbeiten nach einem Nicotinamidadeninindinukleotid⁺-abhängigen Mechanismus, der nicht mit den anderen HDAC-Proteinen zusammenhängt, da diese metallionenabhängig katalysieren. Die metallabhängigen HDAC stellen die Ziele von Histondeazetylase-Inhibitoren, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, dar (48).

Histondeazetylase-Inhibitoren

Aufgrund ihrer hoch konservierten Rolle bei der Regulation der Genexpression wurden HDAC über viele Jahre fast ausschließlich mit grundlegenden zellulären Ereignissen, wie Zellwachstum und Differenzierung, sowie daraus folgend in der Entwicklungsbiologie aber auch der Krebsforschung untersucht. Tatsächlich werden HDAC der Klassen I und II bei einigen Krebsarten als überexprimiert beschrieben und haben sich als attraktive Ziele für die Krebstherapie herausgestellt. Mehrere HDAC-Inhibitoren befinden sich in verschiedenen Stadien klinischer Studien oder sind bereits zugelassen und werden in der Klinik eingesetzt. Die klinische Wirkung von HDAC-Inhibitoren zeichnet sich durch Unterdrückung von Tumorzellproliferation, Zelldifferenzierung wird induziert und weitere wichtige Gene, die mit Antikrebseffekten assoziiert sind werden reguliert (z.B. p53). Daher stellen HDAC-Inhibitoren eine vielversprechende nächste Generation von Krebstherapeutika dar, werden aber auch in inflammatorischen bzw. in immunologischen Erkrankungen erprobt (49).

HDAC-Inhibitoren setzen sich zusammen aus einer Metallbindungseinheit, die an das katalytische Metallatom im aktiven HDAC-Zentrum bindet, und einer sogenannten *Capping-Group*, die mit den Aminosäure-Resten des aktiven Zentrums interagiert. Zusätzlich positioniert ein Linker, der strukturell mit der im Azetyl-Lysin-Substrat vorhandenen Kohlenstoffkette verwandt ist, die metallbindende Einheit sowie die *Capping-Group* im aktiven Zentrum (50).

Die Mehrheit der HDAC-Inhibitoren in und außerhalb klinischer Studien hemmt alle HDAC-Isoformen unspezifisch (sogenannte Pan-Inhibitoren). Suberanilohydroxamic acid (SAHA, Vorinostat) und Trichostatin A (TSA) zum Beispiel, sind kanonische Pan-Inhibitoren, welche die katalytische Aktivität von HDAC1–9 hemmen. Es existieren auch selektive HDAC-Inhibitoren, die entweder nur einzelne HDAC-Isoformen oder mehrere Isoformen einer einzelnen Klasse hemmen. Diese sind aus klinischer Sicht interessant, würde dies, im Fall einer therapeutischen Gabe, die Wahrscheinlichkeit von Nebenwirkungen reduzieren. Allerdings stellt das Design selektiver HDAC-Inhibitoren, durch die hohe Sequenzähnlichkeit der aktiven Zentren der Isoformen, eine große Herausforderung dar. Hinzu kommt, dass diese subtilen Unterschiede zwischen den aktiven Zentren durch die kristallographischen Analysen noch nicht endgültig charakterisiert sind (51). Trotzdem gibt

es mittlerweile mehrere klassenselektive und Isoform-selektive HDAC-Inhibitoren, welche innerhalb der letzten Jahre beschrieben und in prä-klinischen aber auch in klinischen Studien erprobt wurden und werden (50).

Klinische Studien

HDAC-Inhibitoren werden anhand ihrer Zugehörigkeit zu chemischen Stoffklassen, in fünf Gruppen unterteilt: Hydroxamsäuren, kurzkettige Fettsäuren, Benzamide, zyklische Tetrapeptide und Sirtuin-Inhibitoren (52). Letztere werden in der vorliegenden Arbeit, genau wie Sirtuine selber, nicht behandelt. Wie in dem Trillium-Immunologie-Artikel „HDAC und HDAC-Inhibition in der klinischen Forschung“ (53) bereits ausführlich dargelegt, finden sich in jeder der restlichen vier Klassen HDAC-Inhibitoren, die momentan in klinischen Studien auf ihr therapeutisches Potenzial getestet werden. Die *United States Food and Drug Administration* (FDA) ließ bereits 2006 Vorinostat als ersten HDAC-Inhibitor zur Therapie des rezidivierenden, refraktären kutanen T-Zell Lymphoms zu (54). Vorinostat ist, genauso wie Belinostat (2014 zugelassen für die Behandlung von peripheren T-Zell Lymphomen) und Panobinostat (2015 zugelassen für die Behandlung von rezidiviertem multiplen Myelom) eine Hydroxamsäure und wirkt als Pan-HDAC Inhibitor (52, 55, 56). Ein weiterer HDAC-Inhibitor, welcher sich schon lange Zeit in der klinischen Anwendung befindet ist die kurzkettige Fettsäure Valproinsäure, welcher allerdings nicht in dieser Funktion eingesetzt wird, sondern in der Behandlung von bipolaren Störungen, Epilepsie aber auch Migräne (52). Aus den zyklischen Tetrapeptiden wurde von der FDA bisher nur Romidepsin, ein Inhibitor spezifisch für HDAC der Klasse I, zur Therapie bei peripherem T-Zell Lymphomen zugelassen (57). Die obigen Zulassungen beziehen sich nur auf die USA, während in Deutschland und Europa die Verwendung von HDAC-Inhibitoren für die klinische Anwendung noch sehr begrenzt ist. Die *European Medicines Agency* (EMA) hat bisher weder Vorinostat noch Belinostat freigegeben. Als einziger HDAC-Inhibitor ist derzeit Panobinostat zugelassen, jedoch nur zur Therapie des multiplen Myeloms und nur als Kombinationstherapie zusammen mit Bortezomib und Dexamethason unter der weiteren Einschränkung, dass mindestens zwei vorherige Behandlungen mit Bortezomib sowie Immunmodulatoren gescheitert sind (Phase-III-Studie PANORAMA-1) (58). Auch in Deutschland, bzw. Europa wird Valproinsäure zur Therapie von Epilepsie und bipolaren Störungen sowie zur Vorbeugung von Migräne herangezogen. Es ist allerdings eine teratogene Wirkung beschrieben, weshalb der Wirkstoff bei Schwangeren nicht eingesetzt werden darf (59).

Derzeit laufen eine große Anzahl hauptsächlich onkologischer Studien, um das therapeutische Potenzial von verschiedenen HDAC-Inhibitoren festzustellen oder auch um neue Anwendungen für Substanzen erschließen zu können, welche sich bereits für andere Krankheiten als sicher erwiesen haben (*second use*). So werden Panobinostat, Vorinostat und Romidepsin, welche von der FDA bereits zugelassen wurden, auch in immunologischen Anwendungsfällen, wie der *Graft-versus-Host-*

Erkrankung, getestet. Für Vorinostat, als Kombinationstherapie mit Tacrolimus und Mycophenolat, wurde bereits eine Phase I/II Studie mit 50 Patienten durchgeführt, welche eine Inzidenzverringerng von 20% für Tag 100 nach Transplantation beschrieb (60). Zur dieser anti-inflammatorischen Wirkung passt, dass mit Vorinostat behandelte Probanden signifikant verminderte Plasmakonzentrationen proinflammatorischer Zytokine aufwiesen. Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Zahl regulatorischer T-Zellen im Blut stark erhöht war (61). Weiterhin wird das Potenzial von Vorinostat bei der Alzheimer-Erkrankung, HIV-Infektion, Epilepsie aber auch Morbus Crohn untersucht. Einen weiteren interessanter HDAC-Inhibitor stellt Givinostat (ITF2357) dar, für den alleine derzeit 17 klinische Studien angemeldet sind, wobei besonders die Studien zur juvenilen idiopathischen Arthritis die anti-inflammatorische Wirkung dieses Wirkstoffes demonstrieren (62, 63). Hier wiesen fünf von neun Patienten eine signifikante Verringerung des *Disease Activity Scores* bei nur schwachen Nebenwirkungen auf. Auch die Zahl der Neutrophilen im Blut und die Konzentration proinflammatorischer Zytokine im Serum waren bei mehreren Patienten signifikant reduziert (64).

Moderne HDAC-Inhibitoren sind meist synthetische Stoffe, die zur Erhöhung der Wirksamkeit optimiert wurden. HDAC-Inhibitoren kommen jedoch auch in der Natur vor und werden beispielsweise von Bakterien oder Pilzen produziert. Einer der bekanntesten HDAC-Inhibitoren, Trichostatin A stammt aus dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* und galt zunächst als fungistatisches Antibiotikum (65), bevor auch dessen inhibitorischen Effekte auf HDAC erkannt wurden (66). Weitere Beispiele sind Depudecin sowie die zyklischen Tetrapeptide Trapoxin und Apicidin, die in verschiedenen Pilzen gefunden wurden, jedoch aufgrund ihrer Toxizität nicht für den therapeutischen Gebrauch geeignet sind (66). Ein weiterer in der Forschung häufig verwendeter HDAC-Inhibitor entsteht durch bakterielle Fermentierung von Ballaststoffen im menschlichen Kolon, das Butyrat. Für diesen Wirkstoff wurde gezeigt, dass er über mehrere Mechanismen positiv auf die Darmhomöostase wirken kann, unter anderem über dessen HDAC-Inhibitor-Wirkung. Es stärkt die Darmbarriere, moduliert das intestinale Immunsystem und wirkt entzündungs- sowie tumorhemmend (67). Auch außerhalb des Darmes konnte Butyrat erfolgreich getestet werden, um beispielsweise das Wachstum von Krebszellen zu hemmen oder zur Anregung von Knochenwachstum, Neurogenese bei ischämischen Gehirnschäden oder fetaler Hämoglobinexpression in hämatologischen Erkrankungen, wie Thalassämie oder Sichelzellanämie (68). Butyrat zeigt jedoch nur eine kurze Halbwertszeit im Organismus, bzw. wird sehr schnell in der Leber abgebaut, was einerseits den therapeutischen Nutzen einschränkt, andererseits je nach Anwendungsfall auch Vorteile bieten kann (68).

Präklinische Studien

HDAC-Inhibitoren werden in unzähligen präklinischen Studien eingesetzt, hauptsächlich, wie auch in der Klinik, in verschiedenen Tumor-Modellen, aber auch in Modellen chronischer Inflammation bzw. immunologischer Dysregulation. Eine der ersten Veröffentlichungen zu diesem Thema erschien 2002

in *PNAS* (69) bzw. 2005 in *Molecular Medicine* (70) als Zusammenarbeit zwischen der Gruppe von Charles A. Dinarello und Italfarmaco, dem Hersteller des HDAC-Inhibitors GIVINOSTAT (Givinostat). In beiden Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass die Hydroxaminsäuren Vorinostat und Givinostat in verschiedenen Mausmodellen nach oraler Gabe eine anti-inflammatorische Wirkung aufweisen. Wobei die anti-inflammatorische Wirkung bereits bei einer Größenordnung niedrigeren Konzentration, als für Krebsmodelle verwendet wurden, auftrat. Seither konnte die immunologische Wirkung der HDAC-Inhibitoren für verschiedenste Modelle immer wieder bestätigt werden. Diese anti-inflammatorische Wirkung speziell bei CED ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit und wird in den beigefügten Publikationen dargelegt und im Diskussionsteil ausführlich besprochen. Wir konnten für Vorinostat, Givinostat aber auch für Valproinsäure besagten anti-inflammatorischen Effekt zeigen und auf spezifische Zelltypen und definierte molekulare intrazelluläre Mechanismen zurückführen und mit HDAC5 ein mögliches Ziel-HDAC beschreiben.

Auch für andere Modelle bzw. Erkrankungen konnte eine positive Wirkung dieser Substanzklasse gezeigt werden. So reduzieren HDAC-Inhibitoren (Phenylbutyrat, TSA und Romidepsin) die Wirkung von Entzündungen und Knochenzerstörung in Tiermodellen mit rheumatoider Arthritis. Rheumatoide Arthritis Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten, aus Arthritis-Patienten, die mit Vorinostat behandelt wurden, induzierten Apoptose über die Erzeugung von ROS und unterdrückten *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B)-Aktivierung sowie die Expression anti-apoptotischer Proteine. TSA hemmt die Lebensfähigkeit dieser Zellen und reduzierte die Expression von Matrixmetalloproteasen, Phosphoinositid-3-Kinasen und Protein-Kinase B. Der spezifische HDAC6-Inhibitor CKD-L verringert den Arthritis-Score im Kollagen-induzierten Arthritis-Modell und verringerte außerdem die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF α und IL-1 α bei Patienten mit rheumatoider Arthritis. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in CKD-L behandelten Mäusen die Expression des Immun-Checkpoint-Proteins *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* sowie die supprimierende Funktion von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) hochreguliert wird. Auch für das Modell der multiplen Sklerose, die experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) konnte gezeigt werden, dass eine TSA-Behandlung die Expression verschiedener Schlüssel-Gene reduziert. Auch Vorinostat unterdrückt dendritische Zellen und dendritische Zellen vermittelte T-Helfer (Th)1- und Th17-Zellfunktionen bei EAE *in vivo*. Was den systemischen Lupus Erythematodes (SLE) angeht, so wurden im Tiermodell, aber auch bei SLE-Patienten abweichende HDAC-Spiegel gemessen und die HDAC-Inhibitoren TSA, Vorinostat, Panobinostat und Givinostat wurden in Lupus-Modellen *in vivo* als wirksam beschrieben. Und wiederum konnte die selektive Hemmung von HDAC6, hier durch ACY-738, die Pathogenese der Krankheit im SLE-Tiermodell verringern (71).

Ein zunehmend wichtiger werdendes Feld in der (klinischen) Immunologie ist die Tumorummunologie bzw. die Immuntherapie bei Krebserkrankungen. HDAC-Inhibitoren werden in der Krebstherapie

erprobt oder gar eingesetzt und sollen hier direkt als wachstumshemmende bzw. Apoptose induzierende Wirkstoffe auf Krebszellen wirken. Inwiefern können jedoch Immunzellen direkt angesprochen werden im Sinne einer Verbesserung der immunologischen Tumorabwehr?

Myeloide Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegen Krebs. Dendritische Zellen und tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) wirken als Antigen-präsentierende Zellen (APC) und sind wesentliche Bestandteile der Tumor-Mikroumgebung. TAMs können eine Reihe von Funktionszuständen annehmen, von Tumor-fördernden sogenannten M2-ähnlichen (*M2-like*) Makrophagen, welche Tumorstadium, Neovaskularisierung und Metastasierung fördern, bis hin zum pro-inflammatorischen und tumorbekämpfenden sogenannten M1-Phänotyp. Die beiden wichtigsten therapeutischen Ansätze verfolgen entweder die generelle Makrophagen-Depletion oder deren „Umschulung“ in Richtung des M1-Phänotyps. Hier konnte z. B. gezeigt werden, dass TMP195, ein spezifischer Inhibitor von Klasse-IIa-Histonen, in einem Mausmodell für Brustkrebs die Anzahl an immunsuppressiven M2-like-Makrophagen senkt und die der anti-tumorigenen M1-Makrophagen erhöht, indem zirkulierende Monozyten in den Tumor rekrutiert werden. Eine gemischte Population von unreifen myeloiden Zellen, zusammenfassend als myeloide Suppressorzellen bezeichnet (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC), reichern sich als direkte Folge von Krebserkrankungen an. Diese Anreicherung von suppressiven MDSC konnte durch die Gabe des HDAC-Inhibitors Entinostat reduziert werden (72), welcher sich derzeit in klinischen Studien in Kombination mit Checkpoint-Inhibitoren für eine Reihe von Krebserkrankungen beim Menschen befindet. Da letztlich die immunologische Tumorbekämpfung von der Aktivität der zytotoxischen Tumorzellen abhängt, und es einige Studien gibt, die zeigen, dass HDAC-Inhibitoren die Antigenpräsentation durch APC u.a. Makrophagen und somit die Aktivierung von T-Zellen hemmt, bleibt fraglich, ob eine immunologische Wirkung dieser Substanzen in dieser Anwendung Vorteile bringt (73).

Nichtsdestotrotz zeigt eine Studie von Guerriero *et al.*, dass *in vivo*, in einem Makrophagen-abhängigen Brustkrebs-Mausmodell die Behandlung mit TMP195, einem selektiven HDAC Klasse-IIa-Inhibitor, die Tumor-Mikroumgebung verändert, die Tumor-Belastung sowie Lungenmetastasen durch eine Verschiebung der vorhandenen Makrophagen-Phänotypen reduziert werden. TMP195 induziert die Rekrutierung und Differenzierung von stark phagozytierenden und stimulierenden Makrophagen in den Tumoren bzw. der Tumor-Mikroumgebung. Darüber hinaus verbessert die Kombination von TMP195 mit Chemotherapie oder T-Zell-Checkpoint-Inhibitoren die Tumorreduktion in diesem Modell. In dieser Studie wird betont, dass die neuartigen selektiven kompetitiven Klasse-IIa-HDAC-Inhibitoren (zum Beispiel TMP195), im Gegensatz zum Klasse-I-selektiven HDAC-Inhibitor Vorinostat, die Expression von Monozyten-Genen beeinflussen, jedoch nicht die von Lymphozyten. Die HDAC-Hemmung der Klasse IIa führte auch dazu, dass Monozyten verstärkt zu einem pro-inflammatorischen Typ-1-Phänotyp hin polarisiert werden. Die Ergebnisse zeigen einen immunstimulatorischen Effekt der HDAC-Hemmung der Klasse IIa, im Gegensatz zu

therapeutischen Strategien der Depletion oder Hemmung von TAM (74).

Natürliche Histondeazetylase-Inhibitoren

Der Gastrointestinaltrakt wird von einer hohen Dichte von Kommensalbakterien besiedelt, welche kurzkettige Fettsäuren (z.B. Butyrat) über bakterielle Fermentation von Ballaststoffen im Dickdarmlumen produzieren. Butyrat fördert die Funktion der Darmepithelbarriere, reguliert den Stammzellumsatz in Darmepithelkrypten und erhöht die Anzahl von T_{reg} im Dickdarm, indem es die Histondeazetylase-Aktivität am *forkhead box P3(Foxp3)*-Locus hemmt (75).

In der Darmschleimhaut und in Stuhlproben von Patienten mit entzündlicher Darmerkrankung oder Dickdarmkrebs wurde eine verringerte Anzahl von Butyrat-produzierenden Bakterien nachgewiesen (76). Intestinale Phagozyten, insbesondere gewebsresidente Makrophagen, wirken als angeborene Barriere im Darm, indem sie eindringende Bakterien beseitigen. Eine Fehlfunktion dieses Signalwegs ist an der Pathogenese der CED beteiligt. Schulthess *et al.* aus dem Powrie-Labor konnten kürzlich zeigen, wie Butyrat die Makrophagenfunktion zu beeinflussen vermag, insbesondere, wie Stoffwechsel- und Transkriptionsänderungen in Makrophagen induziert werden, welche dann deren bakteriziden Funktionen verbessert (77).

Wie oben bereits beschrieben polarisieren HDAC3-Knockout-Makrophagen stärker in Richtung eines M2-Phänotyps, wenn sie mit IL-4 stimuliert werden (78) bzw. sie werden IL-4-hypersensitiv nach Gabe von Klasse-I-HDAC-Inhibitoren. Diese Funktion ist jedoch kontextabhängig und erfordert tatsächliche IL-4-Signale. Diese Studien konnten von Schulthess *et al.* aus der Arbeitsgruppe von Fiona Powrie bestätigt und erweitert werden. Es wurde gezeigt, dass Butyrat als HDAC3-Inhibitor, einen spezifisch anti-mikrobiellen Makrophagenphänotyp induziert, indem speziell HDAC3 in besagten Makrophagen gehemmt wird. Dies geschieht unabhängig von einer veränderten Zytokinproduktion durch inflammatorische Prozesse. Zusammengefasst beschreiben diese Arbeiten ein Modell, in dem Butyrat eine entzündungsunabhängige und antimikrobielle Funktion in Makrophagen prägt, welche die intestinale Homöostase aufrechterhält. Hier kommt hinzu, dass die Gabe von Antibiotika in jungen Jahren das Risiko später eine CED zu entwickeln erhöht. Weiterhin wurde bereits beschrieben, dass Butyratmangel nach einer Behandlung mit Breitbandantibiotika auftreten kann. Das heißt, es wäre denkbar, dass man mit der Gabe von Butyrat, eine Störung der antimikrobiellen Funktion von intestinalen Makrophagen beheben und somit der Entstehung einer CED entgegenwirken kann (77).

Zielsetzung

Ziel der hier zusammengefassten Arbeiten war der Nachweis der anti-inflammatorischen Wirkung von HDAC-Inhibitoren speziell in Modellen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sowie die Beschreibung möglicher molekularer und zellulärer Mechanismen. Hierfür sollten in den entsprechenden Modellen mehrere pan-HDAC-Inhibitoren eingesetzt, die klinische Wirkung beschrieben und die beteiligten Wirkmechanismen identifiziert werden, indem Veränderungen der Gesamt-Entzündungswerte auf zellulärer Ebene bestätigt werden sollten. Hierzu wurden HDAC-abhängige Veränderungen im Phänotyp der Immunzellen, speziell von T-Helferzellen, aber auch von Makrophagen identifiziert. Zusätzlich sollte die direkte Wirkung, der HDAC-Inhibitoren auf die Integrität der intestinalen Barriere und somit auf intestinale Epithelzellen - auch im Zusammenhang der Entzündungs-assoziierten Tumorgenese - gezeigt werden. Letztendlich sollte auf intrazellulärer bzw. molekularer Ebene der Effekt von HDAC-Inhibitoren untersucht werden, was fundamentale Entzündungswege wie den NF- κ B-Signaltransduktionsweg, aber auch über die Untersuchung der Rolle einzelner HDAC, d.h. die Suche nach möglichen direkten Zielen der Wirkstoffe miteinschließt.

Eigene Arbeiten

Glauben, R., Batra A., Fedke I., Zeitz M., Lehr H. A., Leoni F., Mascagni P., Fantuzzi G., Dinarello C. A., and Siegmund B. Histone hyperacetylation is associated with amelioration of experimental colitis in mice. *Journal of immunology*. 2006;176(8):5015-22_ DOI: 10.4049/jimmunol.176.8.5015

Glauben, R., Batra A., Stroh T., Erben U., Fedke I., Lehr H. A., Leoni F., Mascagni P., Dinarello C. A., Zeitz M., and Siegmund B. Histone deacetylases: novel targets for prevention of colitis-associated cancer in mice. *Gut*. 2008;57(5):613-22_Doi: 10.1136/gut.2007.134650

Glauben, R., Sonnenberg E., Wetzl M., Mascagni P., and Siegmund B. Histone deacetylase inhibitors modulate interleukin 6-dependent CD4⁺ T cell polarization in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(9):6142-51_Doi: 10.1074/jbc.M113.517599

Poralla, L., Stroh T., Erben U., Sittig M., Liebig S., Siegmund B., and Glauben R. Histone deacetylase 5 regulates the inflammatory response of macrophages. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2015;19(9):2162-71_Doi: 10.1111/jcmm.12595

Friedrich, M., Gerbeth L., Gerling M., Rosenthal R., Steiger K., Weidinger C., Keye J., Wu H., Schmidt F., Weichert W., Siegmund B., and Glauben R. HDAC inhibitors promote intestinal epithelial regeneration via autocrine TGFbeta1 signalling in inflammation. *Mucosal immunology*. 2019_Doi: 10.1038/s41385-019-0135-7

Histondeazetylase-Inhibitoren in Modellen experimenteller Kolitis

Glauben, R., Batra A., Fedke I., Zeitz M., Lehr H. A., Leoni F., Mascagni P., Fantuzzi G., Dinarello C. A., and Siegmund B. Histone hyperacetylation is associated with amelioration of experimental colitis in mice. *Journal of immunology*. 2006;176(8):5015-22, DOI: 10.4049/jimmunol.176.8.5015

Für Pan-HDAC-Inhibitoren konnte bereits eine anti-inflammatorische Wirkung sowohl *in vitro* als auch in verschiedenen Entzündungsmodellen *in vivo* gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage beantwortet werden ob sich diese auch in Modellen experimenteller Kolitis zeigen würden. Weiterhin war für uns von großem Interesse, ob sich dieser anti-inflammatorische Effekt auch für andere Pan-HDAC-Inhibitoren als die Hydroxamsäure Vorinostat, vor allem die bereits für neurologische Erkrankungen zugelassene Valproinsäure, zeigen würden.

Wir verglichen zunächst die anti-inflammatorische Wirkung der Pan-HDAC-Inhibitoren Vorinostat, Apicidin, Trichostatin A aber auch Valproinsäure *in vitro*, sowohl in humanen mononukleären Zellen des peripheren Bluts als auch in murinen mononukleären Zellen der Lamina propria. Bemerkenswerterweise trat die anti-inflammatorische Wirkung bei Konzentrationen eine oder sogar zwei Größenordnungen unterhalb der ursprünglich in diversen Krebsstudien beschriebenen proapoptotischen Wirkung auf. Für alle untersuchten HDAC-Inhibitoren ging die anti-inflammatorische Wirkung, gezeigt durch eine Suppression pro-inflammatorischer Zytokine, wie Interferon- γ (IFN γ), Hand in Hand mit einer erhöhten Histonazetylierung. Weitergehend wurde in der vorliegenden Studie gezeigt, dass Vorinostat eine deutlich protektive Wirkung in der akuten Dextran-Natriumsulfat (DSS)-induzierten Kolitis aufweist, sowohl bei prophylaktischer (von Tag 0 der DSS-Exposition an) als auch bei therapeutischer (ab Tag 5 nach Beginn der DSS-Exposition) Gabe. Für Valproinsäure konnte ebenfalls gezeigt werden, dass im Kolutismodell eine anti-inflammatorische Wirkung möglich ist, wenn auch gegenüber Vorinostat, in abgeschwächter Form. Sowohl die makroskopischen als auch histologischen Endpunkte konnten durch eine Reduktion der Produktion pro-inflammatorischen Zytokine in *ex vivo* isolierten T-Zellen und Makrophagen bestätigt werden.

Wir konnten also zeigen, dass einerseits Pan-HDAC-Inhibitoren in, zumindest für Mäuse, verträglichen Dosen als anti-inflammatorisches Therapeutikum in Kolutismodellen geeignet sind, dass die Wirkung tatsächlich auf die Immunzellen abzielt sowie das zugelassene Medikament Valproinsäure ebenfalls seine anti-inflammatorische Wirkung in Verbindung mit der Deazetylase-Hemmung ausübt.

Glauben, R., Batra A., Fedke I., Zeitz M., Lehr H. A., Leoni F., Mascagni P., Fantuzzi G., Dinarello C. A., and Siegmund B. Histone hyperacetylation is associated with amelioration of experimental colitis in mice. *Journal of immunology*. 2006;176(8):5015-22
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.8.5015>

Histondeazetylase-Inhibitoren in Modellen inflammationsassoziiierter Tumorgenese

Glauben, R., Batra A., Stroh T., Erben U., Fedke I., Lehr H. A., Leoni F., Mascagni P., Dinarello C. A., Zeitz M., and Siegmund B. Histone deacetylases: novel targets for prevention of colitis-associated cancer in mice. *Gut*. 2008;57(5):613-22_DOI: 10.1136/gut.2007.134650

Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen weisen ein hohes Risiko für die Entwicklung von entzündungsassoziierten Tumoren im Kolon auf. Da für HDAC-Inhibitoren sowohl eine anti-proliferative als auch eine pro-apoptotische Wirkung beschrieben wurde und diese auch bereits in Tumormodellen erfolgreich getestet wurde, sollte in dieser Studie untersucht werden, ob die von uns beschriebene anti-inflammatorische Wirkung in Modellen entzündungsassoziiierter Tumorgenese einen additiven Effekt auf die Hemmung der Entstehung und des Wachstums der Tumore hat.

Wir führten hierfür das Azoxymethan/ Dextran-Natriumsulfat (AOM/DSS)-Modell sowie das IL-10-Knockout-Modell der entzündungsassoziierten Tumorgenese durch. Für beide Modelle konnten wir bei Behandlung mit einem Pan-HDAC-Inhibitor sowohl eine geringere Anzahl als auch eine geringere Größe der entstehenden Tumore zeigen. Weiterhin testeten wir die Wirksamkeit des neuen pan-HDAC-Inhibitors Givinostat einer Hydroxamsäure, in verschiedenen Kolitis-Modellen, auch im direkten Vergleich zu Vorinostat. Givinostat erwies sich in allen Modellen, auch in der entzündungsassoziierten Tumorgenese als wirksam und dem Vorinostat deutlich überlegen. Zusätzlich konnten wir einen möglichen Mechanismus beschreiben, wie die gezeigte Wirkung zustande kommt. Darmgewebe von HDAC-Inhibitor behandelten Mäusen zeigte eine deutlich verringerte p65-Lokalisierung im Zellkern und somit eine deutlich verringerte NF- κ B-Aktivierung auf. Dieser Effekt konnte in *in vitro*-Experimenten an Zelllinien bestätigt werden. Eine verminderte NF- κ B-Aktivierung konnte früher bereits mit einer reduzierte Tumorgenese assoziiert werden (79).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beiden HDAC-Inhibitoren Givinostat und Vorinostat in verschiedenen Kolitis-Modellen nicht nur eine anti-inflammatorische Wirkung ausüben, sondern dass auch Tumorentstehung und -wachstum gehemmt werden können, und dass diese Effekte, zumindest teilweise, NF- κ B-abhängig sind.

Glauben, R., Batra A., Stroh T., Erben U., Fedke I., Lehr H. A., Leoni F., Mascagni P., Dinarello C. A., Zeitz M., and Siegmund B. Histone deacetylases: novel targets for prevention of colitis-associated cancer in mice. *Gut*. 2008;57(5):613-22
<https://doi.org/10.1136/gut.2007.134650>

Wirkung von Histondeazetylase-Inhibitoren auf T-Helferzellen und Makrophagen

Glauben, R., Sonnenberg E., Wetzel M., Mascagni P., and Siegmund B. Histone deacetylase inhibitors modulate interleukin 6-dependent CD4⁺ T cell polarization in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(9):6142-51_DOI: 10.1074/jbc.M113.517599

Nachdem wir in mehreren Arbeiten und Modellen gezeigt hatten, dass Pan-HDAC-Inhibitoren, und hier insbesondere Givinostat, in Kollitismodellen therapeutisch wirksam sind, stellte sich die Frage, welche Zelltypen in der intestinalen Entzündung beeinflusst werden, und ob es einen immunologischen Mechanismus jenseits der bereits gezeigten Hemmung der NF- κ B-Aktivität gibt.

Hierfür behandelten wir verschiedene Zellpopulationen mit Givinostat oder Vorinostat und konnten zeigen, dass die Expression verschiedener Zytokine dosisabhängig gehemmt wird. Insbesondere CD4⁺ T-Zellen scheinen hiervon betroffen zu sein. Untersucht man dieses Phänomen genauer, so stellt man fest, dass zwar die T-Helferzell-Polarisierung in Th1- oder Th2-Zellen durch die Inkubation mit HDAC-Inhibitoren nicht verändert wird, dass aber die Polarisierung zu regulatorischen T-Zellen (Treg) und Th17-Zellen stark beeinflusst wird. In Anwesenheit von HDAC-Inhibitoren wird die Polarisierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu T_{reg} verstärkt, und die Polarisierung zu pro-inflammatorischen Th17-Zellen supprimiert. Diese *in vitro*-Experimente konnten wir auch im DSS-Kollitismodell bestätigen: sowohl im Kolon als auch in mesenterialen Lymphknoten stieg die Zahl der Tregs nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren und die Anzahl der Th17-Zellen sank. Die *in vitro*-Polarisierung von Tregs oder Th17-Zellen unterscheidet sich hauptsächlich in der Gabe von IL-6, relevant für die Th17-Polarisierung. Untersucht man nun die Expression von IL-6, aber auch vom IL-6-Rezeptor (IL-6R), so stellt man fest, dass beides nach Givinostat-Behandlung der Zellen stark reduziert ist. Der membranständige IL-6R wird auf T-Zellen ausschließlich auf naiven-T-Zellen exprimiert und diese Expression wurde in unseren Experimenten tatsächlich dosisabhängig gehemmt. Zusätzlich konnten wir diese Hemmung auf eine Hyperazetylierung der *IL6*-Rezeptor-Promotorregion des Chromatins zurückführen, während das *IL-6-R*-Gen nach HDAC-Inhibitor-Behandlung hypoazetyliert vorliegt.

Die Hemmung der Th17-Polarisierung durch ein reduziertes IL-6-Signal konnten wir auch abwärts der Signaltransduktionskette bestätigen: sowohl die STAT3-Phosphorylierung war gehemmt, als auch die *RAR-related orphan receptor gamma t*-Expression der T-Zellen war reduziert. Abschließend konnten wir den gleichen Effekt für Makrophagen bestätigen, auch hier war sowohl die IL-6-Expression aber auch die Expression des membranständigen IL-6R nach Givinostat-Behandlung reduziert.

Wir konnten in dieser Studie also zeigen, dass ein Wirkmechanismus von HDAC-Inhibitoren in Kollitismodellen die Hemmung des IL-6-Signalweges darstellt, mit direkten Auswirkungen auf die

Polarisierung der für die intestinale Homöostase kritischen Zellpopulationen T_{reg} und Th17-Zellen, hin zu einer anti-inflammatorischen Immunantwort.

Glauben, R., Sonnenberg E., Wetzel M., Mascagni P., and Siegmund B. Histone deacetylase inhibitors modulate interleukin 6-dependent CD4⁺ T cell polarization in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(9):6142-51
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.517599>

Bedeutung der Histondeazetylase 5 auf die inflammatorische Antwort von Makrophagen

Poralla, L., Stroh T., Erben U., Sittig M., Liebig S., Siegmund B., and Glauben R. Histone deacetylase 5 regulates the inflammatory response of macrophages. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2015;19(9):2162-71_DOI: 10.1111/jcmm.12595

Unsere bisherigen Arbeiten zielten darauf ab, die anti-inflammatorische Wirkung von HDAC-Inhibitoren zu untersuchen und potentielle Wirkmechanismen zu identifizieren. Bisher beschränkten sich diese Arbeiten auf Pan-HDAC-Inhibitoren, welche die enzymatische Wirkung von allen elf HDAC inhibieren. Damit bleibt bislang die Funktion und Relevanz der einzelnen HDAC unklar. Expressionsdaten aus Vorarbeiten deuteten darauf hin, dass HDAC5 bei Makrophagen möglicherweise eine kritische Funktion einnehmen könnte. Dies sollte in der vorliegenden Arbeit im Detail untersucht werden.

Hdac5 erwies sich als von allen Klasse-II-HDAC, in den von uns getesteten Makrophagen-Zelllinien, den humanen U937- und den murinen RAW263.4-Zellen, als am höchsten exprimiert. Stimuliert man diese Zellen mit den Toll-like-Rezeptor-Agonisten Lipopolysaccharid oder CpG, so wird die *Hdac5*-Expression innerhalb der ersten fünf Minuten leicht, aber statistisch signifikant, heraufreguliert, gefolgt von einem mehr als 60%igen Abfall der Expression. Nach 24 h kehrte die Expression wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Dies passte zu dem Konzept einer schnellen Antwort auf z.B. akute Infektionen, in denen die Zellen, insbesondere Makrophagen als die *first line of defense*, extrem schnell reagieren müssen. Dieser Abfall der *Hdac5*-Expression wurde außer durch die besagten Toll-like-Rezeptor-Agonisten nur noch durch IFN γ ausgelöst, aber durch kein anderes getestetes Zytokin. Funktionell konnten wir zeigen, dass die Expression pro-inflammatorischer Zytokine direkt mit der Expression von *Hdac5* zusammenhängt: wurde die Expression von *Hdac5* durch *small interfering* (si)RNA unterdrückt, so wurde auch die Expression von TNF α gehemmt. Wurde die *Hdac5* überexprimiert, so stieg auch die Expression von TNF α . Diese Expressionsänderung von TNF α und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen ging einher mit einer Aktivierung von NF- κ B.

Wir konnten in der vorliegenden Studie also zeigen, dass ein einzelnes HDAC, hier HDAC5, in der Lage ist, zentrale zelluläre Vorgänge wie die NF- κ B-Aktivierung zu regulieren und dass HDAC5 auch in Makrophagen, also in der frühen Infektionsabwehr des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle spielt.

Poralla, L., Stroh T., Erben U., Sittig M., Liebig S., Siegmund B., and Glauben R. Histone deacetylase 5 regulates the inflammatory response of macrophages. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2015;19(9):2162-71
<https://doi.org/10.1111/jcmm.12595>

Bedeutung von Histondeazetylasen für die intestinale epitheliale Barriere in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Friedrich, M., Gerbeth L., Gerling M., Rosenthal R., Steiger K., Weidinger C., Keye J., Wu H., Schmidt F., Weichert W., Siegmund B., and Glauben R. HDAC inhibitors promote intestinal epithelial regeneration via autocrine TGFbeta1 signalling in inflammation. *Mucosal immunology*. 2019_Doi: 10.1038/s41385-019-0135-7

Neben der aktiven Immunantwort, gibt es andere Faktoren, welche eine wichtige Rolle in der Pathogenese von CED spielen. Ein wichtiger Aspekt ist der Erhalt der intestinalen epithelialen Barriere, bzw. die Zerstörung derselben. Da HDAC-Inhibitoren ursprünglich als pro-inflammatorisch und anti-apoptotisch beschrieben wurden, stellte sich die Frage, ob der Einsatz dieser Wirkstoffe sich zwar positiv auf die lokale Immunreaktion auswirkt, aber vielleicht unerwünschte Effekte auf die epitheliale Regeneration haben könnte.

Als erstes analysierten wir die Expression aller HDAC in intestinalen Epithelzellen, isoliert aus Kolonbiopsien von CED-Patienten sowie gesunden Kontrollen. Hierbei zeigte sich, dass für fast alle HDAC unter akuten inflammatorischen Bedingungen eine differentielle Expression nachzuweisen ist. Als nächstes untersuchten wir, ob eine Behandlung mit den Pan-HDAC-Inhibitoren Vorinostat und Givinostat, die Integrität der epithelialen Barriere, bzw. die Störung der Barriere durch pro-inflammatorische Zytokine, regulieren konnte. Hierfür nutzten wir murine und humane intestinale Epithelzelllinien in Transwell-Systemen und analysierten den elektrischen Widerstand und den Durchtritt künstlicher Partikel von definierter Größe. Wir konnten hier eindeutig demonstrieren, dass die HDAC-Inhibitoren die Integrität der Barriere im *steady state* nicht beeinflussen, dass diese Wirkstoffe die Barriere aber unter pathologischen Bedingungen schützen, bzw. in der Lage sind eine Störung der Barriere zu reduzieren. Auch waren die HDAC-Inhibitoren in der Lage, in einem *in vitro* Wundheilungs-Experiment, die Wunde schneller schließen zu lassen. Dieser Schutz der Barriere ging einher mit der Herabregulierung von sogenannten porenbildenden *Tight Junction*-Proteinen und mit einer Heraufregulierung zellverbindender Proteine. Zurückführen konnten wir diesen regenerativen, barrierschützenden Effekt auf eine erhöhte Expression der protektiven Zytokine IL-8 und *transforming growth factor beta* (TGFβ). Dies konnten wir nicht nur in Experimenten mit Zelllinien zeigen, sondern auch in murinen 3D-Organoidkulturen aus Dünndarmzellen bestätigen.

Wie wirkt sich jedoch dieser Effekt auf die tatsächliche Wundheilung des Darmepithels *in vivo* in einem Kolitismodell aus? In dem Modell der DSS-induzierten Kolitis, welches auf einer Zerstörung der epithelialen Barriere durch die orale Gabe von DSS beruht, konnten wir zeigen, dass Givinostat tatsächlich die Regeneration der Barriere signifikant beschleunigt. Als Endpunkte diente uns hier die beschleunigte Regeneration des Körpergewichtes der Mäuse, histologische Untersuchungen des

Kolons nach Versuchsende. Wesentlich waren jedoch die *in vivo*-Barriere-Versuche mittels oral gegebenen, fluoreszierenden Partikeln, welche dann im Blut quantifiziert wurden. Diese waren in Givinostat behandelten Tieren deutlich reduziert. Die verbesserte Wundheilung konnten wir in einem mechanischen Wundheilungsmodell bestätigen, in welchem bei einer Endoskopie mittels einer endoskopischen Zange Wunden im Kolon gesetzt wurden. Auch hier schlossen sich die Wunden schneller, wenn die Mäuse mit Givinostat behandelt wurden.

Wir konnten in dieser Studie also zeigen, dass HDAC-Inhibitoren nicht nur, wie bislang gezeigt, die inflammatorische Immunantwort unterdrücken, sondern dass auch ein weiterer kritischer Faktor in CED, die Regeneration der epithelialen Barriere, positiv beeinflusst wird. Dies konnten wir auf eine erhöhte Expression von IL-8 und TGF β und einer darauffolgenden differentiellen Expression von kritischen *Tight Junction*-Proteinen zurückführen.

Friedrich, M., Gerbeth L., Gerling M., Rosenthal R., Steiger K., Weidinger C., Keye J., Wu H., Schmidt F., Weichert W., Siegmund B., and Glauben R. HDAC inhibitors promote intestinal epithelial regeneration via autocrine TGFbeta1 signalling in inflammation. *Mucosal immunology*. 2019

<https://doi.org/10.1038/s41385-019-0135-7>

Diskussion

HDAC-Inhibition in Modellen experimenteller Kolitis

Das von uns hauptsächlich benutzte und auch schon in der Einleitung beschriebene Givinostat, ein pan-HDAC-Inhibitor der Klassen I und II, ist zusammen mit Vorinostat einer der wenigen HDAC-Inhibitoren, welcher im Rahmen klinischer Studien auf seine therapeutische Wirkung bei Autoimmunerkrankungen untersucht wurde. Sowohl *in vitro*- (humane Primärzellen) als auch *in vivo*, in Mausmodellen, zeigte Givinostat eine starke entzündungshemmende Wirkung, indem wichtige Akteure des angeborenen und des adaptiven Immunsystems beeinflusst wurden. Die mit Givinostat behandelten NZB/W-Mäuse, ein SLE-Modell, zeigten eine verminderte Krankheitsaktivität und ein erhöhtes Überleben. Dies wurde durch eine Abnahme der Ablagerung von anti-nukleären Antikörpern und Immunkomplexen, eine Verbesserung der Nierenhistopathologie, eine Abnahme des entzündungsfördernden Zytokins IL-1 β und eine Zunahme des entzündungshemmenden Zytokins TGF β definiert. Zusätzlich wurde ein erhöhter Prozentsatz an T_{reg}-Zellen und eine verringerte Anzahl an IL-17-produzierenden Zellen in der Milz beobachtet. Darüber hinaus zeigte die Behandlung mit Givinostat in einem Arthritis-Mausmodell eine Verringerung der Gelenkschwellung und des Zellzustroms in die Gelenkhöhle. Es wurde eine verminderte Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β durch Synovialgewebe nachgewiesen, was zu einer starken Hemmung der Knochenresorption führte (80). Diese vielversprechenden Ergebnisse aus präklinischen (Tier-) Studien führten dazu, dass Givinostat als potenzielle therapeutische Behandlung bei Autoimmunerkrankungen beim Menschen weiter untersucht wurde (63).

Therapeutischer Effekt von HDAC-Inhibitoren in intestinaler Entzündung

Über die letzten Jahre konnte unsere Gruppe Daten zum Verständnis der Wirkung von HDAC-Inhibitoren in Krankheitsmodellen, genauer gesagt in CED-Modellen beitragen. CED bezeichnet verschiedene, den Darm betreffende chronische Autoimmunerkrankungen, von denen die wichtigsten Colitis ulcerosa sowie Morbus Crohn darstellen. Beide Erkrankungen wurden in der Einleitung bereits eingeführt. Es gibt verschiedene Modelle für chemisch induzierte, experimentelle Kolitis, die jeweils spezifische Merkmale der menschlichen Krankheit aufweisen. Beispielsweise werden die Modelle der Trinitrobenzol- und Oxazolone-induzierten Kolitis als überwiegend Th1- bzw. Th2-vermittelte Kolitismodelle beschrieben. Im Gegensatz dazu ist das Modell der akuten kurzzeitigen DSS-induzierten Kolitis kein immunologisches Modell im eigentlichen Sinne, sondern ein Modell der Barrierestörung, die aus der Destruktion der Epithelbarriere resultiert. Nichtsdestotrotz ist dieses Modell gut etabliert und wird vielfach benutzt, um neue pharmakologische Verbindungen auf ihre entzündungshemmende Wirkung zu untersuchen. Die entzündungshemmende Wirksamkeit von HDAC-Inhibitoren wurde von uns in verschiedenen Kolitis-Modellen untersucht (81). HDAC-Inhibitoren verschiedener Klassen (die Hydroxaminsäuren Vorinostat und Givinostat sowie die

kurzkettige Fettsäure Valproinsäure) unterdrückten die Entzündungsparameter bei akuter DSS-induzierter Kolitis, was sich im Gewichtsverlust, intestinaler Blutung und der Dickdarmverkürzung sowie in endoskopischen Untersuchungen widerspiegelte. In allen unseren *in vivo*-Studien wurden die Inhibitoren oral verabreicht und die Dosen den aus humanen Studien als sicher beschriebenen Konzentration angepasst. Parallel zu den makroskopischen Daten konnte auch histologisch eine reduzierte Entzündungsreaktion festgestellt werden. Beides war begleitet von einer verminderten Produktion an pro-inflammatorischen Zytokinen am Ort der Entzündung. In allen Modellen waren die getesteten Hydroxamsäuren der Valproinsäure in Bezug auf die entzündungshemmende Wirksamkeit überlegen.

Angesichts des deutlichen entzündungshemmenden Effekts in den Modellen der experimentellen Kolitis sowie der allgemein bekannten antiproliferativen Wirkung von HDAC-Inhibitoren würde man in Fällen, in denen eine chronische Entzündung eindeutig mit einer nachfolgenden Tumorentstehung verbunden ist, von einer starken tumorverhindernden Wirkung der HDAC-Inhibition ausgehen. Wir untersuchten zwei Modelle der durch chronische Kolitis vermittelten Entzündungs-assoziierten Kanzerogenese (82). Das bekannteste Modell ist das sogenannte Azoxymethan (AOM)/DSS-Modell, das auf einer einmaligen Injektion des karzinogenen AOM und anschließender Induktion einer chronischen DSS-Kolitis basiert. Die Entwicklung von Dysplasien zu ausgewachsenen Adenomen wurde durch Endoskopie bei den lebenden Mäusen überwacht. Hier hat die kontinuierliche Behandlung mit entweder Vorinostat oder Givinostat sowohl das Tumorwachstum als auch die Tumorentwicklung abgeschwächt. Als zweites Modell wurden die IL-10-Knockout-Maus untersucht, welche spontan eine Kolitis und mit dem Alter Dysplasien entwickelt, die bis zu infiltrierenden Karzinomen führen können. Obwohl HDAC-Inhibitoren (Givinostat) erst in der 12. Woche verabreicht wurden, war die Behandlung mit einer Hemmung der Tumorentstehung innerhalb der folgenden vier Wochen verbunden, was eine Wirksamkeit von Givinostat auch in diesem therapeutischen Modell der entzündungsvermittelten Karzinogenese zeigt.

HDAC-Inhibitor-Wirkung auf T-Zellen und Makrophagen

Eine weitere Studie diente dazu, die regulatorische Wirkung der HDAC-Hemmung auf die T-Zell-Polarisation und auf das kritische Gleichgewicht der T-Zell-Subpopulationen in verschiedenen Kolitis-Modellen zu untersuchen (83). Eine regulatorische Rolle für die T-Zell-Funktion wurde durch die Unterdrückung der IL-6- und IFN γ -Synthese in stimulierten CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart eines HDAC-Inhibitors gezeigt. Entscheidend jedoch ist, dass die HDAC-Inhibition die Generierung von T_{reg} verstärkte und die Polarisierung von Th17-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* am Ort der Entzündung unterdrückte. IL-6 stellt hier ein Schlüsselzytokin dar, welches entscheidet, ob sich eine naive Th-Zelle zu einer Th17-Zelle oder einer induzierbaren T_{reg} entwickelt. Wir konnten hier einen entzündungshemmenden Wirkmechanismus durch Regulation des IL-6R und der nachfolgenden Signaltransduktion zeigen. IL-6 übt seine Funktion aus, indem es an IL-6R bindet und eine Kaskade

startet, wobei *signal transducer and activator of transcription* (STAT)3 eines der wichtigsten Signaltransduktionsmoleküle stromabwärts ist. Die HDAC-Hemmung führte nicht nur zu einer Herunterregulierung der Expression von IL-6R, sondern auch zu einer dosisabhängigen Reduktion der IL-6-induzierten STAT3-Phosphorylierung in naiven CD4⁺ T-Zellen. Modifikationen dieses Signalwegs führen direkt zu ROR γ t, dem Schlüsseltranskriptionsfaktor für die IL-17-Produktion, und damit zur Polarisierung von Th17-Zellen, welches auch tatsächlich in mit Givinostat behandelten Zellen herunterreguliert vorliegt. Um einen direkten Einfluss des HDAC-Inhibitors auf die IL-6R-Expression zu belegen, haben wir Veränderungen der Histonazetylierung an den jeweiligen Loci im Genom untersucht. Mittels Chromatin-Immunpräzipitation konnten wir tatsächlich eine Deazetylierung des IL-6R-Promotorlocus zeigen, was auf eine verringerte Gentranskription hinweist und somit den vorgeschlagenen Mechanismus bestätigte. Darüber hinaus belegen unsere Daten, dass auch in Makrophagen die Expression des IL-6R durch Givinostat selbst in seiner löslichen Form vermindert wird. Da die Sekretion von IL-6 selbst in Makrophagen, einer der Hauptquellen dieses Zytokins in der Lamina propria, reduziert ist, wurde somit eine durchgängig negative Regulation des lokalen IL-6-Signalwegs bestätigt. Der IL-6/STAT3/IL-17-Weg kommt als einer der Hauptmechanismen für die entzündungshemmende Wirkung von HDAC-Inhibitoren in Betracht, was durch Koenen *et al.* bestätigt werden konnte (84). Hier konnte eine verringerte *in vitro*-Differenzierung von T_{reg} zu Th17-Zellen in Gegenwart von pan-HDAC-Inhibitoren beschrieben werden. Ergänzend wurde gezeigt, dass die Behandlung von multiplen Myelomzellen mit HDAC-Inhibitoren zu einer Herunterregulation des IL-6R-Signals führte. Hier betonten die Autoren die funktionellen Konsequenzen der Herabregulation des IL-6R, da die Reaktion auf IL-6, wie gezeigt, anhand der STAT3-Phosphorylierung, ebenfalls reduziert wurde. Ergänzend zu unseren Ergebnissen veröffentlichte die Gruppe von Wayne Hancock zu Modellen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen einen HDAC-Inhibitor-abhängigen Anstieg von T_{reg}, der hier die entzündungshemmende Wirkung vermittelte (85). Da experimentelle Kolitis mit einer erhöhten lokalen Expression von HDAC9 assoziiert war, wurden *Hdac9*-Knockout-Mäuse anschließend in Modellen experimenteller Kolitis untersucht, wo sie sich als geschützt erwiesen. T_{regs} von *Hdac9*-Knockout-Mäusen zeigten im Vergleich zu Kontrollen erhöhte *heat shock protein* (HSP)70-Spiegel. Immunpräzipitationsexperimente zeigten eine Wechselwirkung zwischen HSP70 und Foxp3. Die Hemmung von HSP70 verringerte die entzündungshemmende Wirksamkeit von *Hdac9*-Knockout-Tregs, während T_{regs}, die HSP70 überexprimierten, eine verbesserte Suppression von T-Zellen zeigten (85).

Nicht nur T-Zellen, sondern auch Monozyten- und Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle in chronischen Entzündungen, weshalb diese auch bei der Suche nach möglichen Wirkmechanismen der HDAC-Inhibitoren berücksichtigt werden müssen. So konnten wir, wie oben beschrieben, eine kritische Rolle von HDAC5 in der Immunantwort von Makrophagen beschreiben (86) und zeigen, dass Givinostat die Polarisierung von Knochenmarks-gereiften murinen Makrophagen zu dem anti-

inflammatorischen M2-Phänotyp fördert (unveröffentlicht) und empfindlich in den IL-6/STAT3-Signaltransduktionspfad eingreift (83). Andere Gruppen konnten zeigen, dass humane Monozyten, die mit Lipopolysaccharid oder TNF- α stimuliert und anschließend mit dem neuen HDAC1-Inhibitor NW-21 behandelt wurden, die Synthese der pro-inflammatorischen Zytokine *macrophage inflammatory protein 1 α* und *monocyte chemoattractant protein 1* verringerten, wobei andere pro-inflammatorische Zytokine, insbesondere TNF- α und IL-1 β , nicht beeinflusst wurden (87). Ganz aktuell konnte die Gruppe von Fiona Powrie zeigen, dass der natürliche, von Darmbakterien hergestellte HDAC-Inhibitor Butyrat eine anti-mikrobielle Antwort in Makrophagen über die Hemmung von HDAC3 auslöst (77).

HDAC und HDAC-Inhibitoren in intestinalen Epithelzellen

In einer kürzlich veröffentlichten Studie analysierte unsere Gruppe auch primäre Epithelzellen von CED-Patienten auf HDAC-Expression und konnte verminderte Expression der *HDAC2*, *-3*, *-5*, *-6*, *-8*, *-10* und *-11* nachweisen. Wir verwendeten murine und humane Kolonepithelzelllinien, Mausmodelle für experimentelle Kolitis sowie 3D-Organoidkulturen primärer Epithelzellen, um die Auswirkungen der pan-HDAC-Inhibitoren Givinostat und Vorinostat auf die Funktion und Integrität der epithelialen Barriere und der Wundheilung bei Darmentzündungen zu untersuchen. Hier konnten wir eine entzündungsbedingte Herunterregulierung der meisten HDAC bei aktiver Entzündung beschreiben. Weiterhin zeigten *in vitro*-Modelle zur Barriereintegrität eine verbesserte Regeneration durch HDAC-Inhibitoren, die mit einer signifikanten Erhöhung der Expression der regenerativen Zytokine TGF β und IL-8 erklärt werden konnten. Dies konnte sowohl in epithelialen Zelllinien, als auch in murinen epithelialen 3D-Organoiden bestätigt werden. Anhand zweier hoch aktueller Publikationen lässt sich schlussfolgern, dass Givinostat in den Epithelzellen eine sogenannte "sterile" *senescence* (keine DNA-Schädigung, keine Immunogenität) auslöst, was die TGF β -Expression sowie die verstärkte Proliferation erklären würde (88, 89). Um den beobachteten Effekt auch *in vivo* zu zeigen, führten wir eine akute DSS-induzierte Kolitis als Regenerationsmodell durch und entwickelten zusätzlich ein „mechanisches“ Wundheilungsmodell unter Verwendung einer endoskopischen Biopsie. Beide Modelle zeigten eine beschleunigte Wundheilung und Barriereregeneration unter Givinostat-Behandlung. Unsere Daten sind einerseits hochinteressant für die CED-Behandlung, ist die Heilung der Schleimhaut doch das Hauptziel für viele therapeutischen Strategien, die sich in der klinischen Anwendung oder in der Entwicklung befinden. Andererseits werfen die Ergebnisse auch Fragen auf bezüglich der gewünschten anti-proliferativen Wirkung in Krebsstudien, welche vielleicht über genauere Dosis-Wirkungs-Experimente beantwortet werden können.

HDAC-Inhibition als Wirkmechanismus

Da das Zwischenspiel von Azetylierung und Deazetylierung Einfluss auf eine solche Vielzahl von Signalwegen in der Zelle und damit deren Homöostase nimmt, stellen die verantwortlichen Enzyme für die Übertragung oder Entfernung von Azetylgruppen äußerst interessante Zielstrukturen für

Therapieansätze verschiedener Krankheiten dar. Vor allem HDAC-Inhibitoren sind innerhalb der vergangenen Jahre zunehmend in den Fokus klinischer Studien gerückt, welche spezifisch für ein bzw. mehrere Zielstrukturen sein können oder als sogenannte Pan-Inhibitoren die gesamte Proteinfamilie der HDACs in ihrer Funktion beeinträchtigen (90).

Funktionen einzelner HDAC

Um den Wirkmechanismus, aber auch möglichen Nebenwirkungen von HDAC-Inhibitoren zu verstehen, sind Kenntnisse über ihre Funktion nicht nur im Krankheitsfall, sondern auch im gesunden Gewebe notwendig. Ein nützliches Werkzeug um die Funktion einzelner Proteine bzw. Gene zu verstehen, stellen z.B. Knockout-Mäuse dar, in denen die Expression einzelner HDAC ausgeschaltet sind und welche somit wertvolle Einblicke in ihre physiologische Funktion liefern (90). Da in den oben beschriebenen Studien pan-HDAC-Inhibitoren benutzt wurden, welche alle HDAC funktionell hemmen, werden im Folgenden die wichtigsten Befunde aus Untersuchungen der Knockout-Mäuse zusammengefasst.

Die Keimbahn-Deletion von *Hdac1* ist aufgrund von Proliferationsdefekten embryonaler Stammzellen am Tag 9,5 embryonal letal. In diesen Mäusen ist die Expression der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK)-Inhibitoren p21 und p27 hochreguliert und die globale Histondeazetylaseaktivität gehemmt (91). Mäuse welche einen Knockout von *Hdac2* tragen, überleben bis zur Perinatalperiode und versterben dann aufgrund mehrerer Herzfehler (92). Wird die Expression von *Hdac3* ausgeschaltet, sterben die Tiere ebenfalls vor Tag 9,5 der Embryonalentwicklung. Die Inaktivierung von *Hdac3* führt zu einem zellzyklusabhängigen DNA-Schaden sowie einer anschließenden fehlerhaften Reparatur derselben und letztlich zur Apoptose bei embryonalen Fibroblasten in der Maus (93). Das leberspezifische Ausschalten von *Hdac3* mittels konditionaler Knockout-Modelle führt zu einer Vergrößerung des Organs durch eine Hepatozytenhypertrophie und einer hieraus resultierenden Störung des Fettstoffwechsels (94). *Hdac4*-Knockout-Mäuse zeigen eine vorzeitige Ossifikation der sich entwickelnden Knochen aufgrund einer ektopischen und früh einsetzenden Chondrozytenhypertrophie. Die Überexpression von *Hdac4* in proliferierenden Chondrozyten *in vivo* hemmt wiederum die Hypertrophie und Differenzierung der Chondrozyten. Somit konnte HDAC4 als ein zentraler Regulator der Knorpel- und Knochenbildung identifiziert werden (95). Mäuse, denen HDAC5 fehlt, entwickeln als Reaktion auf eine Drucküberlastung infolge einer Aortenverengung oder einer konstitutiven Aktivierung von Stresssignalen eine Kardiomegalie (96). In eigenen Experimenten unserer Gruppe konnte kein pathologischer Phänotyp gezeigt werden. Auf zellulärer Ebene jedoch, zeigte sich *in vivo* eine Störung der Th17- und T_{reg}-Polarisierung (unveröffentlicht), sowie, wie oben in Poralla *et al.* bereits beschrieben (86), eine deutliche Hemmung der pro-inflammatorischen Makrophagen-Antwort *in vitro*. *Hdac6*-Knockout-Mäuse sind lebensfähig, obwohl sie in mehreren Organen eine stark erhöhte Tubulinazetylierung aufweisen sowie eine geringfügigen Veränderungen der Knochenmineraldichte und der Immunantwort. HDAC6-defiziente Embryofibroblasten zeigen

eine erhöhte HSP90-Azetylierung, einhergehend mit einer Beeinträchtigung der HSP90-Funktion (97). Der Knockout des *Hdac7*-Gens führt bei Mäusen zu einer embryonalen Letalität aufgrund eines Versagens der Endothelzell-Adhäsion und einer daraus resultierenden Erweiterung und Ruptur von Blutgefäßen. HDAC7 wird während der frühen Embryogenese spezifisch im Gefäßendothel exprimiert, wo es die Gefäßintegrität aufrechterhält, indem es die Expression der Matrix-Metalloproteinase 10 durch Assoziation mit *Myocyte-specific enhancer factor 2D* unterdrückt (98). Ein T-Zell-spezifischer *Hdac7*-Knockout führt zu einer Beeinträchtigung der T-Zellselektion im Thymus (99). Die Deletion von *Hdac8* bei Mäusen führt zu einem perinatalen Tod durch einen hochspezifischen Mangel an kranialen neuronalen Kammzellen, den Verlust spezifischer kranialer Skelettelemente und der daraus resultierenden biomechanischen Instabilität des Schädels (100). *Hdac9*-Knockout-Mäuse entwickeln sich normal und sind bei der Geburt lebensfähig. Im Alter von 8 Monaten entwickeln Mäuse jedoch aufgrund der Sensibilisierung für hypertrophe Signale eine spontane Herzhypertrophie (101). Weiterhin hat die Gruppe von Wayne Hancock eine verbesserte Suppressionsfähigkeit der T_{reg} für *Hdac9*- aber auch für *Hdac10*- und *Hdac11*-Knockout-Mäuse nachgewiesen (85, 102, 103). Für letztere, konnte allerdings auch eine verstärkte pro-inflammatorische Effektor-T-Zell-Antwort nachgewiesen werden, ausgehend von einer Histon-Deazetylierung durch HDAC11 am *Eomes*- und *Tbet*-Promotor.

Die beschriebenen Knockout-Studien zeigen, dass die Deletion der *Hdac1*-, *2*-, *3*-, *7*- und *8*-Gene einen schweren, embryonal letalen Phänotyp erzeugt, der höchstwahrscheinlich auf einen gestörten Zellzyklus früher embryonaler Zellen (*Hdac1*, *-2*, *-3*) oder eine beeinträchtigte Gewebsentwicklung der Blutgefäße zurückzuführen ist (*Hdac7*). Im Gegensatz dazu sind Mäuse, denen HDAC4, *-5*, *-6*, *-9*, *-10* und *-11* fehlen, lebensfähig und zeigen Defekte bei der Regulation der zellulären Hypertrophie, Defekte bei der Muskel-, Herz-Kreislauf- und Knochenentwicklung aber auch immunologische Phänotypen. Besonders die Schäden in der Embryonalentwicklung sowie die beschriebenen Herzdefekte sind sicherlich Punkte die es zu beachten gilt, möchte man HDAC-Inhibitoren als Medikamente nutzen. Die globalen Knockout-Modelle zeigen aber auch, dass konditionale, gewebespezifische Knockout-Modelle generiert werden müssen, um die Funktion einzelner HDAC für normale Gewebs- und Zellfunktionen in späteren Entwicklungsstadien bzw. in adulten Zellen beschreiben zu können. Eine Strategie, die wir in der Arbeitsgruppe schon geraume Zeit bezüglich zellspezifischer Funktionen des HDAC7 verfolgen (unveröffentlicht).

Obwohl pan-HDAC-Inhibitoren sich als wirksam in verschiedenen Krebserkrankungen bzw. deren Modellen erwiesen haben, konnte noch keine Keimbahnmutation eines HDAC als assoziiert mit einer Krebserkrankung identifiziert werden (90). Allerdings konnten z.B. somatische Mutationen des *HDAC2*-Gens bei humanen kolorektalem und Endometriumkarzinom mit Mikrosatelliteninstabilität identifiziert werden. Interessanterweise wurde in funktionellen Versuchen gezeigt, dass diese *HDAC2*-Mutation mit einer Resistenz gegen die antiproliferativen und proapoptischen Wirkungen von

HDAC-Inhibitoren einhergeht (104). Weiterhin treten somatische *HDAC4*-Mutationen in Proben von Brustkrebspatientinnen mit signifikanter Häufigkeit auf (105).

Differentielle Expressionen können für alle HDAC in verschiedensten Krebsentitäten nachgewiesen werden. Als Beispiel sei *HDAC1* aufgeführt, welches bei der Proliferationskontrolle und der Repression von p21- und p27-CDK-Inhibitoren in embryonalen Stammzellen von Mäusen eine wichtige Rolle spielt (91), was für humane Krebszelllinien bestätigt werden konnte. Der Knockdown von *HDAC1* mittels siRNA führte zu einer Hemmung der Zellproliferation von HeLa-Zellen, ausgelöst durch einen Stillstand entweder in der G(1)-Phase des Zellzyklus oder am G(2)/M-Übergang. Die hierdurch ausgelöste Mitose-Hemmung sowie ein Anstieg der Frequenz apoptotischer Zellen konnte beim Osteosarkom und in Brustkrebszellen bestätigt werden (106). Die Überexpression von *HDAC1* hingegen führt zu einer Zunahme der Proliferation und zu einem undifferenzierten Phänotyp in kultivierten Prostatakrebszellen (107).

Ähnliche Daten existieren für alle HDAC, wobei ich hier nur noch auf die von uns untersuchten *HDAC5* und *HDAC7* (nicht veröffentlicht) kurz eingehen werde. Hier handelt es sich um Klasse II-HDAC, welche nicht ausschließlich im Zellkern exprimiert werden und welche auch im Zytoplasma aktiv sind, d.h. nicht nur Histone deazetylieren sondern auch Proteine verschiedener Signaltransduktionsketten (z.B. STAT3) oder Bestandteile wichtiger Proteinkomplexe (z.B. FoxP3-Repressor-Komplex). Die *HDAC5*- und *HDAC7*-Expression findet sich bei Kolonkarzinom im Gegensatz zu Nieren-, Blasen- und Brustkrebs hochreguliert (108), wobei *HDAC5* hier mit dem Transkriptionsfaktor *GATA-binding factor-1* interagiert. Ein Knockout von *HDAC7* in Endothelzellen veränderte ihre Morphologie, ihre Migration und ihre Fähigkeit *in vitro* Kapillartubuli zu bilden, beeinflusste jedoch nicht die Zelladhäsion, -proliferation oder -apoptose, was *HDAC7* für eine Anti-Angiogenese-Therapie der Tumorgenese interessant macht (109).

In unserer eigenen Studie bezüglich der differentiellen Expression aller elf HDAC in Darmepithelzellen von CED-Patienten konnten wir die verminderte Expression der *HDAC2*, -3, -5, -6, -8, -10 und -11 nachweisen. Änderungen der Expression von *HDAC4* und -7 konnte aufgrund großer Varianzen (vermutlich bedingt durch die geringe Expressionshöhe der Gene) nicht eindeutig bestimmt werden. Interessanterweise scheint die Expression von *HDAC1* in intestinalen Epithelzellen vollkommen unbeeinflusst von der aktiven Entzündung vor Ort zu sein (110). Weiterhin hat unsere Gruppe auch bereits eine Studie durchgeführt, in welcher die Expression aller elf HDAC in T-Helferzellen mittels siRNA unterdrückt wurden und welche *HDAC5*, -7 und -9 als notwendig für eine pro-inflammatorische Antwort identifizierte (111).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass immer noch nicht bekannt ist, welche HDAC in welchem Zelltyp bei welcher Erkrankungen die Zielstruktur darstellen. Hier arbeiten viele Gruppen weltweit daran, die Rolle einzelner HDAC zu identifizieren, darunter auch unsere für *HDAC5* und -7 in T-

Zellen und Makrophagen sowohl bei der Regulation der Inflammation als auch der Tumorabwehr (unveröffentlicht und (86)).

Wirkung von HDAC-Inhibitoren

Obwohl es noch Jahre dauern wird, bevor man eine entsprechende Zusammenstellung der einzelnen *Drug Targets* zur Verfügung haben wird, hat doch die Histonazetylierung als Mechanismus der Genregulierung in den letzten beiden Jahrzehnten viel Aufmerksamkeit erfahren. Die Azetylierung von Histonproteinen ist ein Gleichgewicht zwischen den Aktivitäten von Histonazetyltransferasen als auch von HDAC, wobei die Histonazetylierung im Allgemeinen mit einer Zunahme der Gentranskription verbunden ist, während die Deazetylierung zu einer verminderten Gentranskription führt.

Diese vereinfachte Darstellung führt bei aller Anschaulichkeit jedoch zu einer weitgehenden Unterschätzung der Auswirkungen der Behandlung mit HDAC-Inhibitoren, wie die Beispiele schwerwiegender Defekte in Knockout-Modellen oben zeigen. Ein weiteres Problem ist die häufig auftretende Kompensation der HDAC-Inhibitor-Wirkung über Änderungen der Histonmethylierung und anderer Histonmodulatoren. Dies macht die Vorgänge nach einer Inhibitor-Behandlung so komplex, dass die Auswirkungen selbst auf der Ebene der Chromatinstruktur noch nicht vollständig beschrieben werden konnten. Hinzu kommt, dass ein großer Teil der Azetylierung an Nicht-Histonproteinen stattfindet, was wiederum dazu führt, dass die Hemmung von HDAC unter auch folgen ganz unabhängig von der Chromatinstruktur bewirkt (112). Die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren moduliert Genexpression auf vielen verschiedenen Ebenen, einschließlich der Transkriptionsfaktoraktivität, der miRNA-Expression und weiterer Signaltransduktionswege. Die am häufigsten beschriebene und letztlich auch gewünschte Wirkung von HDAC-Inhibitoren auf Tumorzellen ist die Apoptose-Induktion. Zusätzlich greifen HDAC-Inhibitoren aber auch in Zellwachstum und Differenzierung ein (113) und hemmen Angiogenese (114). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass HDAC-Inhibitoren Immunantworten modulieren, die wiederum viele verschiedene Zellfunktionen beeinflussen und somit dazu beitragen können, die Grundlage für den klinischen Nutzen von HDAC-Inhibitoren zu erklären (49). Um das volle Potenzial von HDAC-Inhibitoren auszuschöpfen, ist ein umfassenderes Verständnis der Rolle der Azetylierung bei der Signalübertragung auf zellulärer und systemischer Ebene erforderlich.

Auch wenn HDAC-Inhibitoren als Krebstherapeutika Eingang in die klinische Praxis fanden, so ist doch mittlerweile der klinische Nutzen von HDAC-Inhibitoren weit über die Behandlung von Krebs hinaus erweitert worden und wurde deshalb in einer Meta-Analyse auf ihr therapeutisches Potenzial bei den zehn häufigsten Todesursachen in den USA untersucht (112). Die Beispiele reichen von der Behandlung von depressiven Störungen (Nummer 10 der Liste) durch den HDAC-Inhibitor Valproinsäure (115) zu Rückenmarksverletzungen (Nummer 4), wo HDAC-Inhibitoren vermutlich

durch die schon beschriebenen entzündungshemmenden Mechanismen wirken können (116).

Leider sind viele verfügbare HDAC-Inhibitoren in ihrer Funktion nicht besonders gut charakterisiert. Beispielsweise ist Depudecin ein Naturprodukt, das zuerst als Wirkstoff identifiziert wurde, welches auf das Ras-Onkogen abzielt (117) und welches erst später als HDAC-Inhibitor beschrieben wurde (118). Obwohl dieser HDAC-Inhibitor als HDAC1-Inhibitor vermarktet wird, wurde Depudecin nur unter Verwendung eines rekombinanten *in-vitro*-Assays auf Aktivität gegen HDAC1 getestet (118), so dass seine tatsächliche Spezifität *in vivo* nie bestimmt wurde. In ähnlicher Weise wird MC1293 als HDAC1-Inhibitor vermarktet, aber ein Substrat-unabhängiger Test der Inhibitor-Protein-Bindung legt nahe, dass dieser Inhibitor mit nur geringer Affinität an HDAC1 bindet, während er mit um Größenordnungen höherer Affinität an HDAC6 bindet (119). Gerade bei chemischen Inhibitoren, welche auf so hoch-konservierte Mechanismen der Gen-Expression abzielen birgt dies ein immenses Risiko für kurzfristige Nebenwirkungen aber auch Langzeitschäden.

Viele *in-vitro*-Tests von HDAC-Inhibitoren der Klasse I konzentrieren sich auf Histone als Zielstruktur, was auch sinnvoll scheint, da HDAC der Klasse I ausschließlich im Zellkern lokalisiert sind. Neuere Erkenntnisse aus Massenspektrometrie-Experimenten haben jedoch gezeigt, dass Azetylierung Genexpression auf mehreren Ebenen beeinflussen kann (120). Tatsächlich sind von Azetylierungsänderungen viel mehr Proteine und deren Funktion betroffen als ursprünglich angenommen. So werden z.B. die Aktivitäten einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren verändert (z. B. p53, *hypoxia-inducible factor* (HIF)-1 α , NF-KB, STAT1, GATA1) (121). Zusätzlich verändert die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren die Histonmethylierung (122), was wiederum die Wirkung der Azetylierung auf die Bindung von Chromatin-Regulationskomplexen verstärkt (120). Aus diesen Gründen ist eine exakte Charakterisierung der Ziele aber auch der Konsequenzen der Modulation von Protein-Azetylierung extrem aufwendig und langwierig, sollte aber aus oben genannten Gründen für jeden einzelnen Wirkstoff vorgenommen werden.

Die bereits erwähnte Veränderung der Histonmethylierung ist auch einer der beschriebenen Mechanismen, mit denen die Zelle auf die von den HDAC-Inhibitoren verursachte globale Hyperazetylierung reagiert und verhindert, dass die Folgen nicht jedes Mal für die Zelle tödlich ausfallen. Zellen und sogar ganze Organismen können eine ausgedehnte Hyperazetylierung von Kernhistonen und anderen Proteinen tatsächlich tolerieren, indem zum Beispiel die Methylierung H3K27me3 an den Transkriptionsstartstellen von Genen, welche Zellwachstum verlangsamen können, ausgelöst wird und so die Proteinhyperazetylierung lokal minimiert wird, bis die physiologischen Genexpressionsmuster wiederhergestellt werden können (123). Sobald sich die Zellen angepasst haben, um diese anfängliche epigenetische Störung zu überleben, beeinflussen HDAC-Inhibitoren die Genexpression durch andere Formen der epigenetischen Kontrolle aber weiter. Dies schließt eine indirekte Wirkung auf DNA- und Histonmethylierung, Manipulation von Proteinen wie z.B. Proteinen der Polycomb-Gruppe innerhalb des *SWItch/Sucrose Non-Fermentable*-Komplexes und Regulierung

der Expression von miRNA ein (112). Bekannte Beispiele dafür, wie HDAC-Inhibitoren die Genexpression epigenetisch regulieren können, um die gewünschten zellulären Ergebnisse zu beeinflussen, sind die erhöhte Proteinstabilität der Onkogene p53, Myc und *RUNX Family Transcription Factor 3* (124-126), die Translokalisierung von β -catenin in den Kern (127), die Erhöhung der DNA-Bindung des Signaltransduktionsmoleküls STAT3 (125) oder die Verminderung der Stabilität von HIF-1 α (128).

Wie oben beschrieben, führt die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren über mehrere Mechanismen auch zu einer Modulation verschiedener Immunantworten bei einer Vielzahl von Erkrankungen, einschließlich Tumore. Da viele der Mechanismen der Tumorimmunologie auch für die Regulierung von Infektionen oder Autoimmunerkrankungen wichtig sind, ist es naheliegend, dass HDAC-Inhibitoren auf ihre Wirkung bei der Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen untersucht wurden (129), wie auch in unseren oben beschriebenen Studien und wie auch bereits in der Einleitung dargelegt.

Zusammengenommen zeigen diese Studien, dass ein besseres Verständnis der spezifischen zellulären und molekularen Wirkungen von HDAC-Inhibitoren dringend erforderlich ist, da bisher nur einzelne Studien einzelne Effekte identifizieren, wir aber noch weit entfernt davon sind, einen echten Überblick über die Wirkung von pan-HDAC-Inhibitoren auf einen komplexen Organismus zu haben. Einen großen Fortschritt würde man bereits erzielen, wenn für einzelne HDAC spezifische Inhibitoren zur Verfügung stünden.

Spezifische HDAC-Inhibitoren

Bedenkt man, dass alle Zellen alle HDAC exprimieren, diese jedoch in unterschiedlichen Zelltypen unterschiedliche Funktionen ausfüllen, wird klar, wie unspezifisch die meisten HDAC-Inhibitoren wirken. Dies schließt sogenannte Pan-Inhibitoren, welche alle elf HDAC hemmen, aber auch Klassenspezifische HDAC-Inhibitoren mit ein, die immer noch mehrere HDAC gleichzeitig inhibieren. Nachdem auch unzählige Publikation zu eben diesen unterschiedlichen Funktionen in verschiedenen Zellen Aussagen treffen, steigt der Bedarf an HDAC-spezifischen Inhibitoren.

Im Vergleich zur herkömmlichen zytotoxischen Chemotherapie kann die Verwendung von HDAC-Inhibitoren als gezielte Therapie oder „Neo-Chemotherapie“ mit einem stark verbesserten Toxizitätsprofil angesehen werden (130). Bisher wurden verschiedene Klassen von synthetischen und natürlichen HDAC-Inhibitoren (Klasse I, II und IV) identifiziert, einschließlich Hydroxamsäuren, Benzamiden, kurzkettigen Fettsäuren und zyklischen Peptiden. Leider zeigen die meisten HDAC-Inhibitoren, wie bereits erwähnt, eine geringe Selektivität gegenüber verschiedenen Isoformen oder Klassen (pan-HDAC-Inhibitoren). Vorinostat war der erste pan-HDAC-Inhibitor, der vor 13 Jahren von der FDA für die klinische Anwendung bei Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom zugelassen wurde (131), zwei Jahre später folgte Romidepsin (FK228), für die gleiche Indikation sowie wiederum

zwei Jahre später für das periphere T-Zell-Lymphoms (132, 133). Belinostat, das dritte im Jahr 2014 zugelassene Medikament, wurde ebenfalls zur Behandlung des peripheren T-Zell-Lymphoms eingesetzt (134). Panobinostat, ein weiteres Hydroxamsäureanalogon mit Pan-HDAC-Wirkung, erhielt 2015 eine beschleunigte Zulassung für die Behandlung des multiplen Myeloms (135). Das von uns eingesetzte Givinostat (81-83, 110), befindet sich aktuell in mehreren klinischen Studien und hat noch keine Zulassung einer nationalen Behörde.

Während sich nicht-selektive HDAC-Inhibitoren als nützlich für die Behandlung von Tumorerkrankungen erwiesen haben, kann eine Isoform-selektive Hemmung, wie oben diskutiert, die Möglichkeit bieten, Toxizitäts- oder Nebenwirkungen zu umgehen. Noch sind alle oben beschriebenen offiziell zugelassenen HDAC-Inhibitoren pan-Inhibitoren, jedoch werden kontinuierlich neue Patente angemeldet und prä-klinische Studien veröffentlicht. Da es sich jedoch bei HDAC-Inhibitoren um mehrere komplett verschiedene Stoffklassen handelt und es elf HDAC zu hemmen gilt, ist die Suche nach bzw. die Arbeit an neuen Inhibitoren sehr komplex und langwierig.

Ein Beispiel für einen spezifischen HDAC-Inhibitor stellt Largazol dar (136), ein zyklisches Peptid, genauer gesagt ein natürliches makrozyklisches Depsipeptid, welches eine vielversprechende HDAC1-Hemmung und -Selektivität aufweist und welches als Muster für die Entwicklung von zyklischen Peptidanaloga (Largazolderivate) genutzt wird (137). Funktionell zeigt Largazol eine sehr gute selektive Aktivität gegen hochinvasiv transformierte humane Brustepithelzellen und transformierte fibroblastische Osteosarkomzellen gegenüber den Kontroll-Zelllinien (NMuMG und NIH3T3) (136). Largazol agiert als „*Prodrug*“, welche eine Hydrolyse der Thioestergruppe durch zelluläre Esterasen oder Lipasen eingeht, um dann eine freie Thiolfunktion freizusetzen, welche die enzymatisch aktive Domäne bildet, die dann Zn^{2+} chelatiert.

Während zyklische Peptide sich aufgrund ihrer verhältnismäßig einfachen Modifizierbarkeit für weitere pharmakologische Studien anbieten, bilden Hydroxamsäure aufgrund ihrer Eigenschaft, Zn^{2+} im aktiven Zentrum zuverlässig zu chelatieren, die bei weitem häufigste Gruppe der HDAC-Inhibitoren. Mehrere Hydroxamsäuren wie Vorinostat, Panobinostat und Belinostat sind bereits für die Behandlung von T-Zell-Lymphomen zugelassen. Diese klinischen Erfolge haben die Aktivitäten mehrerer Forschungsgruppen zum Design Isoform-selektiver Verbindungen oder Verbindungen mit einem anderen Selektivitätsprofil auf Hydroxamsäure-Basis angeregt und tatsächlich wurden mehrere Studien und Patente über eine Reihe von selektiven insbesondere gegen HDAC6 und -8 veröffentlicht.

Die erste entwickelte HDAC6-spezifische Isoform war Tubacin, so genannt, weil es ein Tubulin-Azetylierungsinduktor ist. Seine Wirkung, insbesondere *in vivo*, ist jedoch durch die Komplexität der Synthese des kleinen Moleküls, seine Lipophilie und einer eher ungeeigneten Struktur begrenzt. Der Inhibitor, der bisher am häufigsten zur Untersuchung der HDAC6-Funktion verwendet wurde, ist

Tubastatin A. Während allerdings Tubastatin A in präklinischen mechanistischen Studien relativ weit verbreitet ist, sind Ricolinostat und ACY-241 die einzigen HDAC6-spezifischen Inhibitoren, welche die Phase klinischer Studien erreicht haben. Ricolinostat ist ein Hydroxaminsäurederivat mit einem IC50 für HDAC6 von nur 5 nM, besitzt jedoch auch eine Aktivität gegen andere HDAC-Isoformen. Wie bei anderen HDAC6-Inhibitoren erhöht Ricolinostat die α -Tubulinazetylierung dosisabhängig, ohne den Azetylierungsstatus von Histonproteinen zu beeinflussen. Es induzierte auch eine geringere Zytotoxizität in mononukleären Zellen und T-Zellen des peripheren Blutes als der Pan-HDAC-Inhibitor Vorinostat (138).

Im Gegensatz dazu weist Rocilinostat eine starre und weniger komplexe *Capping-Group* auf, die zu einer gesteigerten HDAC6-Selektivität beiträgt. Rocilinostat zeigte einen IC50-Wert von 4,7 nM gegen HDAC6 und war gegen HDAC1, -2 und -3 etwa zehnmal weniger aktiv (139). Erst 2015 wurde eine Reihe neuer HDAC6-Inhibitoren auf Rocilinostat-Basis mit substituierten Benzimidazol-Heterocyclen beschrieben. Die wirksamste Verbindung zeigte eine vielversprechende selektive HDAC6-Hemmaktivität im pikomolaren Konzentrationsbereich (IC50 = 0,002 nM), während die Hemmaktivität gegenüber anderen HDAC im mikromolaren Konzentrationsbereich lag. Das sehr hohen Aktivitäts- und Selektivitätsprofil dieser neuen Verbindungen gegen die HDAC6-Isoform macht diesen HDAC6-Inhibitor zu einem vielversprechenden potenziellen Tumormedikament (140). In dem ursprünglichen Bericht, der den Phänotyp von HDAC6-Knockout-Mäusen beschreibt, stellten die Autoren eine nur mäßig beeinträchtigte Immunantwort fest. Seitdem wurde jedoch in mehreren präklinischen Studien eine entzündungshemmende Wirkung der spezifischen HDAC6-Hemmung beschrieben. In Modellen von Entzündung oder Autoimmunität (einschließlich Modellen von Kolitis und Herz-Allotransplantat-Abstoßung) förderte der HDAC6-Knockdown bzw. die HDAC6-Hemmung die supprimierende Aktivität von T_{reg}. Auch scheint die Produktion des entzündungshemmenden Zytokins IL-10 von HDAC6 abzuhängen, dies wird jedoch noch kontrovers beschrieben und diskutiert (138). Angesichts der wahrscheinlich geringen Nebenwirkungen der HDAC6-Hemmung darf man gespannt sein, ob diese Therapien bei komplexen chronischen Erkrankungen in Zukunft in klinischen Studien untersucht werden.

Ein anderer Kandidat für eine selektive Inhibition ist HDAC8, welche im Gegensatz zu den anderen als einzelnes Polypeptid vorliegt und mit mehreren Krankheitszuständen assoziiert beschrieben wird. Die Suche nach Hydroxamsäurederivaten, die mit der einzigartigen Struktur von HDAC8 interagieren können, führten zur Entdeckung des Indolhydroxamsäurederivats PCI-34051 durch Pharmacyclics Inc. (141). Dieser Wirkstoff hemmt HDAC8 mit einem Kanzerogenitätsindex von 10 nM und weist eine über 200-fache Selektivität gegenüber HDAC1–3, -6 und -10 auf. Mit dieser Verbindung als Vorlage konnte die Spezifität der inhibitorischen Wirkung durch Modifikationen der Indolgruppe weiter erhöht werden, auf mehr als eine 500-fache Selektivität gegenüber HDAC1, -3, -6 und -10 (142). Noch befinden sich diese Verbindungen nicht in klinischen Studien. Es wird interessant sein zu

sehen, welcher selektive HDAC-Inhibitor als erster klinisch eingesetzt wird und für welche Anwendung.

In jüngster Zeit wurden im Vergleich zu Hydroxamsäuren in Veröffentlichungen und Patenten immer mehr auch Benzamide als HDAC-Inhibitor der Klasse I beschrieben. Angesichts der Einschränkungen der *in-vivo*-Wirksamkeit und der bekannten Toxizität, die bei vielen Hydroxamsäuren beobachtet wurden, erhofft man sich von Benzamiden, dass sie entsprechend verlängerte Hemmwirkungen erreichen und somit längere Intervalle zwischen den Dosierungen ermöglichen. Ein Beispiel hierfür ist Chidamid, ein neuer HDAC1-3-Inhibitor, der vollständig in China entwickelt wurde und dort mittlerweile für die Therapie des Pankreaskarzinoms zugelassen wurde (143).

HDAC-Inhibitoren in *Drug Delivery*-Systemen

Eine weitere Möglichkeit die Effektivität und Sicherheit von HDAC-Inhibitoren zu erhöhen besteht darin diese mittels *Drug Delivery*-Systemen (DDS) spezifisch auf bestimmte Zellen oder Gewebe (z.B. Makrophagen oder Tumorgewebe) wirken zu lassen. Mit solchen, in diesem Fall epigenetisch wirksamen Systemen können generell Nebenwirkungen oder systemische Toxizität mit hochaktiven Verbindungen verringert werden. Durch die spezifische Wirkung kann mit wesentlich geringeren Konzentrationen der aktiven Substanz gearbeitet werden, sogar in Kombination mit weiteren Medikamenten (144). Die Auswahl der entsprechenden DDS ist hierbei ein wichtiges Thema. Mizellen-basierte DDS z.B. zeigen eine sehr heterogene Zusammensetzung sowie einen unerwünschten "*burst release*"-Effekt, während polymere DDS sich als stabiler erwiesen haben und explizit für eine chemisch stimulierte Arzneimittelfreisetzung entwickelt wurden, ursprünglich um Resistenzen zu umgehen (145). Auf dieser Basis konnte der zugelassene HDAC-Inhibitor Vorinostat in ein entsprechendes DDS verpackt werden und über eine pH-vermittelte Freisetzung eine passive Tumorspezifität erzeugen (146). In dieser Studie wurde erstmals gezeigt, dass eine epigenetische Strategie, die auf pH-sensitiven Nanopartikel basiert und mit einer im nanomolaren Bereich aktiven Hydroxamsäure (Vorinostat) als HDAC-Inhibitor als anti-Tumor-Medikament wirken kann. Zusammen mit der Gabe von freiem Decitabin, einem Inhibitor der DNA-Synthese konnte eine Gewichtsreduktion des Tumors um 80% erreicht werden, während die Kombination von freiem Vorinostat mit freiem Decitabin keine Wirkung hatte. Diese Ergebnisse könnten auch auf andere Kandidaten aus der zunehmenden Zahl zugelassener HDAC-Inhibitoren der Hydroxamsäurefamilie ausgedehnt werden.

HDAC-Inhibitoren in Kombinationstherapien

Durch die hier bereits erwähnte Kombination von verschiedenen Wirkstoffen mit HDAC-Inhibitoren kann deren Wirksamkeit und Verträglichkeit ebenfalls gesteigert werden. Einerseits können sich die Wirkungen der einzelnen Medikamente gegenseitig ergänzen, wie zum Beispiel eine Histonazylierung die DNA für Inhibitoren der DNA-Synthese besser zugänglich machen kann.

Andererseits können Nebenwirkungen eines Medikamentes wieder durch ein zweites aufgehoben werden. Während hämatologische Malignome bisher erfolgreich mit HDAC-Inhibitoren behandelt wurden, waren diese Wirkstoffe jedoch im Allgemeinen weniger wirksam gegen solide Tumoren. In einer entsprechenden Studie haben Lin *et al.* gezeigt, dass die HDAC-Hemmung in 43% von 30 getesteten humanen Krebszelllinien zur Entwicklung eines metastatischen Phänotyps führte. Die Arbeitsgruppe konnte weiterhin zeigen, dass diese durch HDAC-Inhibitoren verstärkte Zellmigration und Metastasierung durch gleichzeitige Behandlung mit den Proteinkinase-C-Inhibitoren Tamoxifen und Curcumin unterdrückt werden kann (147). Dies zeigt, dass eine erfolgreiche Behandlung von soliden Tumoren mit HDAC-Inhibitoren die Verwendung von Kombinationstherapien erfordern kann, von denen sich mehrere derzeit in klinischen Studien befinden (148). In der Tat wurden vielversprechende klinische Ergebnisse bei der Behandlung von metastasiertem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom beobachtet, wenn die Vorinostat-Behandlung mit Carboplatin und Paclitaxel kombiniert wurde, sowie bei Brustkrebspatientinnen, wenn MS-275 mit einem Aromatasehemmer kombiniert wurde (149, 150).

Nebenwirkungen

Wie schon mehrfach erwähnt, ist der klinische Nutzen von Pan-HDAC-Inhibitoren wie Belinostat, Vorinostat und Panobinostat inklusive relativ selektiver Substanzen wie Chidamid oder Romidepsin häufig durch ihre signifikanten Nebenwirkungen limitiert (151). Zusätzlich zeigen die verfügbaren Daten, dass sie, obwohl wirksam bei verschiedenen hämatologischen Malignitäten, gegen solide Tumoren wenig effektiv sind, vermutlich aufgrund ineffektiv niedriger Konzentrationen (152). Dies hat zu großen Anstrengungen geführt, HDAC-Inhibitoren mit größerer Selektivität und Gewebedurchdringung zu identifizieren bzw. zu entwickeln, in der Hoffnung, ihr therapeutisches Potenzial aufrechtzuerhalten oder sogar zu erweitern und gleichzeitig das Risiko von Nebenwirkungen zu verringern. Welche Nebenwirkungen aber rufen HDAC-Inhibitoren nun aber tatsächlich hervor?

Obwohl HDAC-Inhibitoren mit einer ganzen Reihe von Nebenwirkungen verbunden sind, wie Kopfschmerzen, Müdigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Husten, Hautausschlag, Fieber und Gewichtsverlust, sind diese normalerweise nicht schwerwiegend oder nicht schwerwiegend genug, um eine Therapie abubrechen und können meist leicht behandelt werden. Nach den oben beschriebenen Knockout-Studien, waren durch das Fehlen mehrerer HDAC schwerwiegende Herzprobleme in den entsprechenden Mäusen aufgetreten. Lässt sich dies auch in mit HDAC-Inhibitoren behandelten Patienten beobachten? Schiattarella *et al.* haben sich dieser Frage angenommen und eine Meta-Analyse von 62 Studien mit einer Gesamtpatientenpopulation von 3268 vorgenommen (153). Hier zeigte sich, dass der Einsatz von HDAC-Inhibitoren häufige, aber letztlich nur leichte kardiale Nebenwirkungen hervorriefen, die hauptsächlich aus EKG-Anomalien einschließlich ST-T-Anomalien und QT-Verlängerung bestanden. Hier stachen Romidepsin (25,3%) und Panobinostat (22,3%) mit der höchsten Inzidenz heraus. Schwerwiegende kardiale Nebenwirkungen traten weitaus

seltener auf. Ventrikuläre Tachykardie z.B. zeigte eine Inzidenz von 0,6% in der gesamten Studienkohorte und hier wieder hauptsächlich bei Patienten die mit Romidepsin (2,0%) behandelt wurden. Eine neuere Herzstudie bei Patienten mit fortgeschrittenen malignen Erkrankungen stellt allerdings fest, dass die Romidepsin-Behandlung trotz der Verwendung von QT-verlängernden Antiemetika die korrigierte QT selbst bei suprathérapeutischen Dosen nicht signifikant verlängerte und dass Romidepsin in noch keiner Studie mit Myokardschäden oder Herzfunktionsstörungen in Verbindung gebracht wurde (154).

Weiterhin wird über gastrointestinale Nebenwirkungen nach der Behandlung mit allen fünf Wirkstoffen berichtet. Panobinostat kann bei 25% der behandelten Patienten zu schwerer Diarrhö (Grad 3 oder 4) führen und eine Dosisreduktion oder einen Therapieabbruch rechtfertigen. Schwere Durchfälle als Nebenwirkung mögen auch einer der Gründe sein, warum HDAC-Inhibitoren für unseren Anwendungsfall, chronisch entzündliche Darmenterkrankungen noch in relativ wenigen klinischen Studien zu finden sind.

Es gibt noch keine Berichte über klinisch offensichtliche Hepatotoxizität mit einem dieser Wirkstoffe. Allerdings finden sich erhöhte Serumtransaminasen und/oder Bilirubin nach Behandlung mit Romidepsin, Panobinostat, Belinostat und Chidamid, jedoch nicht bei Vorinostat (151). Nach einem behandlungsbedingten Tod im Zusammenhang mit Leberversagen in einer klinischen Studie mit Belinostat empfiehlt die FDA Leberfunktionstests vor der Behandlung und vor Beginn jedes Zyklus durchzuführen.

Aus den Analysen der Knockout-Mäuse sowie abgeleitet von den gewünschten Wirkungen wie Apoptose-Induktion, Genexpressions-Störungen und DNA-Schäden, ist eine teratogene Wirkung von HDAC-Inhibitoren naheliegend und wurde auch bereits mehrfach in Tierexperimenten bestätigt (155).

Letztlich sind somit für die bisherigen Anwendungsfälle in der Onkologie die Nebenwirkungen in gewissen Grenzen vertretbar. Einer Ausweitung der Indikationen auf Stoffwechsel- und Autoimmunerkrankungen stehen sie aber unter Umständen entgegen. Hier warten noch viele Aufgaben auf Pharmazeuten und klinische Forscher, die richtigen Inhibitoren für den richtigen Anwendungsfall zu entwickeln bzw. zu entdecken sowie die bisher zur Verfügung stehenden HDAC-Inhibitoren in der richtigen Dosis, Kombination oder verpackt in ein spezifisches DDS zu verabreichen.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Histon-Deazetylasen (HDAC)-Inhibitoren im Entzündungsgeschehen therapeutisch wirksam sind und es konnten verschiedene zugrundeliegenden Mechanismen identifiziert und beschrieben werden.

HDAC sind evolutionär hochkonservierte Enzyme, welche bisher in der Entwicklungsbiologie und in der Onkologie gut untersucht sind. Obwohl HDAC ursprünglich als Regulatoren der Gentranskription beschrieben wurden, vermittelt über die Deazetylierung von Histonen und die darauffolgende Kondensierung des Chromatins, kennt man inzwischen viele weitere Zielproteine, welche nicht nur im Zellkern, sondern auch im Zytoplasma über Azetylierung und Deazetylierung reguliert werden. Diese Eigenschaft, lässt auf Funktionen, nicht nur in der Gewebsentwicklung oder in der Tumorentstehung schließen, sondern auch auf die Aktivierung/Inaktivierung adulter Zellen, wie zum Beispiel der Immunantwort von Leukozyten. Eine der HDAC, welche zwischen Kern und Zytoplasma translozieren und wirken können, ist HDAC5, ein Klasse II HDAC. Und tatsächlich konnten wir zeigen, dass die pro-inflammatorische Antwort von Makrophagen direkt von der Expressionshöhe von HDAC5 abhängt.

Ihre Rolle von HDAC in der Tumorbilogie macht diese Proteine auch als Zielstrukturen für chemische Inhibitoren als Therapeutika interessant. Von diesen sogenannten HDAC-Inhibitoren sind mittlerweile mehrere gegen hämatologische Erkrankungen im klinischen Einsatz und befinden auch für solide Tumoren in zahlreichen klinischen Studien. Jedoch konnten in verschiedenen prä-klinischen Studien auch anti-inflammatorische Effekte dieser Wirkstoffe nachgewiesen werden. In den hier beschriebenen Studien analysierten wir die Wirkung von verschiedenen HDAC-Inhibitoren in Modellen experimenteller Kolitis inklusive Entzündungs-assoziiierter Tumorgenese und identifizierten mehrere Mechanismen, wie diese Wirkung in dem hochkomplexen intestinalen Entzündungsgeschehen zustande kommt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass mit, im Vergleich zur onkologischen Wirkung, sehr niedrigen Dosen der HDAC-Inhibitoren bereits eine anti-inflammatorische Wirkung erzielt werden kann. Diese Wirkung konnten wir für verschiedene Inhibitoren in verschiedenen Kolitis-Modellen bestätigen. Auch in Entzündungs-abhängigen Tumorgenese-Modellen waren HDAC-Inhibitoren wirksam, was wir auf eine Inhibierung der NF- κ B-Aktivität zurückführen konnten. In aufwendigen Untersuchungen konnten wir einerseits beweisen, dass durch HDAC-Inhibitoren die Polarisierung von naiven T-Helfer(Th)-Zellen zu pro-inflammatorischen Th17-Zellen gestört wird, und dass andererseits die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen gefördert wird. Dieser Effekt gründete sich auf eine Dysregulation des IL-6/IL-6-Rezeptor-Signaltransduktionspfades der T-Zellen aber auch der Makrophagen und konnte direkt mit einer Hyperazetylierung des *I16R*-Locus erklärt werden. Zuletzt konnten wir noch eine Förderung der epithelialen Wundschließung durch die Behandlung mit HDAC-

Inhibitoren zeigen, welche sich auf eine erhöhte TGF β -Expression der Epithelzellen und eine anschließende autokrine Wirkung dieses Zytokins begründet.

Trotz der prä-klinischen Ergebnisse unserer, aber auch anderer Arbeitsgruppe, wurden bisher sehr wenige klinische Studien mit breit wirkenden Pan-HDAC-Inhibitoren für chronisch-entzündliche Erkrankungen durchgeführt. Dies liegt vermutlich daran, dass die vielfältigen Nebenwirkungen für nicht-onkologische Ansätze nicht gerechtfertigt scheinen. Givinostat wurde als einziger Pan-HDAC-Inhibitor in einer Studie für juvenile Arthritis für sicher befunden und ist somit auch ein aussichtsreicher Kandidat für weitere klinische Studien für entzündliche Erkrankungen.

Ein Merkmal, das man berücksichtigen muss, ist die globale Wirkung der meisten HDAC-Inhibitoren auf HDACs in einer lebenden Zelle. Sie stören eine Vielzahl von zellulären Proteinen, die an zentralen Prozessen in Bezug auf Überleben, Homöostase oder Differenzierung beteiligt sind. Obwohl RNA-Expressionsanalysen zeigten, dass nur ein geringer Prozentsatz der Gene tatsächlich von diesen Verbindungen betroffen ist, ist das Ergebnis einer Behandlung mit HDAC-Inhibitoren auf zellulärer Ebene immer noch nicht vorhersehbar. Die Dosis, bei der Apoptose oder Anergie oder eine verminderte Zytokinexpression auftreten, kann zwischen Zelltypen, Geweben und den angegebenen HDAC-Inhibitoren variieren. Darüber hinaus zeigen verschiedene HDAC-Inhibitoren wie Valproinsäure Effekte, die über die Hemmung von HDAC hinausgehen.

Während es sinnvoll ist, die verfügbaren HDAC-Inhibitoren weiterhin auf ihre therapeutische Kapazität zu untersuchen, sollte dieser Schritt mit Ansätzen zur Hemmung spezifischer HDACs einhergehen. Zukünftige Behandlungen sollten also entweder HDAC-spezifisch sein oder mit zellspezifischen *Drug Delivery*-Systemen kombiniert werden, um die Nebenwirkungen gering zu halten, aber gleichzeitig die Möglichkeiten der Hemmung dieser kritischen Enzyme aufrecht zu erhalten.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass HDAC interessante therapeutische Zielstrukturen in der (intestinalen) Entzündung darstellen, eine höhere Spezifität der entsprechenden Inhibitoren für eine breitere Anwendung aber unumgänglich sein wird.

Literaturangaben

1. Baumgart, D. C., and W. J. Sandborn. 2012. Crohn's disease. *Lancet* 380: 1590-1605.
2. Danese, S., and C. Fiocchi. 2011. Ulcerative colitis. *N Engl J Med* 365: 1713-1725.
3. Dignass, A., J. C. Preiss, D. E. Aust, F. Autschbach, A. Ballauff, G. Barretton, B. Bokemeyer, S. Fichtner-Feigl, S. Hagel, K. R. Herrlinger, G. Jantschek, A. Kroesen, W. Kruis, T. Kucharzik, J. Langhorst, M. Reinshagen, G. Rogler, D. Schleiermacher, C. Schmidt, S. Schreiber, H. Schulze, E. Stange, M. Zeitz, J. C. Hoffmann, and A. Stallmach. 2011. [Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011]. *Z Gastroenterol* 49: 1276-1341.
4. Strobel, D., R. S. Goertz, and T. Bernatik. 2011. Diagnostics in inflammatory bowel disease: ultrasound. *World J Gastroenterol* 17: 3192-3197.
5. Dixon, L. J., A. Kabi, K. P. Nickerson, and C. McDonald. 2015. Combinatorial effects of diet and genetics on inflammatory bowel disease pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis* 21: 912-922.
6. Leone, V., E. B. Chang, and S. Devkota. 2013. Diet, microbes, and host genetics: the perfect storm in inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* 48: 315-321.
7. Turpin, W., A. Goethel, L. Bedrani, and K. Croitoru MdcM. 2018. Determinants of IBD Heritability: Genes, Bugs, and More. *Inflamm Bowel Dis* 24: 1133-1148.
8. Lee, Y. K., and S. K. Mazmanian. 2010. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* 330: 1768-1773.
9. Jostins, L., S. Ripke, R. K. Weersma, R. H. Duerr, D. P. McGovern, K. Y. Hui, J. C. Lee, L. P. Schumm, Y. Sharma, C. A. Anderson, J. Essers, M. Mitrovic, K. Ning, I. Cleynen, E. Theatre, S. L. Spain, S. Raychaudhuri, P. Goyette, Z. Wei, C. Abraham, J. P. Achkar, T. Ahmad, L. Amininejad, A. N. Ananthakrishnan, V. Andersen, J. M. Andrews, L. Baidoo, T. Balschun, P. A. Bampton, A. Bitton, G. Boucher, S. Brand, C. Buning, A. Cohain, S. Cichon, M. D'Amato, D. De Jong, K. L. Devaney, M. Dubinsky, C. Edwards, D. Ellinghaus, L. R. Ferguson, D. Franchimont, K. Fransen, R. Geary, M. Georges, C. Gieger, J. Glas, T. Haritunians, A. Hart, C. Hawkey, M. Hedl, X. Hu, T. H. Karlsen, L. Kupcinkas, S. Kugathasan, A. Latiano, D. Laukens, I. C. Lawrance, C. W. Lees, E. Louis, G. Mahy, J. Mansfield, A. R. Morgan, C. Mowat, W. Newman, O. Palmieri, C. Y. Ponsioen, U. Potocnik, N. J. Prescott, M. Regueiro, J. I. Rotter, R. K. Russell, J. D. Sanderson, M. Sans, J. Satsangi, S. Schreiber, L. A. Simms, J. Sventoraityte, S. R. Targan, K. D. Taylor, M. Tremelling, H. W. Verspaget, M. De Vos, C. Wijmenga, D. C. Wilson, J. Winkelmann, R. J. Xavier, S. Zeissig, B. Zhang, C. K. Zhang, H. Zhao, I. B. D. G. C. International, M. S. Silverberg, V. Annese, H. Hakonarson, S. R. Brant, G. Radford-Smith, C. G. Mathew, J. D. Rioux, E. E. Schadt, M. J. Daly, A. Franke, M. Parkes, S. Vermeire, J. C. Barrett, and J. H. Cho. 2012. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491: 119-124.
10. Rausch, P., A. Rehman, S. Kunzel, R. Hasler, S. J. Ott, S. Schreiber, P. Rosenstiel, A. Franke, and J. F. Baines. 2011. Colonic mucosa-associated microbiota is influenced by an interaction of Crohn disease and FUT2 (Secretor) genotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 19030-19035.
11. Lane, E. R., T. L. Zisman, and D. L. Suskind. 2017. The microbiota in inflammatory bowel disease: current and therapeutic insights. *J Inflamm Res* 10: 63-73.
12. Frank, D. N., C. E. Robertson, C. M. Hamm, Z. Kpadeh, T. Zhang, H. Chen, W. Zhu, R. B. Sartor, E. C. Boedeker, N. Harpaz, N. R. Pace, and E. Li. 2011. Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 17: 179-184.
13. Morgan, X. C., T. L. Tickle, H. Sokol, D. Gevers, K. L. Devaney, D. V. Ward, J. A. Reyes, S. A. Shah, N. LeLeiko, S. B. Snapper, A. Bousvaros, J. Korzenik, B. E. Sands, R. J. Xavier, and C. Huttenhower. 2012. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol* 13: R79.
14. Ott, S. J., M. Musfeldt, D. F. Wenderoth, J. Hampe, O. Brant, U. R. Folsch, K. N. Timmis, and S. Schreiber. 2004. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53: 685-693.

15. Narula, N., Z. Kassam, Y. Yuan, J. F. Colombel, C. Ponsioen, W. Reinisch, and P. Moayyedi. 2017. Systematic Review and Meta-analysis: Fecal Microbiota Transplantation for Treatment of Active Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 23: 1702-1709.
16. De Vroey, B., C. De Cassan, C. Gower-Rousseau, and J. F. Colombel. 2010. Editorial: Antibiotics earlier, IBD later? *Am J Gastroenterol* 105: 2693-2696.
17. Halme, L., P. Paavola-Sakki, U. Turunen, M. Lappalainen, M. Farkkila, and K. Kontula. 2006. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 12: 3668-3672.
18. Yazdanyar, S., P. R. Kamstrup, A. Tybjaerg-Hansen, and B. G. Nordestgaard. 2010. Penetrance of NOD2/CARD15 genetic variants in the general population. *CMAJ* 182: 661-665.
19. Loftus, E. V., Jr. 2004. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126: 1504-1517.
20. Molodecky, N. A., I. S. Soon, D. M. Rabi, W. A. Ghali, M. Ferris, G. Chernoff, E. I. Benchimol, R. Panaccione, S. Ghosh, H. W. Barkema, and G. G. Kaplan. 2012. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 142: 46-54 e42; quiz e30.
21. Khasawneh, M., A. D. Spence, J. Addley, and P. B. Allen. 2017. The role of smoking and alcohol behaviour in the management of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 31: 553-559.
22. Ventham, N. T., N. A. Kennedy, A. T. Adams, R. Kalla, S. Heath, K. R. O'Leary, H. Drummond, I. B. consortium, I. C. consortium, D. C. Wilson, I. G. Gut, E. R. Nimmo, and J. Satsangi. 2016. Integrative epigenome-wide analysis demonstrates that DNA methylation may mediate genetic risk in inflammatory bowel disease. *Nat Commun* 7: 13507.
23. Scarpa, M., and E. Stylianou. 2012. Epigenetics: Concepts and relevance to IBD pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis* 18: 1982-1996.
24. Dabritz, J., and T. R. Menheniott. 2014. Linking immunity, epigenetics, and cancer in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 20: 1638-1654.
25. Chapman, C. G., and J. Pekow. 2015. The emerging role of miRNAs in inflammatory bowel disease: a review. *Therap Adv Gastroenterol* 8: 4-22.
26. Taman, H., C. G. Fenton, I. V. Hensel, E. Anderssen, J. Florholmen, and R. H. Paulssen. 2018. Genome-wide DNA Methylation in Treatment-naive Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis* 12: 1338-1347.
27. Howell, K. J., J. Kraiczy, K. M. Nayak, M. Gasparetto, A. Ross, C. Lee, T. N. Mak, B. K. Koo, N. Kumar, T. Lawley, A. Sinha, P. Rosenstiel, R. Heuschkel, O. Stegle, and M. Zilbauer. 2018. DNA Methylation and Transcription Patterns in Intestinal Epithelial Cells From Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Diseases Differentiate Disease Subtypes and Associate With Outcome. *Gastroenterology* 154: 585-598.
28. Ansari, I., G. Raddatz, J. Gutekunst, M. Ridnik, D. Cohen, M. Abu-Remaileh, T. Tuganbaev, H. Shapiro, E. Pikarsky, E. Elinav, F. Lyko, and Y. Bergman. 2020. The microbiota programs DNA methylation to control intestinal homeostasis and inflammation. *Nat Microbiol* 5: 610-619.
29. BB, C., and R. H. 1925. The sigmoidoscopic picture of chronic ulcerative colitis (non-specific). *The American Journal of the Medical Sciences* 170: 220-227.
30. Munkholm, P. 2003. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 18 Suppl 2: 1-5.
31. Rutter, M. D., B. P. Saunders, K. H. Wilkinson, S. Rumbles, G. Schofield, M. A. Kamm, C. B. Williams, A. B. Price, I. C. Talbot, and A. Forbes. 2004. Cancer surveillance in longstanding ulcerative colitis: endoscopic appearances help predict cancer risk. *Gut* 53: 1813-1816.
32. Sebastian, S., V. Hernandez, P. Myrelid, R. Kariv, E. Tsianos, M. Toruner, M. Marti-Gallostra, A. Spinelli, A. E. van der Meulen-de Jong, E. S. Yuksel, C. Gasche, S. Ardizzone, and S. Danese. 2014. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: results of the 3rd ECCO pathogenesis scientific workshop (I). *J Crohns Colitis* 8: 5-18.
33. Okayasu, I. 2012. Development of ulcerative colitis and its associated colorectal neoplasia as a model of the organ-specific chronic inflammation-carcinoma sequence. *Pathol Int* 62: 368-380.

34. Eaden, J. A., K. R. Abrams, and J. F. Mayberry. 2001. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 48: 526-535.
35. Olen, O., R. Erichsen, M. C. Sachs, L. Pedersen, J. Halfvarson, J. Askling, A. Ekblom, H. T. Sorensen, and J. F. Ludvigsson. 2020. Colorectal cancer in ulcerative colitis: a Scandinavian population-based cohort study. *Lancet* 395: 123-131.
36. Thomas, A., and N. Lodhia. 2014. Advanced therapy for inflammatory bowel disease: a guide for the primary care physician. *J Am Board Fam Med* 27: 411-420.
37. Colombel, J. F., W. J. Sandborn, W. Reinisch, G. J. Mantzaris, A. Kornbluth, D. Rachmilewitz, S. Lichtiger, G. D'Haens, R. H. Diamond, D. L. Broussard, K. L. Tang, C. J. van der Woude, P. Rutgeerts, and S. S. Group. 2010. Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 362: 1383-1395.
38. Panaccione, R., S. Ghosh, S. Middleton, J. R. Marquez, B. B. Scott, L. Flint, H. J. van Hoogstraten, A. C. Chen, H. Zheng, S. Danese, and P. Rutgeerts. 2014. Combination therapy with infliximab and azathioprine is superior to monotherapy with either agent in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 146: 392-400 e393.
39. Sandborn, W. J., B. G. Feagan, P. Rutgeerts, S. Hanauer, J. F. Colombel, B. E. Sands, M. Lukas, R. N. Fedorak, S. Lee, B. Bressler, I. Fox, M. Rosario, S. Sankoh, J. Xu, K. Stephens, C. Milch, A. Parikh, and G. S. Group. 2013. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 369: 711-721.
40. Colombel, J. F., P. J. Rutgeerts, W. J. Sandborn, M. Yang, A. Camez, P. F. Pollack, R. B. Thakkar, A. M. Robinson, N. Chen, P. M. Mulani, and J. Chao. 2014. Adalimumab induces deep remission in patients with Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 12: 414-422 e415.
41. Neurath, M. F. 2017. Current and emerging therapeutic targets for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14: 269-278.
42. Monteleone, I., F. Pallone, and G. Monteleone. 2011. Th17-related cytokines: new players in the control of chronic intestinal inflammation. *BMC Med* 9: 122.
43. Gooderham, M., and K. Papp. 2015. Selective Phosphodiesterase Inhibitors for Psoriasis: Focus on Apremilast. *BioDrugs* 29: 327-339.
44. Schett, G., D. Elewaut, I. B. McInnes, J. M. Dayer, and M. F. Neurath. 2013. How cytokine networks fuel inflammation: Toward a cytokine-based disease taxonomy. *Nat Med* 19: 822-824.
45. Danese, A. 2014. Developmental psychoneuroimmunology: from bench to bedside. *Brain Behav Immun* 36: 27-28.
46. Sandborn, W. J., C. Gasink, L. L. Gao, M. A. Blank, J. Johanns, C. Guzzo, B. E. Sands, S. B. Hanauer, S. Targan, P. Rutgeerts, S. Ghosh, W. J. de Villiers, R. Panaccione, G. Greenberg, S. Schreiber, S. Lichtiger, B. G. Feagan, and C. S. Group. 2012. Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *N Engl J Med* 367: 1519-1528.
47. Sandborn, W. J., S. Ghosh, J. Panes, I. Vranic, C. Su, S. Rousell, W. Niezychowski, and A. I. Study. 2012. Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in active ulcerative colitis. *N Engl J Med* 367: 616-624.
48. Lombardi, P. M., K. E. Cole, D. P. Dowling, and D. W. Christianson. 2011. Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes. *Curr Opin Struct Biol* 21: 735-743.
49. Glauen, R., E. Sonnenberg, M. Zeitz, and B. Siegmund. 2009. HDAC inhibitors in models of inflammation-related tumorigenesis. *Cancer letters* 280: 154-159.
50. Bieliauskas, A. V., and M. K. Pflum. 2008. Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. *Chemical Society reviews* 37: 1402-1413.
51. Kashyap, K., and R. Kakkar. 2020. Exploring structural requirements of isoform selective histone deacetylase inhibitors: a comparative in silico study. *J Biomol Struct Dyn*: 1-16.
52. Eckschlager, T., J. Plch, M. Stiborova, and J. Hrabeta. 2017. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Int J Mol Sci* 18.
53. Gerbeth, L., and R. Glauen. 2019. HDAC und HDAC-Inhibition in der klinischen Forschung. *Trillium Immunologie* Heft 4/2019: 244-247.
54. Mann, B. S., J. R. Johnson, M. H. Cohen, R. Justice, and R. Pazdur. 2007. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist* 12: 1247-1252.

55. Lee, H. Z., V. E. Kwitkowski, P. L. Del Valle, M. S. Ricci, H. Saber, B. A. Habtemariam, J. Bullock, E. Bloomquist, Y. Li Shen, X. H. Chen, J. Brown, N. Mehrotra, S. Dorff, R. Charlab, R. C. Kane, E. Kaminskas, R. Justice, A. T. Farrell, and R. Pazdur. 2015. FDA Approval: Belinostat for the Treatment of Patients with Relapsed or Refractory Peripheral T-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res* 21: 2666-2670.
56. Raedler, L. A. 2016. Farydak (Panobinostat): First HDAC Inhibitor Approved for Patients with Relapsed Multiple Myeloma. *Am Health Drug Benefits* 9: 84-87.
57. Barbarotta, L., and K. Hurley. 2015. Romidepsin for the Treatment of Peripheral T-Cell Lymphoma. *J Adv Pract Oncol* 6: 22-36.
58. Richardson, P. G., R. L. Schlossman, A. N. Roy, A. Panneerselvam, S. Acharyya, M. Sopala, and S. Lonial. 2018. Patient-reported outcomes of multiple myeloma patients treated with panobinostat after ≥ 2 lines of therapy based on the international phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled PANORAMA-1 trial. *Br J Haematol* 181: 628-636.
59. Ornoy, A. 2009. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reprod Toxicol* 28: 1-10.
60. Choi, S. W., T. Braun, L. Chang, J. L. Ferrara, A. Pawarode, J. M. Magenau, G. Hou, J. H. Beumer, J. E. Levine, S. Goldstein, D. R. Couriel, K. Stockerl-Goldstein, O. I. Krijanovski, C. Kitko, G. A. Yanik, M. H. Lehmann, I. Tawara, Y. Sun, S. Paczesny, M. Y. Mapara, C. A. Dinarello, J. F. DiPersio, and P. Reddy. 2014. Vorinostat plus tacrolimus and mycophenolate to prevent graft-versus-host disease after related-donor reduced-intensity conditioning allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 trial. *Lancet Oncol* 15: 87-95.
61. Choi, S. W., T. Braun, I. Henig, E. Gatzka, J. Magenau, B. Parkin, A. Pawarode, M. Riwes, G. Yanik, C. A. Dinarello, and P. Reddy. 2017. Vorinostat plus tacrolimus/methotrexate to prevent GVHD after myeloablative conditioning, unrelated donor HCT. *Blood* 130: 1760-1767.
62. Furlan, A., V. Monzani, L. L. Reznikov, F. Leoni, G. Fossati, D. Modena, P. Mascagni, and C. A. Dinarello. 2011. Pharmacokinetics, safety and inducible cytokine responses during a phase 1 trial of the oral histone deacetylase inhibitor ITF2357 (givinostat). *Mol Med* 17: 353-362.
63. Vojinovic, J., and N. Damjanov. 2011. HDAC inhibition in rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. *Mol Med* 17: 397-403.
64. Nijhuis, L., J. G. C. Peeters, S. J. Vastert, and J. van Loosdregt. 2019. Restoring T Cell Tolerance, Exploring the Potential of Histone Deacetylase Inhibitors for the Treatment of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Front Immunol* 10: 151.
65. Tsuji, N., M. Kobayashi, K. Nagashima, Y. Wakisaka, and K. Koizumi. 1976. A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J Antibiot (Tokyo)* 29: 1-6.
66. Monneret, C. 2005. Histone deacetylase inhibitors. *Eur J Med Chem* 40: 1-13.
67. Hamer, H. M., D. Jonkers, K. Venema, S. Vanhoutvin, F. J. Troost, and R. J. Brummer. 2008. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* 27: 104-119.
68. Steliou, K., M. S. Boosalis, S. P. Perrine, J. Sangerman, and D. V. Faller. 2012. Butyrate histone deacetylase inhibitors. *Biores Open Access* 1: 192-198.
69. Leoni, F., A. Zaliani, G. Bertolini, G. Porro, P. Pagani, P. Pozzi, G. Dona, G. Fossati, S. Sozzani, T. Azam, P. Bufler, G. Fantuzzi, I. Goncharov, S. H. Kim, B. J. Pomerantz, L. L. Reznikov, B. Siegmund, C. A. Dinarello, and P. Mascagni. 2002. The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2995-3000.
70. Leoni, F., G. Fossati, E. C. Lewis, J. K. Lee, G. Porro, P. Pagani, D. Modena, M. L. Moras, P. Pozzi, L. L. Reznikov, B. Siegmund, G. Fantuzzi, C. A. Dinarello, and P. Mascagni. 2005. The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of pro-inflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo. *Mol Med* 11: 1-15.
71. Gatla, H. R., N. Muniraj, P. Thevkar, S. Yavvari, S. Sukhavasi, and M. R. Makena. 2019. Regulation of Chemokines and Cytokines by Histone Deacetylases and an Update on Histone Deacetylase Inhibitors in Human Diseases. *International journal of molecular sciences* 20.
72. Kim, K., A. D. Skora, Z. Li, Q. Liu, A. J. Tam, R. L. Blosser, L. A. Diaz, Jr., N. Papadopoulos, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, and S. Zhou. 2014. Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 11774-11779.
73. Gallagher, S. J., E. Shklovskaya, and P. Hersey. 2017. Epigenetic modulation in cancer immunotherapy. *Current opinion in pharmacology* 35: 48-56.
 74. Guerriero, J. L., A. Sotayo, H. E. Ponichtera, J. A. Castrillon, A. L. Pourzia, S. Schad, S. F. Johnson, R. D. Carrasco, S. Lazo, R. T. Bronson, S. P. Davis, M. Lobera, M. A. Nolan, and A. Letai. 2017. Class IIa HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages. *Nature* 543: 428-432.
 75. Furusawa, Y., Y. Obata, S. Fukuda, T. A. Endo, G. Nakato, D. Takahashi, Y. Nakanishi, C. Uetake, K. Kato, T. Kato, M. Takahashi, N. N. Fukuda, S. Murakami, E. Miyauchi, S. Hino, K. Atarashi, S. Onawa, Y. Fujimura, T. Lockett, J. M. Clarke, D. L. Topping, M. Tomita, S. Hori, O. Ohara, T. Morita, H. Koseki, J. Kikuchi, K. Honda, K. Hase, and H. Ohno. 2013. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504: 446-450.
 76. Duffy, M. M., M. C. Regan, P. Ravichandran, C. O'Keane, M. G. Harrington, J. M. Fitzpatrick, and P. R. O'Connell. 1998. Mucosal metabolism in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 41: 1399-1405.
 77. Schulthess, J., S. Pandey, M. Capitani, K. C. Rue-Albrecht, I. Arnold, F. Franchini, A. Chomka, N. E. Ilott, D. G. W. Johnston, E. Pires, J. McCullagh, S. N. Sansom, C. V. Arancibia-Carcamo, H. H. Uhlig, and F. Powrie. 2019. The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages. *Immunity* 50: 432-445 e437.
 78. Mullican, S. E., C. A. Gaddis, T. Alenghat, M. G. Nair, P. R. Giacomini, L. J. Everett, D. Feng, D. J. Steger, J. Schug, D. Artis, and M. A. Lazar. 2011. Histone deacetylase 3 is an epigenomic brake in macrophage alternative activation. *Genes & development* 25: 2480-2488.
 79. Stathopoulos, G. T., T. P. Sherrill, D. S. Cheng, R. M. Scoggins, W. Han, V. V. Polosukhin, L. Connelly, F. E. Yull, B. Fingleton, and T. S. Blackwell. 2007. Epithelial NF-kappaB activation promotes urethane-induced lung carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 18514-18519.
 80. Joosten, L. A., F. Leoni, S. Meghji, and P. Mascagni. 2011. Inhibition of HDAC activity by ITF2357 ameliorates joint inflammation and prevents cartilage and bone destruction in experimental arthritis. *Mol Med* 17: 391-396.
 81. Glauben, R., A. Batra, I. Fedke, M. Zeitz, H. A. Lehr, F. Leoni, P. Mascagni, G. Fantuzzi, C. A. Dinarello, and B. Siegmund. 2006. Histone hyperacetylation is associated with amelioration of experimental colitis in mice. *Journal of immunology* 176: 5015-5022.
 82. Glauben, R., A. Batra, T. Stroh, U. Erben, I. Fedke, H. A. Lehr, F. Leoni, P. Mascagni, C. A. Dinarello, M. Zeitz, and B. Siegmund. 2008. Histone deacetylases: novel targets for prevention of colitis-associated cancer in mice. *Gut* 57: 613-622.
 83. Glauben, R., E. Sonnenberg, M. Wetzels, P. Mascagni, and B. Siegmund. 2014. Histone deacetylase inhibitors modulate interleukin 6-dependent CD4+ T cell polarization in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* 289: 6142-6151.
 84. Koenen, H. J., R. L. Smeets, P. M. Vink, E. van Rijssen, A. M. Boots, and I. Joosten. 2008. Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 112: 2340-2352.
 85. de Zoeten, E. F., L. Wang, H. Sai, W. H. Dillmann, and W. W. Hancock. 2010. Inhibition of HDAC9 increases T regulatory cell function and prevents colitis in mice. *Gastroenterology* 138: 583-594.
 86. Poralla, L., T. Stroh, U. Erben, M. Sittig, S. Liebig, B. Siegmund, and R. Glauben. 2015. Histone deacetylase 5 regulates the inflammatory response of macrophages. *Journal of cellular and molecular medicine* 19: 2162-2171.
 87. Cantley, M. D., D. P. Fairlie, P. M. Bartold, V. Marino, P. K. Gupta, and D. R. Haynes. 2015. Inhibiting histone deacetylase 1 suppresses both inflammation and bone loss in arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 54: 1713-1723.
 88. Vizioli, M. G., T. Liu, K. N. Miller, N. A. Robertson, K. Gilroy, A. B. Lagnado, A. Perez-Garcia, C. Kiourtis, N. Dasgupta, X. Lei, P. J. Kruger, C. Nixon, W. Clark, D. Jurk, T. G. Bird, J. F. Passos, S. L. Berger, Z. Dou, and P. D. Adams. 2020. Mitochondria-to-nucleus retrograde

- signaling drives formation of cytoplasmic chromatin and inflammation in senescence. *Genes Dev* 34: 428-445.
89. Mikuda, N., R. Schmidt-Ullrich, E. Kargel, L. Golusda, J. Wolf, U. E. Hopken, C. Scheidereit, A. A. Kuhl, and M. Kolesnichenko. 2020. Deficiency in IkappaBalpha in the intestinal epithelium leads to spontaneous inflammation and mediates apoptosis in the gut. *J Pathol* 251: 160-174.
 90. Witt, O., H. E. Deubzer, T. Milde, and I. Oehme. 2009. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett* 277: 8-21.
 91. Lagger, G., D. O'Carroll, M. Rembold, H. Khier, J. Tischler, G. Weitzer, B. Schuettengruber, C. Hauser, R. Brunmeir, T. Jenuwein, and C. Seiser. 2002. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J* 21: 2672-2681.
 92. Montgomery, R. L., C. A. Davis, M. J. Potthoff, M. Haberland, J. Fielitz, X. Qi, J. A. Hill, J. A. Richardson, and E. N. Olson. 2007. Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev* 21: 1790-1802.
 93. Bhaskara, S., B. J. Chyla, J. M. Amann, S. K. Knutson, D. Cortez, Z. W. Sun, and S. W. Hiebert. 2008. Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control. *Mol Cell* 30: 61-72.
 94. Knutson, S. K., B. J. Chyla, J. M. Amann, S. Bhaskara, S. S. Huppert, and S. W. Hiebert. 2008. Liver-specific deletion of histone deacetylase 3 disrupts metabolic transcriptional networks. *EMBO J* 27: 1017-1028.
 95. Vega, R. B., K. Matsuda, J. Oh, A. C. Barbosa, X. Yang, E. Meadows, J. McAnally, C. Pomajzl, J. M. Shelton, J. A. Richardson, G. Karsenty, and E. N. Olson. 2004. Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 119: 555-566.
 96. Chang, S., T. A. McKinsey, C. L. Zhang, J. A. Richardson, J. A. Hill, and E. N. Olson. 2004. Histone deacetylases 5 and 9 govern responsiveness of the heart to a subset of stress signals and play redundant roles in heart development. *Mol Cell Biol* 24: 8467-8476.
 97. Zhang, Y., S. Kwon, T. Yamaguchi, F. Cubizolles, S. Rousseaux, M. Kneissel, C. Cao, N. Li, H. L. Cheng, K. Chua, D. Lombard, A. Mizeracki, G. Matthias, F. W. Alt, S. Khochbin, and P. Matthias. 2008. Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol Cell Biol* 28: 1688-1701.
 98. Chang, S., B. D. Young, S. Li, X. Qi, J. A. Richardson, and E. N. Olson. 2006. Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10. *Cell* 126: 321-334.
 99. Kasler, H. G., H. W. Lim, D. Mottet, A. M. Collins, I. S. Lee, and E. Verdin. 2012. Nuclear export of histone deacetylase 7 during thymic selection is required for immune self-tolerance. *EMBO J* 31: 4453-4465.
 100. Haberland, M., M. H. Mokalled, R. L. Montgomery, and E. N. Olson. 2009. Epigenetic control of skull morphogenesis by histone deacetylase 8. *Genes Dev* 23: 1625-1630.
 101. Zhang, C. L., T. A. McKinsey, S. Chang, C. L. Antos, J. A. Hill, and E. N. Olson. 2002. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell* 110: 479-488.
 102. Dahiya, S., U. H. Beier, L. Wang, R. Han, J. Jiao, T. Akimova, A. Angelin, D. C. Wallace, and W. W. Hancock. 2020. HDAC10 deletion promotes Foxp3(+) T-regulatory cell function. *Sci Rep* 10: 424.
 103. Huang, J., L. Wang, S. Dahiya, U. H. Beier, R. Han, A. Samanta, J. Bergman, E. M. Sotomayor, E. Seto, A. P. Kozikowski, and W. W. Hancock. 2017. Histone/protein deacetylase 11 targeting promotes Foxp3+ Treg function. *Sci Rep* 7: 8626.
 104. Ropero, S., M. F. Fraga, E. Ballestar, R. Hamelin, H. Yamamoto, M. Boix-Chornet, R. Caballero, M. Alaminos, F. Setien, M. F. Paz, M. Herranz, J. Palacios, D. Arango, T. F. Orntoft, L. A. Aaltonen, S. Schwartz, Jr., and M. Esteller. 2006. A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition. *Nat Genet* 38: 566-569.
 105. Sjoblom, T., S. Jones, L. D. Wood, D. W. Parsons, J. Lin, T. D. Barber, D. Mandelker, R. J. Leary, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, P. Buckhaults, C. Farrell, P. Meeh, S. D. Markowitz, J. Willis, D. Dawson, J. K. Willson, A. F. Gazdar, J. Hartigan, L. Wu, C. Liu, G. Parmigiani, B. H. Park, K. E. Bachman, N. Papadopoulos, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, and V. E.

- Velculescu. 2006. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314: 268-274.
106. Senese, S., K. Zaragoza, S. Minardi, I. Muradore, S. Ronzoni, A. Passafaro, L. Bernard, G. F. Draetta, M. Alcalay, C. Seiser, and S. Chiocca. 2007. Role for histone deacetylase 1 in human tumor cell proliferation. *Mol Cell Biol* 27: 4784-4795.
 107. Halkidou, K., L. Gaughan, S. Cook, H. Y. Leung, D. E. Neal, and C. N. Robson. 2004. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 59: 177-189.
 108. Ozdag, H., A. E. Teschendorff, A. A. Ahmed, S. J. Hyland, C. Blenkiron, L. Bobrow, A. Veerakumarasivam, G. Burt, T. Subkhankulova, M. J. Arends, V. P. Collins, D. Bowtell, T. Kouzarides, J. D. Brenton, and C. Caldas. 2006. Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers. *BMC Genomics* 7: 90.
 109. Mottet, D., A. Bellahcene, S. Pirotte, D. Waltregny, C. Deroanne, V. Lamour, R. Lidereau, and V. Castronovo. 2007. Histone deacetylase 7 silencing alters endothelial cell migration, a key step in angiogenesis. *Circ Res* 101: 1237-1246.
 110. Friedrich, M., L. Gerbeth, M. Gerling, R. Rosenthal, K. Steiger, C. Weidinger, J. Keye, H. Wu, F. Schmidt, W. Weichert, B. Siegmund, and R. Glauben. 2019. HDAC inhibitors promote intestinal epithelial regeneration via autocrine TGFbeta1 signalling in inflammation. *Mucosal immunology* 12: 656-667.
 111. Sonnenberg, E. 2017. Histon Deazetylase-spezifische Modifikation inflammatorischer Mediatoren. In *Charité - Universitätsmedizin Berlin, Refubium - Freie Universität Berlin Repository*.
 112. Hull, E. E., M. R. Montgomery, and K. J. Leyva. 2016. HDAC Inhibitors as Epigenetic Regulators of the Immune System: Impacts on Cancer Therapy and Inflammatory Diseases. *Biomed Res Int* 2016: 8797206.
 113. Vigushin, D. M., S. Ali, P. E. Pace, N. Mirsaidi, K. Ito, I. Adcock, and R. C. Coombes. 2001. Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo. *Clin Cancer Res* 7: 971-976.
 114. Deroanne, C. F., K. Bonjean, S. Servotte, L. Devy, A. Colige, N. Clause, S. Blacher, E. Verdin, J. M. Foidart, B. V. Nusgens, and V. Castronovo. 2002. Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene* 21: 427-436.
 115. Schroeder, M., M. O. Krebs, S. Bleich, and H. Frieling. 2010. Epigenetics and depression: current challenges and new therapeutic options. *Curr Opin Psychiatry* 23: 588-592.
 116. Lee, J. Y., S. Maeng, S. R. Kang, H. Y. Choi, T. H. Oh, B. G. Ju, and T. Y. Yune. 2014. Valproic acid protects motor neuron death by inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress-mediated cytochrome C release after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 31: 582-594.
 117. Sugita, K., H. Yoshida, M. Matsumoto, and S. Matsutani. 1992. A novel compound, depudecin, induces production of transformation to the flat phenotype of NIH3T3 cells transformed by ras-oncogene. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 379-387.
 118. Kwon, H. J., T. Owa, C. A. Hassig, J. Shimada, and S. L. Schreiber. 1998. Depudecin induces morphological reversion of transformed fibroblasts via the inhibition of histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3356-3361.
 119. Marks, B. D., S. A. Fakhoury, W. J. Frazee, H. C. Eliason, and S. M. Riddle. 2011. A substrate-independent TR-FRET histone deacetylase inhibitor assay. *J Biomol Screen* 16: 1247-1253.
 120. Choudhary, C., B. T. Weinert, Y. Nishida, E. Verdin, and M. Mann. 2014. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 536-550.
 121. Ververis, K., A. Hiong, T. C. Karagiannis, and P. V. Licciardi. 2013. Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents. *Biologics* 7: 47-60.
 122. Huang, P. H., C. H. Chen, C. C. Chou, A. M. Sargeant, S. K. Kulp, C. M. Teng, J. C. Byrd, and C. S. Chen. 2011. Histone deacetylase inhibitors stimulate histone H3 lysine 4 methylation in part via transcriptional repression of histone H3 lysine 4 demethylases. *Mol Pharmacol* 79: 197-206.

123. Halsall, J. A., N. Turan, M. Wiersma, and B. M. Turner. 2015. Cells adapt to the epigenomic disruption caused by histone deacetylase inhibitors through a coordinated, chromatin-mediated transcriptional response. *Epigenetics Chromatin* 8: 29.
124. Gu, W., and R. G. Roeder. 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90: 595-606.
125. Jin, Y. H., E. J. Jeon, Q. L. Li, Y. H. Lee, J. K. Choi, W. J. Kim, K. Y. Lee, and S. C. Bae. 2004. Transforming growth factor-beta stimulates p300-dependent RUNX3 acetylation, which inhibits ubiquitination-mediated degradation. *J Biol Chem* 279: 29409-29417.
126. Salghetti, S. E., M. Muratani, H. Wijnen, B. Futcher, and W. P. Tansey. 2000. Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3118-3123.
127. Li, Y., X. Zhang, R. D. Polakiewicz, T. P. Yao, and M. J. Comb. 2008. HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced beta-catenin nuclear localization. *J Biol Chem* 283: 12686-12690.
128. Jeong, J. W., M. K. Bae, M. Y. Ahn, S. H. Kim, T. K. Sohn, M. H. Bae, M. A. Yoo, E. J. Song, K. J. Lee, and K. W. Kim. 2002. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111: 709-720.
129. Adcock, I. M. 2007. HDAC inhibitors as anti-inflammatory agents. *Br J Pharmacol* 150: 829-831.
130. Qin, H. T., H. Q. Li, and F. Liu. 2017. Selective histone deacetylase small molecule inhibitors: recent progress and perspectives. *Expert Opin Ther Pat* 27: 621-636.
131. Grant, S., C. Easley, and P. Kirkpatrick. 2007. Vorinostat. *Nat Rev Drug Discov* 6: 21-22.
132. Piekarz, R. L., R. Frye, M. Turner, J. J. Wright, S. L. Allen, M. H. Kirschbaum, J. Zain, H. M. Prince, J. P. Leonard, L. J. Geskin, C. Reeder, D. Joske, W. D. Figg, E. R. Gardner, S. M. Steinberg, E. S. Jaffe, M. Stetler-Stevenson, S. Lade, A. T. Fojo, and S. E. Bates. 2009. Phase II multi-institutional trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin as monotherapy for patients with cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 27: 5410-5417.
133. Bates, S. E., Z. Zhan, K. Steadman, T. Obrzut, V. Luchenko, R. Frye, R. W. Robey, M. Turner, E. R. Gardner, W. D. Figg, S. M. Steinberg, A. Ling, T. Fojo, K. W. To, and R. L. Piekarz. 2010. Laboratory correlates for a phase II trial of romidepsin in cutaneous and peripheral T-cell lymphoma. *Br J Haematol* 148: 256-267.
134. Foss, F., R. Advani, M. Duvic, K. B. Hymes, T. Intragumtornchai, A. Lekhakula, O. Shpilberg, A. Lerner, R. J. Belt, E. D. Jacobsen, G. Laurent, D. Ben-Yehuda, M. Beylot-Barry, U. Hillen, P. Knoblauch, G. Bhat, S. Chawla, L. F. Allen, and B. Pohlman. 2015. A Phase II trial of Belinostat (PXD101) in patients with relapsed or refractory peripheral or cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Haematol* 168: 811-819.
135. DeAngelo, D. J., A. Spencer, K. N. Bhalla, H. M. Prince, T. Fischer, T. Kindler, F. J. Giles, J. W. Scott, K. Parker, A. Liu, M. Woo, P. Atadja, K. K. Mishra, and O. G. Ottmann. 2013. Phase Ia/II, two-arm, open-label, dose-escalation study of oral panobinostat administered via two dosing schedules in patients with advanced hematologic malignancies. *Leukemia* 27: 1628-1636.
136. Taori, K., V. J. Paul, and H. Luesch. 2008. Structure and activity of largazole, a potent antiproliferative agent from the Floridian marine cyanobacterium *Symploca* sp. *J Am Chem Soc* 130: 1806-1807.
137. Li, X., Z. Tu, H. Li, C. Liu, Z. Li, Q. Sun, Y. Yao, J. Liu, and S. Jiang. 2013. Biological evaluation of new largazole analogues: alteration of macrocyclic scaffold with click chemistry. *ACS Med Chem Lett* 4: 132-136.
138. Batchu, S. N., A. S. Brijmohan, and A. Advani. 2016. The therapeutic hope for HDAC6 inhibitors in malignancy and chronic disease. *Clinical science* 130: 987-1003.
139. Santo, L., T. Hideshima, A. L. Kung, J. C. Tseng, D. Tamang, M. Yang, M. Jarpe, J. H. van Duzer, R. Mazitschek, W. C. Ogier, D. Cirstea, S. Rodig, H. Eda, T. Scullen, M. Canavese, J. Bradner, K. C. Anderson, S. S. Jones, and N. Raje. 2012. Preclinical activity, pharmacodynamic, and pharmacokinetic properties of a selective HDAC6 inhibitor, ACY-1215, in combination with bortezomib in multiple myeloma. *Blood* 119: 2579-2589.
140. Institute, D.-F. C. 2015. Selective inhibitors for histone deacetylase 6 and method thereof. In *US20150197497*.

141. Balasubramanian, S., J. Ramos, W. Luo, M. Sirisawad, E. Verner, and J. J. Buggy. 2008. A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas. *Leukemia* 22: 1026-1034.
142. Inc., P. 2015. Selective inhibitors of histone deacetylase. *US20150320758*.
143. Qiao, Z., S. Ren, W. Li, X. Wang, M. He, Y. Guo, L. Sun, Y. He, Y. Ge, and Q. Yu. 2013. Chidamide, a novel histone deacetylase inhibitor, synergistically enhances gemcitabine cytotoxicity in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 434: 95-101.
144. Sun, T., Y. S. Zhang, B. Pang, D. C. Hyun, M. Yang, and Y. Xia. 2014. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Engl* 53: 12320-12364.
145. Yin, Q., J. Shen, Z. Zhang, H. Yu, and Y. Li. 2013. Reversal of multidrug resistance by stimuli-responsive drug delivery systems for therapy of tumor. *Adv Drug Deliv Rev* 65: 1699-1715.
146. El Bahhaj, F., I. Denis, L. Pichavant, R. Delatouche, F. Collette, C. Linot, D. Pouliquen, M. Gregoire, V. Heroguez, C. Blanquart, and P. Bertrand. 2016. Histone Deacetylase Inhibitors Delivery using Nanoparticles with Intrinsic Passive Tumor Targeting Properties for Tumor Therapy. *Theranostics* 6: 795-807.
147. Lin, K. T., Y. W. Wang, C. T. Chen, C. M. Ho, W. H. Su, and Y. S. Jou. 2012. HDAC inhibitors augmented cell migration and metastasis through induction of PKCs leading to identification of low toxicity modalities for combination cancer therapy. *Clin Cancer Res* 18: 4691-4701.
148. Robert, L., A. Ribas, and S. Hu-Lieskovan. 2016. Combining targeted therapy with immunotherapy. Can 1+1 equal more than 2? *Semin Immunol* 28: 73-80.
149. Ramalingam, S. S., M. L. Maitland, P. Frankel, A. E. Argiris, M. Koczywas, B. Gitlitz, S. Thomas, I. Espinoza-Delgado, E. E. Vokes, D. R. Gandara, and C. P. Belani. 2010. Carboplatin and Paclitaxel in combination with either vorinostat or placebo for first-line therapy of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 28: 56-62.
150. Yardley, D. A., R. R. Ismail-Khan, B. Melichar, M. Lichinitser, P. N. Munster, P. M. Klein, S. Cruickshank, K. D. Miller, M. J. Lee, and J. B. Trepel. 2013. Randomized phase II, double-blind, placebo-controlled study of exemestane with or without entinostat in postmenopausal women with locally recurrent or metastatic estrogen receptor-positive breast cancer progressing on treatment with a nonsteroidal aromatase inhibitor. *J Clin Oncol* 31: 2128-2135.
151. Shah, R. R. 2019. Safety and Tolerability of Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors in Oncology. *Drug Saf* 42: 235-245.
152. Gryder, B. E., Q. H. Sodji, and A. K. Oyelere. 2012. Targeted cancer therapy: giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed. *Future Med Chem* 4: 505-524.
153. Schiattarella, G. G., A. Sannino, E. Toscano, F. Cattaneo, B. Trimarco, G. Esposito, and C. Perrino. 2016. Cardiovascular effects of histone deacetylase inhibitors epigenetic therapies: Systematic review of 62 studies and new hypotheses for future research. *Int J Cardiol* 219: 396-403.
154. Sager, P. T., B. Balsler, J. Wolfson, J. Nichols, R. Pilot, S. Jones, and H. A. Burris. 2015. Electrocardiographic effects of class 1 selective histone deacetylase inhibitor romidepsin. *Cancer Med* 4: 1178-1185.
155. Giavini, E., and E. Menegola. 2014. Teratogenic activity of HDAC inhibitors. *Curr Pharm Des* 20: 5438-5442.

Danksagung

Ich danke Britta Siegmund und der Arbeitsgruppe in aktueller und früherer Zusammensetzung (insbesondere der HDAC-Crew und Inka Freise) sowie allen beteiligten Kooperationspartnern, FEM-Mitarbeitern, Kollegen und natürlich Core-Facility-Leitern.

Erklärung

Gemäß § 4 Abs. 3 (k) der Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur guten wissenschaftlichen Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.
