

Professur für Immunologie
der Justus-Liebig-Universität Giessen

**Etablierung eines Chromatin-Immunpräzipitations
Assays (ChIP) zur Untersuchung der Beteiligung
von STAT3 an dem Signalweg von IL-1**

Diplomarbeit

Dem Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität vorgelegt

von Heidrun Windisch

zur Erlangung des akademischen Grades
Diplom-Biologin

Giessen, März 2007

Erklärung

Ich versichere, dass ich die Diplomarbeit mit dem Titel `Etablierung eines Chromatin-Immunpräzipitations Assays (ChIP) zur Untersuchung der Beteiligung von STAT3 an dem Signalweg von IL-1` selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Giessen, 05. März 2007

Heidrun Sigrid Windisch

Referent: Prof. Dr. M. Martin

Professur für Immunologie

Justus-Liebig-Universität Giessen

Korreferent: Prof. Dr. A. Dorresteijn

Institut für allgemeine und spezielle Zoologie

Justus-Liebig-Universität Giessen

Danken möchte ich...

zuerst Herrn Prof. Dr. Michael Martin für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine Unterstützung und für die Betreuung dieses interessanten Themas.

Herrn Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn für die Übernahme des Zweitgutachtens.

besonders auch Herrn Dr. Christian Kollewe, der mir oft bei dieser Arbeit sehr engagiert und hilfreich mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn Dr. Marek Bartkuhn für die Beratung in Sachen ChIP-Technik und für die freundliche Erlaubnis den Branson250- Sonicator im Institut für Genetik in Giessen benutzen zu dürfen.

Frau Nadine Hein, am Institut für Biochemie und Molekularbiologie im Klinikum der RWTH Aachen, die mir ebenfalls mit ihrer Erfahrung bei der Etablierung der ChIP-Technik beratend zur Seite stand.

den Technischen Angestellten Betty Reiz, Miriam Findt und Heidi Müller für viele Tipps, die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre ständige Hilfsbereitschaft.

allen übrigen Mitarbeitern der Professur für Immunologie: Herrn PD Dr. Ross, Thomas Körner, Christoph Linke, Thomas Kirchner, Shafaqat Ali und Thomas Schmidt für viele Anregungen und Diskussionen.

Ein ganz besonderes Dankeschön

geht an meine Eltern, die trotz der Entfernung ganz nah waren, mir mit lieben Worten soviel Halt gegeben und dieses Studium ermöglicht haben. Darüber hinaus danke ich meinen lieben Freundinnen Katharina und Katrin, die immer für mich da waren und meinem großen Schatz Sasha, der immer an mich geglaubt hat.

Gliederung

1	EINLEITUNG.....	6
1.1	Das angeborene Immunsystem	6
1.1.1	Signaltransduktion in der TIR-Familie	7
1.1.2	Signaltransduktion durch den JAK-STAT-Weg	11
1.2	Das Gleichgewicht zwischen Entzündung und Heilung.....	13
1.3	ChIP Technik.....	15
1.4	Aufgabenstellung dieser Arbeit.....	19
2	MATERIAL UND METHODEN.....	20
2.1	Kits und Reagenzien	20
2.1.1	DNA Aufarbeitung.....	20
2.1.2	Elisa Kits	20
2.1.3	Marker.....	20
2.1.4	PCR Reagenzien.....	20
2.1.5	Proteinanalytische Zusätze und Reagenzien	20
2.1.6	Stimuli	21
2.1.7	Zellkultur Reagenzien.....	21
2.2	Besondere Geräte.....	21
2.3	Biologisches Material.....	22
2.3.1	Antikörper	22
2.3.2	Primer	22
2.3.3	Zelllinien.....	23
2.4	Zellkultur	24
2.5	Kultivierung eukaryotischer Zellen	24
2.5.1	Adhärente Zellen	24
2.5.2	Suspensionszellen.....	25
2.5.3	Zellzahlbestimmung.....	25
2.5.4	Gewinnung von PBMCs	26

2.5.5	Einfrieren von Zellen.....	26
2.5.6	Auftauen von Zellen.....	27
2.6	Bioassay und ELISA.....	27
2.7	Proteinchemische Methoden	28
2.7.1	Zytosol-Kern-Trennung in A549	28
2.7.2	Zytosol-Kerntrennung in THP1	29
2.7.3	Proteinbestimmung nach Bradford	30
2.7.4	Immunpräzipitation	31
2.7.5	SDS-PAGE von Proteinen.....	32
2.7.6	Westernblot, Immunfärbung und ECL-Reaktion.....	33
2.7.7	„Strippen“ von Westernblots	34
2.8	ChIP Analysen	35
2.8.1	Aussaat und Crosslink.....	35
2.8.2	Sonifizierung.....	36
2.8.3	Immunkomplexbildung und Waschschrte.....	36
2.8.4	Gewinnung des DNA-Präzipitats.....	38
2.9	Molekularbiologische Methoden.....	39
2.9.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
2.9.2	DNA-Amplifikation durch PCR.....	39
2.9.3	Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel.....	40
3	ERGEBNISSE	42
3.1	Etablierung der ChIP-Technik	42
3.1.1	Auswahl geeigneter humaner Zelllinien	42
3.1.2	Erstellen eines Protokolls für reine Zytosol-Kern-Trennungen in A549	43
3.1.3	Überprüfen der Translokation von p65/Rel-A in den Kern nach verschiedenen langer IL-1 β Simulation.....	44
3.1.4	Überprüfen der Stabilität des Immunkomplexes während der ChIP-Waschschrte	47
3.1.5	Erstellen eines reproduzierbaren Sonifizierungs- Protokolls.....	48
3.1.5.1	Optimierung der benötigten Gesamtenergie und Zyklenzahl.....	48
3.1.5.2	Auswirkung verschieden langer Crosslinkzeiten auf die Effizienz der Sonifizierung ..	49
3.1.5.3	Auswirkungen verschiedener Lysepuffer auf die Sonifizierung.....	50
3.1.6	Überprüfen der PCR-Bedingungen für die Amplifikation des IL-8 Promotors.....	53
3.1.7	ChIP-Assay unter optimierten Bedingungen	53

3.1.8	Etablieren einer konstitutiven ChIP-Positiv-Kontrolle	56
3.1.8.1	Testen des Antikörpers im WB	56
3.1.8.2	Überprüfen der Stabilität des Immunkomplexes während der ChIP-Waschschritte ...	57
3.1.8.3	Überprüfen der PCR Bedingungen für das Aktin Gen	58
3.2	Untersuchungen zur Beteiligung von STAT3 am IL-1-Weg	59
3.2.1	Auswahl von Zelllinien für „Crosstalk“-Analysen	59
3.2.2	Kinetik der ansprechbaren Zelllinien im Bioassay	59
3.2.3	Erstellen eines Protokolls für reine Zytosol-Kerntrennungen in THP1	61
3.2.4	Translokation von STAT3 nach IL-6 Stimulation	62
3.2.5	Translokation von STAT3 nach LPS Stimulation	64
4	DISKUSSION	65
4.1	Etablierung eines ChIP-Protokolls am IL-1 Weg	65
4.1.1	Crosslink und Sonifizierung	67
4.1.2	NF- κ B-ChIP und weiterführende Experimente	68
4.2	Unterschiedliche Phosphorylierungsmuster von STAT3	69
5	ZUSAMMENFASSUNG	72
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	73
7	LITERATUR	76

1 Einleitung

1.1 Das angeborene Immunsystem

Da alle höheren Lebewesen den ständigen Angriffen von Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten gegenüberstehen, haben sich verschiedene Mechanismen entwickelt, eine Infiltration abzuwenden, einzudämmen und zu bekämpfen. Dies setzt jedoch das Vermögen voraus, die jeweilige Gefahr eindeutig zu erkennen, um entsprechend darauf reagieren zu können. In diesem Zusammenhang hat sich zunächst das angeborene Immunsystem entwickelt. In Vertebraten findet man zusätzlich ein adaptives Immunsystem. Bei beiden Systemen werden krankheitserregende Strukturen, so genannte Pathogene, durch verschiedene gewebespezifische und spezialisierte Zellen erkannt. Darüber hinaus verfügt das angeborene System auch über proteolytische Kaskaden, die bei einer Infiltration aktiviert werden (Komplement-System). Die dazugehörigen Faktoren liegen konstitutiv im Blut vor und werden bei einer Aktivierung gespalten, wobei ein Teil des Proteins auf den Pathogenen fixiert wird. Dies dient letztlich der Markierung von fremden Strukturen und der schnellen Verstärkung der Abwehrreaktion, um eine systemische Ausbreitung zu verhindern. Lösliche Spaltprodukte von Komplementfaktoren wirken dabei als Anaphylatoxine, um Makrophagen und Neutrophile Granulozyten chemotaktisch anzulocken und zu aktivieren, damit diese die markierten Pathogene eliminieren.

Alle Zellen des angeborenen, als auch des adaptiven Immunsystems gehen aus einem gemeinsamen Vorläufer hervor. Dabei handelt es sich um die hämatopoetische Stammzelle, die auch der Vorläufer für Erythrozyten und Blutplättchen ist. Aus dieser werden weitere pluripotente Zellen differenziert: ein lymphoider Vorläufer, aus dem alle Zellen des adaptiven Immunsystems hervorgehen und eine myeloische Vorläuferzelle, von der alle Zellen des angeborenen Immunsystems abstammen. Einen Sonderfall stellen dabei die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) da, die aus dem lymphoiden Vorläufer hervorgehen und dennoch bei der angeborenen Abwehr tätig sind. Diese Zellen erkennen entweder durch das Fehlen, oder anhand von Peptiden in den ubiquitär exprimierten MHC I Molekülen, ob Zellen durch Viren oder intrazelluläre Bakterien infiziert sind. Gegebenenfalls können NK-Zellen die befallenen Zellen durch Apoptose eliminieren, um eine weitere Ausbreitung einzudämmen.

Zellen des angeborenen Immunsystems können spezifisch Pathogenstrukturen erkennen und schließlich durch die Ausschüttung von löslichen Mediatoren die Zellen in der

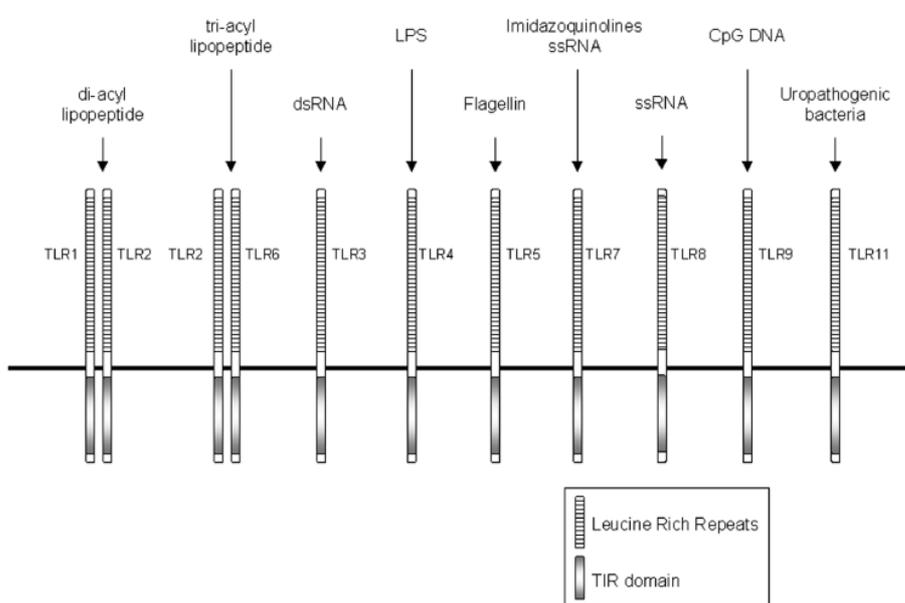
Umgebung in Alarmbereitschaft versetzen. Die Fremdstrukturen können ebenfalls durch „Wächterzellen“ (Makrophagen und Dendritische Zellen) phagozytiert werden, um sie im Laufe einer Infiltration den Zellen des adaptiven Immunsystems zu präsentieren und diese gegebenenfalls zu aktivieren. Dies geschieht im Lymphknoten. Dabei wird in T- und B-Zellen die Rezeptorstruktur, die MHC II Moleküle mit Fremd-Peptid erkennt, durch eine Rekombination der Gene und zufällige Modifikation in millionenfacher Ausführung variiert. Dadurch entsteht die adaptive Immunität, die hochspezifisch ist und daraus abgeleitet, das immunologische Gedächtnis. Voraussetzung für diese Leistung bleibt jedoch die Reaktion des angeborenen Immunsystems, welche die erste schnelle Verteidigung des Organismus organisiert.

Da die Wahrnehmung von pathogenen Strukturen die Aufgabe der Zellen des angeborenen Immunsystems ist, benötigen diese spezifische Rezeptoren, um eindeutig erkennen zu können, welche Bedrohung vorliegt. Deshalb sind die „Wächterzellen“ mit einem breiten Spektrum von verschiedenen Sensoren ausgestattet. Bei einer Aktivierung von Mustererkennungs-Rezeptoren, die auch als *pattern recognition receptors* (PRR) bezeichnet werden, werden Oberflächenstrukturen mit vielen Wiederholungen eines Bausteins erkannt, so genannte *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs). Dadurch wird die Produktion von löslichen Alarmmediatoren induziert. Neben Hormonen, Eikosanoiden und Stickstoffmonoxid spielen die Zytokine hier als „Sprache des Immunsystems“ eine wichtige Rolle, da sie die lokalen und auch systemischen Abwehrmechanismen von Effektor- und Gewebezellen modulieren (Monokine, Lymphokine und Chemokine), die Ausdifferenzierung und Determination aus hämatopoetischen Vorläuferzellen steuern (Kolonie stimulierende Faktoren) und Schutzmechanismen, etwa bei viralen Infektionen, aktivieren (Interferone). Deshalb sind Effektor- und Gewebezellen ebenfalls mit einer Bandbreite an Sensoren ausgestattet, um auf verschiedene Mediatoren reagieren zu können. Das Rezeptor-Spektrum ist dabei keineswegs statisch, sondern kann auf die jeweiligen Umstände angepasst werden.

1.1.1 Signaltransduktion in der TIR-Familie

Bei der TIR-Familie handelt es sich um Proteine, die eine 200 Aminosäuren lange Domäne zur Reizweiterleitung mit hochkonservierten Bereichen besitzen. Der Name dieser Domäne ergibt sich aus der Homologie der intrazellulären Signaltransduktionsdomänen von Toll- (ähnlichen) und Interleukin-1-Rezeptoren [1, 2]. Bei beiden Rezeptortypen handelt es sich um Transmembranproteine, die sich in der Struktur des zytoplasmatischen Teils und in

der Reizweiterleitung sehr ähnlich sind. Zur TIR-Familie werden auch intrazelluläre Adaptermoleküle gezählt, die ebenfalls eine TIR-Domäne besitzen, aber keine Transmembrandomäne aufweisen und demzufolge auch keine Rezeptorfunktion haben. Die als MyD88-Familie bezeichneten Adaptern, sind für die intrazelluläre Reizweiterleitung von aktivierten TLRs und IL-1 Rezeptoren zuständig und in beiden Signalwegen unentbehrlich [3]. Dementsprechend kann man die TIR-Familie in insgesamt 3 Subfamilien unterteilen: In die TLRs, die IL-1 Rezeptoren und die Adapterproteine [4]. Die TLRs, oder PRRs, besitzen extrazellulär eine leucinreiche Domäne (Leucin-rich-repeats, LRR), die als Bindestelle dient. Des Weiteren beinhalten diese Rezeptoren eine hydrophobe Region, welche die Membran durchspannt und einen intrazellulären Teil mit der TIR-Domäne. Der eigentliche Toll-Rezeptor wurde bei Untersuchungen der embryonalen Entwicklung von *Drosophila melanogaster* entdeckt und ist entscheidend bei der Determination der dorso-ventralen Polarität beteiligt [5-7]. Später übernimmt der Toll-Rezeptor in der adulten Fliege eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Pilzen [8]. Mittlerweile wurden im Menschen 10 verschiedene Toll-ähnliche Rezeptoren eindeutig charakterisiert (Abb. 1), die verschiedene Strukturen erkennen [9].



Structure and ligands for Toll-like receptors (TLRs). dsRNA, double-stranded RNA; LPS, lipopolysaccharide; TIR, Toll/interleukin-1 receptor.

Abb. 1: Bisher charakterisierte Toll-ähnliche Rezeptoren mit den von ihnen erkannten Liganden, bzw. PAMPs [10]

Interessanterweise binden TLR 3, 7, 8 und 9 Ihre Liganden im endosomalen/lysosomalen Kompartiment der Zelle. Sie dienen als Rezeptoren für virale Strukturen wie ssRNA, dsRNA oder GC-reiche DNA (hier auch bakteriell möglich) und werden im Endosomen

aktiv [11].

Die Rezeptoraktivierung wird dabei durch die Bindung eines Pathogens an den extrazellulären Teil und das Ausbilden von homo- oder heterodimeren TLR-Komplexen eingeleitet. Wird nun auf einer „Wächterzelle“ ein Pathogen durch einen TLR gebunden, so können durch die in unmittelbare Nähe gebrachten TIR-Domänen Adaptermoleküle auf der intrazellulären Seite rekrutiert werden, wobei die Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt wird.

Die IL-1 Rezeptoren weisen eine große strukturelle Ähnlichkeit zu den beschriebenen TLRs auf. Auch hier handelt es sich hauptsächlich um Proteine, mit einer Transmembran- und einer intrazellulären TIR-Domäne. Als einzige Ausnahme ist hier der IL-1R II zu nennen, der keine TIR-Domäne besitzt und damit keine Signaltransduktion einleiten kann. Als kompetitiver Rezeptor spielt dieser eine wichtige Rolle bei der Regulation der IL-1 Empfindlichkeit von Zellen [12].

Bei allen IL-1R-Familienmitgliedern weist der extrazelluläre Teil drei immunglobulinähnliche Domänen auf, außer bei dem so genannten *single Ig-domain containing IL-1R related* (SIGIRR), welches nur ein Ig-Motiv besitzt [13]. Zusätzlich können auch lösliche Formen ohne Rezeptorfunktion durch proteolytische Spaltung hergestellt werden [14], um systemischen Überreaktionen entgegenzuwirken.

Das Master-Zytokin IL-1 β ist eines der wichtigsten Alarmmediatoren, die von Zellen des angeborenen Immunsystems ausgeschüttet werden. Es vermittelt durch den IL-1 Rezeptor die Induktion von pro-inflammatorischen Genen, um eine schnelle Antwort auf eine Infektion oder Verletzung zu organisieren. Dementsprechend sind die meisten Effektorzellen mit Rezeptoren der IL-1R-Familie ausgestattet.

Der Prototyp des IL-1 Rezeptors Typ I (IL-1RI) besteht aus zwei Proteinen, die sich bei Ligandenbindung zum Rezeptorkomplex formieren. Dabei wird das IL-1R-Protein mit Ligand vom Co-Rezeptor Protein IL-1AcP erkannt [15]. Der IL-1R ist hochspezifisch für die Liganden IL-1 α , oder $\sim\beta$. Allerdings kann das IL-1RacP auch vom IL-1Rrp2 (*IL-1 Receptor related protein 2*) rekrutiert werden, das 2 verschiedene Formen, agonistisches IL-1 ϵ , als auch antagonistisch wirkendes IL-1 δ , binden kann [16]. Als weitere IL-1R-Familienmitglieder sind der IL-18R mit seinem IL-18AcP, der IL-33R, sowie eine Reihe von „Waisen“-Rezeptoren (*orphan receptors*) zu nennen, deren Co-Rezeptoren noch nicht identifiziert sind.

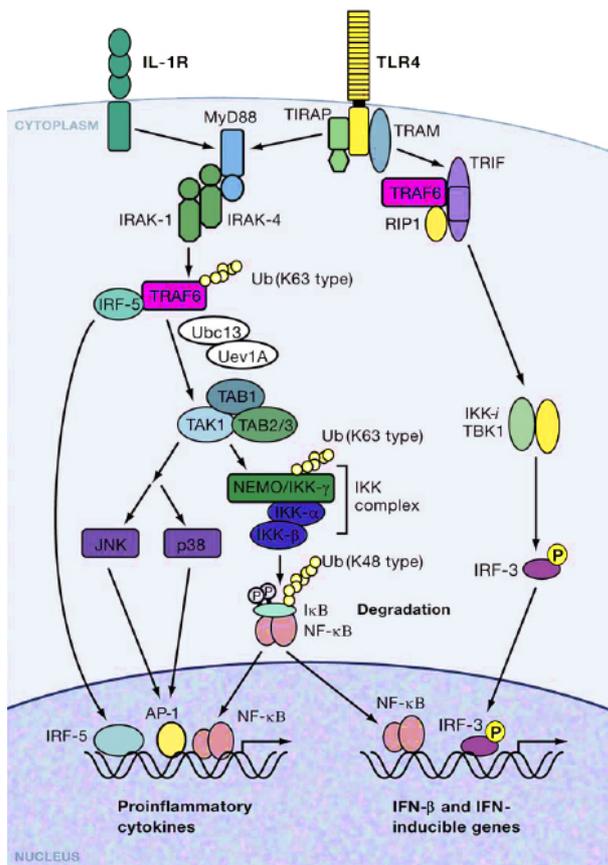


Abb. 2: Übersicht über gemeinsam genutzte Signaltransduktionsmodule bei den TIR- vermittelten Signalwegen des IL-1 Rezeptors und TLR 4. Gleiche Domänen in den unterschiedlichen Molekülen sind jeweils mit der gleichen Form dargestellt. [9]

Sowohl im TLR- (außer bei TLR 3), als auch im IL-1R-Signalweg wird bei einer Rezeptoraktivierung stets das Adapterprotein MyD88 hinzugezogen (Abb.2). Somit spielt es in den beiden Signalwegen eine Schlüsselrolle. Darüber hinaus hat es als einziges Mitglied der MyD88-Familie, neben der TIR-Domäne noch ein weiteres Motiv, eine so genannte Todes-Domäne (Death-Domain, DD). Diese taucht in den folgend rekrutierten Proteinen, einer Gruppe von Serin-Threonin-Kinasen, wieder auf, welche auch als *IL-1-Receptor-associated-kinases* (IRAKs) bezeichnet werden. Dabei wird von der IRAK4, die für die Reizweiterleitung beim TIR-Signalweg unentbehrlich ist [17], IRAK1 rekrutiert und durch Phosphorylierung aktiviert. Darauf löst sich IRAK1 vom Rezeptorkomplex und mobilisiert im Zytoplasma TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*). Dieser fungiert als eine E3-Ubiquitin-Ligase [18, 19]. Dabei katalysiert TRAF6 die Ubiquitinylierung bei sich selbst, als auch bei NEMO (*NF-κB essential modulator*). TRAF6 kann nun TAK1 (*TGF- activated kinase 1*) aktivieren, die wiederum JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38 phosphoryliert. Bei TAK1 handelt es sich um eine MAPKKK, die bei der Phosphorylierung des IKK-Komplexes und der Anschaltung des MAP-Kinaseweges beteiligt ist [20], wodurch schließlich das AP1 (*activator protein1*) mobilisiert wird und im Kern als Transkriptionsfaktor wirken kann. Zusätzlich wird von TAK1 NEMO, und damit auch der IKK-Komplex aktiviert, wobei IKK-β (*I-κB- kinase β*) phosphoryliert wird. Die Kinase modifiziert darauf den Inhibitor von NF-κB, der nach einer Poly-Ubiquitinylierung [19] durch das Proteasom abgebaut wird. Auch die modifizierte IRAK1 wird ubiquitinyliert und proteolytisch zerstört [19, 21].

I-κB maskiert im Zytoplasma die NLS (*nuclear localisation sequence*) von NF-κB. Der

Sowohl im TLR- (außer bei TLR 3), als auch im IL-1R-Signalweg wird bei einer Rezeptoraktivierung stets das Adapterprotein MyD88 hinzugezogen (Abb.2). Somit spielt es in den beiden Signalwegen eine Schlüsselrolle. Darüber hinaus hat es als einziges Mitglied der MyD88-Familie, neben der TIR-Domäne noch ein weiteres Motiv, eine so genannte Todes-Domäne (Death-Domain, DD). Diese taucht in den folgend rekrutierten Proteinen, einer Gruppe von Serin-Threonin-Kinasen, wieder auf, welche auch als *IL-1-Receptor-associated-kinases* (IRAKs) bezeichnet werden. Dabei wird von der IRAK4, die für die Reizweiterleitung beim TIR-Signalweg unentbehrlich ist [17], IRAK1 rekrutiert und durch Phosphorylierung aktiviert. Darauf löst sich IRAK1 vom Rezeptorkomplex und mobilisiert im Zytoplasma TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*). Dieser fungiert als eine E3-Ubiquitin-Ligase [18, 19]. Dabei katalysiert TRAF6 die Ubiquitinylierung bei sich selbst, als auch bei NEMO (*NF-κB essential modulator*). TRAF6 kann nun TAK1 (*TGF- activated kinase 1*) aktivieren, die wiederum JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38 phosphoryliert. Bei TAK1 handelt es sich um eine MAPKKK, die bei der Phosphorylierung des IKK-Komplexes und der Anschaltung des MAP-Kinaseweges beteiligt ist [20], wodurch schließlich das AP1 (*activator protein1*) mobilisiert wird und im Kern als Transkriptionsfaktor wirken kann. Zusätzlich wird von TAK1 NEMO, und damit auch der IKK-Komplex aktiviert, wobei IKK-β (*I-κB- kinase β*) phosphoryliert wird. Die Kinase modifiziert darauf den Inhibitor von NF-κB, der nach einer Poly-Ubiquitinylierung [19] durch das Proteasom abgebaut wird. Auch die modifizierte IRAK1 wird ubiquitinyliert und proteolytisch zerstört [19, 21].

heterodimere Proteinkomplex aus p65 und p50 (Rel-A:NF- κ B1) kann nach dem Abbau des Inhibitors I- κ B, der hier als Silencer wirkt, in den Kern translozieren und als Transkriptionsfaktor die Expression pro-inflammatorischer Zytokine induzieren [22].

Auf diese Weise werden beim TIR-Signalweg durch verschiedene Rezeptortypen, die gleichen Proteine zur Reizweiterleitung benutzt und schließlich pro-inflammatorische Gene induziert. Die Zellen des angeborenen Immunsystems vermitteln dabei durch die Produktion des Alarmmediators IL-1 β Gefahrensignale, die über den gleichen Signalweg in Effektorzellen verschiedene Abwehrstrategien auslösen. Diese werden ebenfalls durch weitere Zytokine, wie IL-6, TGF β , TNF α und IL-8 (ein Chemokin) eingeleitet [23, 24].

1.1.2 Signaltransduktion durch den JAK-STAT-Weg

Bei Zytokinen kann man rein strukturell 3 Hauptgruppen von Ligand-Rezeptor-Komplexen unterscheiden [25]. Zum einen gibt es die TNF-Familie, die sich durch membrangebundene Liganden auszeichnet, was folglich zu Zell-Zell-Kontakten bei der Aktivierung des TNF-Rezeptors mit 3 Transmembranproteinen führt. Auch hier findet die Reizweiterleitung durch in unmittelbare Nähe gebrachte Aktivierungsdomänen auf der intrazellulären Seite statt, wobei es sich hier um Todes-Domänen (DD) handelt, die Caspase-Kaskaden einleiten und Apoptose auslösen. Diese Familie ist besonders wichtig bei der Kontrolle der adaptiven Immunabwehr und in diesem Zusammenhang essenziell für die Wahrung der körpereigenen Integrität.

Des Weiteren werden in der Chemokin-Familie chemotaktisch wirksame Mediatoren, bzw. Chemoattraktoren, für Makrophagen und Granulozyten zusammengefasst, bei der die Signaltransduktion über einen Rezeptor mit sieben Transmembranhelices vermittelt, und ein trimeres G-Protein aktiviert wird.

In der Hämatoopoetin-Familie werden lösliche Faktoren, wie Kolonie stimulierende Faktoren (*colony stimulating factors*, CSF), Interleukine (außer IL-1 α/β , IL-1Ra, IL-16, IL-17, IL-18, IL-25, TGF β , und MIF), und Interferone zusammengefasst, deren Rezeptoren aus meist 2 oder auch 3 Ketten bestehen. Diese Familie soll hier genauer vorgestellt werden.

Die vielen Rezeptorspezifitäten entstehen dabei durch die Kombination von verschiedenen Rezeptorketten. Am häufigsten findet man die IL-2R γ - Kette, oder einfach die konstante gamma-Kette, kurz γ_c . Andere häufig vorkommende Rezeptorkomponenten sind z.B. das IL-2R β - Protein im IL-2 oder IL-15 Rezeptor und das IL-4R α -Protein im IL-4 Rezeptor, oder alternativ im IL-13 Rezeptor. Durch die vielen Kombinationsmöglichkeiten, kann durch die Expression von relativ wenigen verschiedenen Ketten auf der Membran ein sehr breites

Spektrum an Liganden erkannt werden [26]. Auf der intrazellulären Seite besitzen die einzelnen Ketten Bindestellen für Rezeptor-Tyrosin-Kinasen der Janus-Kinasen-Familie (JAK), die wegen ihrer Symmetrie nach dem zweiköpfigen, römischen Gott Janus benannt wurden. Vier verschiedene JAKs können dabei in den verschiedenen Rezeptorkomplexen assoziiert sein: JAK1, JAK2, JAK3 und TYK1 [27].

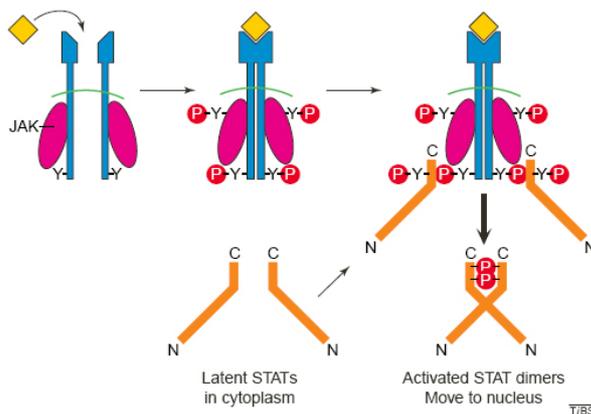


Abb. 3: Prinzip der STAT-Aktivierung durch Ligandenbindung [28], nicht aktive STATs im Zytoplasma sind jedoch meist als hochmolekulare Komplexe arrangiert [29, 30] (hier nicht ersichtlich); gelb: Ligand, blau: Rezeptorketten, violett: assoziierte JAKs, rot: Phosphatreste, orange: STAT-Moleküle

Bei einer Ligandenbindung (Abb. 3) dimerisieren die Ketten in der Plasmamembran und bilden so die Grundstruktur des funktionellen Rezeptors aus. Dabei werden die JAKs in unmittelbare Nähe zueinander gebracht und können durch gegenseitige Phosphorylierung ihre Kinasetätigkeit aktivieren. Im nicht aktivierten Zustand phosphorylieren sich die JAKs geringfügig selbst, wobei die Modifizierung durch regulatorische Phosphatasen wieder entfernt wird [31]. Im Komplex werden

diese jedoch verdrängt, so dass eine volle Aktivierung der Kinase stattfindet. Darauf phosphorylieren die modifizierten JAKs Tyrosinreste an den Rezeptorketten, welche nun als eine neue Bindestelle und gleichzeitig Reaktionsplattform fungieren. So genannte *signal transducers and activators of transcription* (STATs) binden mit ihrer SH2-Domäne (*src homology 2*, phospho-Tyrosin-bindende Domäne) [32] an die Rezeptorketten und werden wiederum selbst von den JAKs an Tyrosinresten phosphoryliert. Die STATs verlassen den Rezeptorkomplex und können durch intramolekulare Wechselwirkungen zwischen der SH2-Domäne und der C-terminalen Domäne (mit dem phospho-Tyrosinrest) dimerisieren. In dieser Form wandern die STATs direkt in den Kern ab, um als Transkriptionsfaktor zu wirken.

STAT Proteine wurden ursprünglich bei der Untersuchung der Signalwege von IFN- α und IFN- γ entdeckt [31, 33]. Einige davon (STAT1/3/4) können neben der Tyrosin-Phosphorylierung an einem zusätzlichen Serinrest phosphoryliert werden. Dieser Rest stellt ein potentielles Substrat für die MAPK dar, wobei durch die Verknüpfung von STAT- und MAPK-Wegen ein „Crosstalk“ zwischen verschiedenen Rezeptorsystemen

entstehen kann. Diese These wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bei zusätzlicher Phosphorylierung eine stärkere transkriptionelle Aktivierung erfolgt [34, 35]. Diese Region kann auch durch alternatives Spleißen entfernt werden, um die Transkriptionseffizienz herabzusetzen. STAT-Moleküle haben eine sequenzspezifische DNA-Binde-Domäne, die bei STAT1 und STAT3 große strukturelle Ähnlichkeit mit der von aktiven NF- κ B (p65-p50, bzw. Rel-A:NF- κ B1-Dimeren) aufweist und so ein gemeinsamer evolutiver Ursprung nicht auszuschließen ist [36]. Die meisten STAT-Dimere binden an GAS-ähnliche (*IFN- γ -activated sequence*) Elemente [37] in der DNA (*inverted repeats* mit der Konsensussequenz `5-TTN₅₋₆AA3`), und induzieren entsprechende Gene mit Hilfe der C-terminal gelegenen Transkriptions-Aktivierungs-Domäne (TAD). In dieser Region befindet sich auch der Serinrest und kann im phosphorylierten Zustand entscheidend die Bindung an den Promotor und damit die Transkriptionseffizienz erhöhen.

Eine Besonderheit bei STAT Molekülen ist, dass sie solange im Kern verbleiben, bis sie von einer nukleären Tyrosin-Phosphatase dephosphoryliert werden und schließlich durch einen aktiven Export aus dem Kern wieder ins Zytoplasma gelangen [31]. Zusätzlich wird die Transkriptionsaktivität und der Abbau durch einen *Protein inhibitor of activated STAT* (PIAS) reguliert, indem dieser STAT Moleküle mit einem Ubiquitin- verwandten Protein, SUMO (*small ubiquitin-like modifier*), modifiziert [38].

Durch die unmittelbare Signaltransduktion und die darauf folgende Geninduktion ist der JAK-STAT-Weg sehr effizient in der Reizweiterleitung, da keine second messenger benötigt werden. Außerdem ist dieses Signalsystem höchst ökonomisch, da durch verschiedene Rezeptor-STAT-Kombinationen viele Spezifitäten für die große Bandbreite an Zytokinen entstehen.

1.2 Das Gleichgewicht zwischen Entzündung und Heilung

Eine schnelle Reaktion durch pro-inflammatorische Mediatoren ist in der primären Immunantwort essentiell für den Organismus. Allerdings muss diese rechtzeitig so moduliert werden, dass es nicht zu systemischen Überreaktionen kommt.

Durch die bereits vorgestellte Signaltransduktion in der TIR-Familie werden die Transkriptionsfaktoren AP1 und NF- κ B aktiviert, die Gene für pro-inflammatorische Mediatoren induzieren. Dazu gehört auch das Zytokin IL-6, welches ein Mitglied der Hämatoepoetin-Familie ist. Dieses Zytokin vermittelt seine Wirkung über einen JAK-STAT-Weg, bei dem STAT3 rekrutiert wird. Die Signaltransduktion erfolgt hier über gp130 (Glykoprotein 130) und das IL-6R α -Protein [39, 40].

Neben den präferierten STAT3-Homodimeren können für die folgenden Signalkaskaden auch Heterodimere mit dem eng verwandten STAT1 gebildet werden [41]. Auf diese Weise basiert die pleiotrope Wirkung des IL-6 auf der unterschiedlichen Rekrutierung verschiedener STAT3 Kombinationen in verschiedenen Zelltypen [42]. Zusätzlich wird STAT3 nicht nur exklusiv von IL-6-Familienmitgliedern rekrutiert, sondern ist auch entscheidend an der embryonalen Entwicklung beteiligt, wie Knock-out-Experimente bei Mäusen mit embryonaler Letalität belegten [43]. Auch in adulten Säugern hängen viele weitere Effekte von diesem Molekül ab: die Entwicklung von Milchdrüsen [44], die Ausbildung von Neuronen [45], die Migration von Keratinozyten bei der Wundheilung, die Regulation des Haarzyklus [46], sowie die Organisation des Thymus [47].

Generell können durch STAT3-Dimere sowohl pro-, als auch anti-inflammatorische Signalkaskaden ausgelöst werden. Zum Beispiel wird in Hepatozyten durch IL-6 die Produktion von Akutphaseproteinen vermittelt [48]. Hingegen wirkt das, ebenfalls über STAT3 vermittelte, Zytokin IL-10 bei Makrophagen als anti-inflammatorischer Mediator. Dabei wird die Proliferation und Reifung gehemmt, sowie die Ausschüttung von IL-1 β , TNF α und IL-6 [49].

Um eine Geninduktion durch IL-10 einleiten zu können, muss STAT3 auch am Ser727 phosphoryliert sein [50]. Für die generelle Aktivierung von STAT3 wird das Molekül im Rezeptorkomplex von der JAK3 am Tyr705 phosphoryliert [51]. Der C-terminal gelegene Serinrest 727 im STAT3 stellt ein potentielles Substrat für verschiedene MAPKs dar [35]. Dabei wird diskutiert, ob die transkriptionelle Verstärkung durch die Serin-Phosphorylierung auf einer verbesserten Affinität zum eigentlichen Rezeptor basiert.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nach LPS Stimulation STAT3 am Ser727 phosphoryliert, und IL-10 exprimiert wird [52]. Dabei erfolgt die Modifikation direkt durch die Serin-Threonin-Kinase IRAK1 aus dem TIR-Signalweg [53]: Experimente mit IRAK1 $-/-$ Milzzellen aus Mäusen belegten, dass nach LPS Stimulation die Modifikation von STAT3 am Ser727 hier exklusiv von der IRAK1 bewerkstelligt wird und IL-10 nur durch das vollständig phosphorylierte STAT3 induziert werden kann [34, 53]. So zeigten IRAK1 $-/-$ Zellen keine IL-10 Expression gegenüber dem WT, sondern reagierten nur mit IL-1 Expression, die ebenfalls beim WT auftrat. Weitere Untersuchungen ergaben, dass in IRAK1 $-/-$ Milzzellen STAT3 nach dem pro-inflammatorischen Reiz zwar am Tyr705 phosphoryliert wurde, eine Kern-Translokation aber ohne Ser727-Phosphorylierung nicht stattfindet [53]. Unabhängig von diesem Sachverhalt wurde eine Kern-Translokation von aktivierter IRAK1 nach Stimulation mit LPS beobachtet [54].

Durch Co-Immunpräzipitationen (in murinen Milzzellen, humanen PBMCs und THP1-Zellen) wurde schließlich aufgedeckt, dass IRAK1 und STAT3 nach einer LPS-Exposition als Komplex im Kern zu finden sind. Durch einen ChIP gegen IRAK1 wurde weiterhin gezeigt, dass IRAK1 nach 2 Stunden Stimulation an den IL-10 Promotor bindet [53]. Dabei ist nicht ausgeschlossen, dass STAT3 die Bindung an die DNA über die TAD-Domäne vermittelt und durch die Fixierung einfach IRAK1 an STAT3 mit quervernetzt worden ist (da hier mit der Formaldehydmethodete gearbeitet wurde, siehe Abschnitt 1.3) und so IRAK1 als direkter Transkriptionsinitiator fraglich bleibt.

Die direkte Aktivierung und Rekrutierung von STAT3 durch IRAK1 ist offensichtlich nach der Konfrontation mit bakteriellem Lipopolysaccharid eine wichtige und entscheidende Maßnahme um rechtzeitig eine Überreaktion von Effektorzellen einzudämmen.

Dieser „Crosstalk“ zwischen verschiedenen Rezeptorsystemen hat dabei auch eine klinische Relevanz. IL-10 weist als anti-inflammatorischer Mediator auf eine bestehende Entzündung hin. So findet man im Blutserum gesunder Menschen kein IL-10, wogegen das Zytokin bei Arteriosklerose-Patienten ständig präsent ist [53]. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass IRAK1 konstitutiv phosphoryliert wird und entsprechende Kaskaden daueraktiviert sind, was eine kontinuierliche Ausschüttung von IL-10 zu Folge hat. Im Fall einer Infektion kann nun das Immunsystem nicht mehr adäquat reagieren, da Effektorzellen durch das Zytokin gehemmt werden und so chronische Krankheitsbilder entstehen.

Demzufolge ist die Erkenntnis, dass das STAT3 auch direkt über den TIR-Signalweg angeschaltet werden kann [53], bei der Entwicklung von therapeutischen Maßnahmen, speziell im Hinblick auf Erkrankungen wie Arteriosklerose von großem Interesse.

1.3 CHIP Technik

Alle lebenswichtigen Funktionen werden durch die Interaktionen von Proteinen mit DNA reguliert. Angefangen von der Transkription, DNA-Replikation und Reparaturmechanismen bis zur Steuerung des Zellzyklus, der Entwicklung von Zellschicksalen, sowie Strategien zum Schutz und Wahrung der eigenen Integrität, ist es von höchstem Interesse, diese Art von Interaktion besser zu verstehen.

Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) ist eine Methode um spezifische Protein-Bindestellen an der DNA *in vivo* zu identifizieren. Mittlerweile wurden, neben Histonen [55] und Transkriptionsfaktoren [56, 57], auch RNA-Protein-Wechselwirkungen mit Hilfe von ChIPs untersucht [58]. Die Technik gliedert sich in 5 Hauptarbeitsschritte (Abb. 4 a-e): Fixierung, Fragmentierung, Immunpräzipitation, Aufreinigung und Analyse DNA-

Fragmente. Im letzten Schritt bieten sich viele verschiedene Möglichkeiten an, die spezifisch angereicherte DNA zu untersuchen: PCRs, Southern Blots, Foot-Prints, Microarrays oder auch Klonierungsexperimente.

Generell unterscheidet man zwei verschiedene Vorgehensweisen: den X-ChIP und den N-ChIP. Bei Letzterem handelt es sich um eine Technik, bei der vorwiegend Proteine untersucht werden, die dauerhaft in großen Mengen an der DNA vorkommen, wie z.B. Histone und deren Isoformen. Das `N` steht für nativ und dementsprechend wird hier nicht fixiert. Die Fragmentierung der DNA wird mit einer Nuklease-Behandlung erreicht [59]. Außerdem ist bei diesem Verfahren nach der Immunpräzipitation die Ausbeute an DNA so hoch, dass keine PCR durchgeführt werden muss. Weitere Details der N-ChIP-Technik sollen hier nicht näher vorgestellt werden.

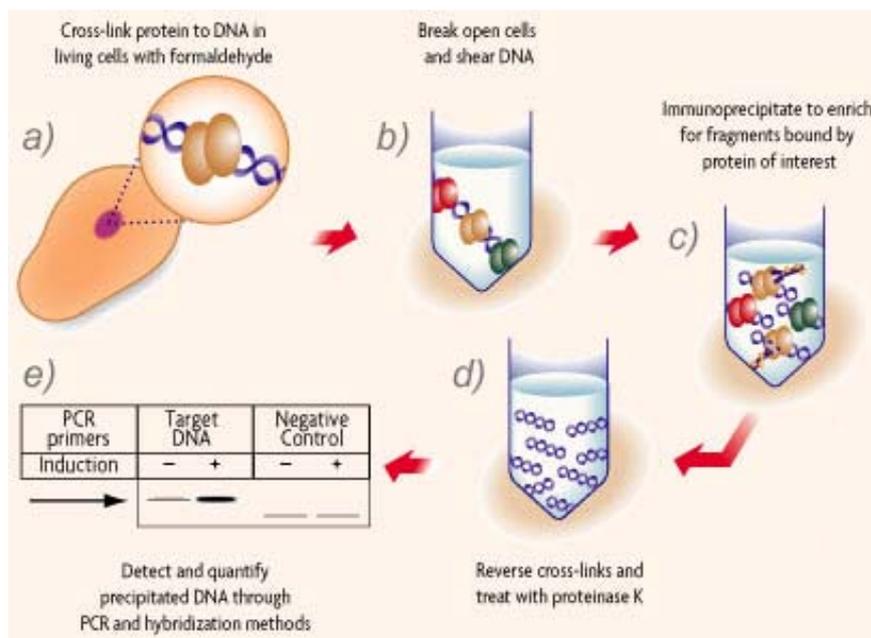


Abb. 4: Schematischer Ablauf eines X-ChIP-Experiments [60]:

- a) fixieren von Protein an DNA *in vivo*,
- b) Fragmentieren der DNA durch Ultraschall-Behandlung,
- c) Immunpräzipitation der Komplexe,
- d) Elution des DNA-Protein-Komplex und Entfernen der Quervernetzung, sowie DNA-Aufreinigung,
- e) Analyse der DNA in einer PCR

Beim X-ChIP können vor allem auch temporär an der DNA lokalisierte Proteine untersucht werden, indem sie zunächst dort fixiert werden. Diese Methode ist wesentlich sensitiver und es genügen weniger Zellen und weniger Antikörper für die Chromatin-Immunpräzipitation. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten eine Quervernetzung zu erreichen (Tab.1).

Tab. 1: Verschiedene Reagenzien für X-ChIP-Fixierung und ihre Eigenschaften

Reagenz	Proteine vernetzt mit	Reaktion, Besonderheiten
Acridin-Orange und Trypan-Blau	DNA	Ausbildung kovalenter Bindung durch Sauerstofffreie Radikale, geeignet für Nuklease- oder Restriktions-Fragmentierung [61, 62]
Cisplatin	DNA	Sehr gut zur Analyse von nukleären Matrixproteinen im Vergleich zur Formaldehydmethode, sehr giftig [63, 64]
Formaldehyd	DNA RNA Protein	Aminogruppe von Lysin und Seitengruppen von Adenin, Guanin und Cytosin reagieren unter Schiff-Basen-Ausbildung, zu langes Crosslinken erschwert die Fragmentierung durch Sonifizieren (Restriktion oder Nuklease-Behandlung nicht möglich), zudem besteht die Gefahr von Epitop-Verlust durch Maskieren mit anderen Proteinen oder Entfalten [65, 66]
UV/ Laser	DNA	bei kurzen Expositionen oft weniger chemische Strukturschädigung als bei anderen Chemikalien [67]

Am häufigsten wird die Formaldehydmethode verwendet, da hier die Quervernetzungen am leichtesten reversibel sind. Der Crosslink kann dabei auch nur zwischen sehr eng gelegenen Strukturen ausgebildet werden (Abstand von $\sim 2 \text{ \AA}$ [68]).

Je nach Präsenz und Menge der Proteine, über welche DNA präzipitiert werden soll, wird üblicherweise die Crosslinkzeit variiert und nicht die Konzentration von Formaldehyd (1% empfohlen). Konstitutiv an der DNA befindliche Proteine können in wesentlich kürzeren Zeiträumen fixiert werden. Die Vernetzung wird schließlich durch die Zugabe von Aminogruppen- haltigen Verbindungen gequench [65], da diese mit den Gruppen von zelleigenen Proteinen um die Bindung mit Formaldehyd kompetieren.

Um sequenzspezifische Protein-Bindestellen durch eine Immunpräzipitation anreichern zu können, muss die DNA gesichert werden. Dabei richtet sich die herzustellende DNA-Fragmentgröße nach der Produktgröße, die später in der PCR amplifiziert werden soll. Dieser Schritt ist, neben einer optimalen Crosslinkzeit, maßgeblich für die Spezifität der Chromatin-Immunpräzipitation. Die DNA-Fragmentierung wird meist durch eine gepulste Ultraschallbehandlung erreicht. Je nach Zelltyp, Sonicator und Fixierdauer müssen die Bedingungen optimiert werden. [65, 69].

Nun können durch eine Co-Immunpräzipitation proteinspezifische DNA-Sequenzen angereichert und aufgereinigt werden. Dabei muss gewährleistet sein, dass die verwendeten Antikörper auch unter den jeweiligen Umständen (Einfluss von Formaldehyd)

gut präzipitieren. Polyklonale Antikörper sind prinzipiell für ChIPs besser geeignet, da sie viele verschiedene Epitope erkennen und die Präzipitation immer noch gut funktioniert, auch wenn einige Bindestellen verdeckt sind. Nach der IP werden die Protein-DNA-Komplexe gewaschen und schließlich vom Trägermaterial (beads) eluiert.

Um im Assay den unspezifischen Hintergrund zu minimieren, gibt es neben Waschschrritten mit verschiedenen Puffern noch andere Möglichkeiten. Zur sonifizierte Probe werden teilweise, vor Zugabe des Antikörpers, Heringssperma-DNA (nicht für spätere Microarrays geeignet), oder Ig-freies BSA beigemischt. Zusätzlich können die verwendeten beads auf diese Weise vorbehandelt werden. Alternativ kann ein „Preclearing“ mit nicht vorbehandelten beads vor der IP durchgeführt werden.

Für eine Charakterisierung der angereicherten DNA müssen die Quervernetzungen gelöst (durch Wärmebehandlung $\sim 68^\circ\text{C}$ für mindestens 4 h) und störende Komponenten, wie RNA und Proteine durch enzymatischen Verdau zerstört werden [34, 38]. Im Anschluss werden die Fragmente aufgereinigt und stehen für eine Analyse bereit.

Die einfachste und gängigste Methode ist die PCR-Analyse. Um Aussagen über eine Gen-Induktion machen zu können, muss die präzipitierte DNA zunächst quantifiziert, und gleiche Mengen in PCRs eingesetzt werden. Wichtig ist an dieser Stelle, dass eine Input-Kontrolle (wird vor der IP entnommen und enthält die gesamte DNA im fragmentierten Zustand) mitgeführt wird, deren Konzentration ebenfalls bestimmt wird. Vom Input werden mehrere titrierte Ansätze in den PCRs mitgeführt.

Die PCR-Produkte werden anschließend durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und nach einer Ethidiumbromidfärbung analysiert, wobei durch densitometrische Untersuchungen genauere Aussagen über eine Geninduktion getroffen werden können. Dabei ergibt sich die Anreicherung von spezifischer DNA (A_{spDNA}) aus dem Quotienten der Netto-Densität eines ChIP-PCR-Produkts $[\text{Dens}_{\text{net}}]_{\text{ChIP}}$ und der Netto-Densität des dazugehörigen Inputs $[\text{Dens}_{\text{net}}]_{\text{Input}}$.

$$A_{\text{spD}} = \frac{[\text{Dens}_{\text{net}}]_{\text{ChIP}}}{[\text{Dens}_{\text{net}}]_{\text{Input}}}$$

Berechnet man die Anreicherung spezifischer DNA nun für einen induzierten ($^{\text{Ind}}A_{\text{spDNA}}$) und einen nicht induzierten Ansatz ($^{\text{Kon}}A_{\text{spDNA}}$), so kann man aus beiden die n-fache Gen-Induktion (I_{Gen}) ermitteln [70].

$$I_{\text{Gen}} = \frac{A_{\text{spDNA}}^{\text{Ind}}}{A_{\text{spDNA}}^{\text{Kon}}}$$

Generell wird für CHIP-PCR-Analysen empfohlen, eine Negativkontrolle mitzuführen. Dabei soll durch ein weiteres Primerpaar die Anreicherung des Zielgens im Verhältnis zu einem genomischen DNA-Fragment bestimmt werden, von dem angenommen wird, dass es nicht durch den CHIP mit angereichert worden ist. Diese Kontrolle ist besonders wichtig, um die Spezifität des Assays sicherzustellen.

1.4 Aufgabenstellung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die CHIP-Technik an einem bekannten Signalweg zu etablieren. Hierfür sollten zunächst die einzelnen Arbeitsschritte der Methode optimiert werden. Im Anschluss daran sollte gezeigt werden, dass nach einem Stimulus eine Gen-Induktion durch die sequenzspezifische Bindung eines Proteins an DNA erfolgt und die Anreicherung von spezifischer DNA, mit Hilfe des erarbeiteten Protokolls erfolgreich ist.

Anhand dieser Technik sollte im Folgenden überprüft werden, ob das Zytokin IL-1 den Selben „Crosstalk“ zwischen dem TIR-Signalweg und dem JAK-STAT-Weg ausgelöst, wie es im Abschnitt 1.3 für LPS beschrieben wurde.

2 Material und Methoden

2.1 Kits und Reagenzien

Alle im Folgenden nicht aufgeführten Chemikalien die für Versuche verwendet wurden, sind von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

2.1.1 DNA Aufarbeitung

Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin Extracts II

2.1.2 Elisa Kits

BD Biosciences, San Diego, USA
BD OptEIA™ Set Human IL-8 ELISA (Katalog # 555244)

BioSource Europe, Nivelles, Belgien
Human IL-8 CytoSets™ (Katalog # CHC1303)
Human IL-10 CytoSets™ (Katalog # CHC1323)

2.1.3 Marker

Fermentas, Burlington Ontario, Kanada
GeneRuler 1kb DNA-Ladder
GeneRuler 100bp DNA-Ladder Plus
Prestained Protein Ladder 10-170kDa

2.1.4 PCR Reagenzien

Fermentas, Burlington Ontario, Kanada
Taq DNA Polymerase
dNTPs
10xTaq-Puffer

MWG-Biotech, München, Deutschland
Oligonukleotide

2.1.5 Proteinanalytische Zusätze und Reagenzien

Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Protein G-Sepharose

Bio-Rad Laboratories, GmbH, München
Bio-Rad Protein Assay (Dye Reagent Concentrate, Katalog # 500-0006)

Dianova, Hamburg, Deutschland

Streptavidin-gekoppelte HRP

Interchim, Montiacun, Frankreich

Uptilight HRP-blot Reagenz A und B

Roche, Mannheim, Deutschland

Proteaseinhibitorencocktail Complete

SIGMA-Aldrich, München, Deutschland

β -Mercaptoethanol

BSA

APS

2.1.6 Stimuli

BASF AG, Ludwigshafen Deutschland

Rekombinantes humanes TNF α

DIFCO Laboratories, Detroit, USA

LPS aus E. coli (Katalog # 3120-25-0)

D. Boraschi, Dompé L'Aquila, Italien

Rekombinantes humanes IL-1 β

PBH, Hannover, Deutschland

Rekombinantes humanes IL-6

SIGMA-Aldrich, München, Deutschland

Poly I:C (Katalog # P0913)

PMA

Ionomycin (Katalog # 13909)

2.1.7 Zellkultur Reagenzien

SIGMA-Aldrich, München, Deutschland

Histopaque (Katalog # 8889)

PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland

FCS

L-Glutamin

Natriumpyruvat

Nicht essentielle Aminosäuren

Trypsin/EDTA-Lösung

2.2 Besondere Geräte

Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Deutschland, Berlin

Ultraschallwandler UW 2070

Stufenhorn SH70G

Sonotrode Mikrospitze MS73

HF-Generator GM2070

INTAS, Göttingen, Deutschland

Chemi Lux Imager

2.3 Biologisches Material

2.3.1 Antikörper

Die im Folgenden aufgelisteten Antikörper wurden in Westernblots als Primärantikörper eingesetzt, oder auch für Immunpräzipitationen verwendet. Die verwendeten Konzentrationen für Immunpräzipitationen werden in den einzelnen Versuchen aufgeführt.

Tab. 2: Verwendete Antikörper und ihre Eigenschaften

Spezifität/Name	Herkunft	Herstellung	Hersteller	Katalog #	[c] WB	Zusätze
Lamin B (M-20)	Ziege	Polyklonal	Santa Cruz	sc-6217	1:400	In 5 % MP
GAPDH (FL-335)	Kaninchen	Polyklonal	Santa Cruz	Sc-25778	1:400	In 5 % MP
I κ B- α (C21)	Kaninchen	Polyklonal	Santa Cruz	Sc-371	1:1000	In 5 % MP
pI κ B- α (Ser32/36)(5A5)	Maus	Monoklonal	CellSignaling	9246	1:2000	In 5 % MP
NF κ B p65 (C-20)	Kaninchen	Polyklonal	Santa Cruz	Sc-372	1:500	In 5 % MP
NF κ B p65 (A)	Kaninchen	Polyklonal	Santa Cruz	Sc-109	1:2000	In 5 % MP
STAT3	Kaninchen	Polyklonal	CellSignaling	9132	1:2000	In 5% BSA
pSTAT3 (B-7) [Tyr 705]	Maus	Monoklonal	Santa Cruz	Sc-8059	1:400	In 5% MP
pSTAT3 (Ser727)-R	Kaninchen	Polyklonal	Santa Cruz	Sc-8001R	1:400	In 5% MP
Pol II (C-21)	Kaninchen	Polyklonal	Santa Cruz	Sc-900	1:200	In 5 % MP

Für Westernblot-Analysen wurden verschiedene Sekundärantikörper verwendet, die alle von Jackson Immuno Research Laboratories bezogen wurden. Dabei handelte es sich um Affinitäts-aufgereinigte, mit Peroxidase konjugierte Antikörper. Diese wurden im Westernblot mit einer Konzentration von 1:10000 in 5 % MP in TBS/T angesetzt.

Tab. 3: sekundäre Antikörper und ihre Eigenschaften

Spezifität	Herkunft	erkennt	Katalog #
α -Kaninchen	Ziege	hc + lc	111-035-045
α -Kaninchen	Maus	lc	211-032-171
α -Maus	Ziege	hc + lc	115-035-062
α -Ziege	Maus	hc + lc	205-001-003

2.3.2 Primer

Für PCRs, die am Ende von ChIP-Analysen durchgeführt wurden, sind Primer von MWG-Biotech, München, Deutschland bezogen worden. Die Primersequenz für die IL-8 Promotor-Region wurde bereits in einem ChIP Assay verwendet [71], sowie die Sequenz für die IL-10

Promotor-Region [72]. Die Primer für das Aktin Gen [73] sollten für Postiv-Kontrollen in CHIP-Analysen verwendet werden.

Tab. 4: verwendete Primer mit Sequenz

Name des Genlokus	Sequenz (5'-3')
Humaner IL-8 Promotor fwd	AAG AAA ACT TTC GTC ATA CTC CG
Humaner IL-8 Promotor rev	TGG CTT TTT ATA TCA TCA CCC TAC
Humaner IL-10 Promotor fwd	CAG CTG TTC TCC CCA GGA AA
Humaner IL-10 Promotor rev	AGG GAG GCC TCT TCA TTC AT
Humanes Aktin fwd	ATG TTT GAG ACC TTC AAC AC
Humanes Aktin rev	CAC GTC ACA CTT CAT GAT GG

2.3.3 Zelllinien

Um für die jeweilige Fragestellung die geeigneten Zellen zu finden, wurden verschiedene humane Zelllinien mit unterschiedlichen Eigenschaften kultiviert. Darunter befanden sich sowohl Suspensions-, als auch adhärenente Zellen. Die Auswahl erfolgte durch Untersuchungen nach verschiedenen Bioassays im ELISA (s. Abschnitt 2.6).

Tab. 5: Eigenschaften und Herkunft der verwendeten Zelllinien

Zelle	Typ	Morphologie
A549	Humanes Lungen Karzinom	Epitheliale Zellen, adhärenent als Einzelzellschicht wachsend
HaCat	Humane Keratinozyten	adhärenent als Einzelzellschicht puzzleartig wachsende Zellen
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen	Fibroblasten- artige Zellen, adhärenent als Einzelzellschicht wachsend
HEK 293 TLR3	s.o. mit stabil transfizierter p ELAM-Luciferase + hTLR 3 (19.08.2004)	s. HEK 293
HeLa	Humanes Gebärmutterhalskarzinom	Epithelartige Zellen, adhärenent als Einzelzellschicht wachsend
HEP G2	Humanes Leberzellkarzinom	Epithelartige Zellen, adhärenent als Einzelzellschicht wachsende Zellen, die kleine Aggregate bilden können
Mono-Mac 6	humane Monozyten- artige Leukämie	Runde bis verformte Suspensionszellen, teilweise in Aggregaten mit wenigen Riesenzellen
THP1	humane Leukämie	Kleine, runde Suspensionszellen mit filopodienartigen Auswüchsen, teilweise in Aggregaten

2.4 Zellkultur

Da die verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Ansprüche haben, um gut zu wachsen und zu proliferieren, wurden diese in folgenden verschiedenen Nährlösungen gehalten.

Tab. 6: Beschreibung und Zellkulturbedingungen für verschiedene Zelllinien

Zelle	Medium	Zusätze	Inkubation
A549	DMEM Ham'sF12	10% FCS 2mM Glutamin	37°C mit 10 % CO ₂
HaCat	DMEM	10% FCS 2mM Glutamin	37°C mit 5-10 % CO ₂
Hek 293	DMEM	10% FCS 2mM Glutamin	37°C mit 10 % CO ₂
Hek 293 TLR3	DMEM	10% FCS 2mM Glutamin Zeocin 125 µg/ml Neomycin 400 µg/ml	37°C mit 10 % CO ₂
HeLa	DMEM	5-10% FCS 2mM Glutamin	37°C mit 5-10 % CO ₂
HEP G2	DMEM	10% FCS 2mM Glutamin	37°C mit 10 % CO ₂
MonoMac6	RPMI 1640	10 % FCS NE AS 1 mM Natriumpyruvat 2 mM Glutamin Insulin (Stock: 10 mg/ml [Sigma 9278] in 25 mM HEPES pH 8,2 = 1000 x)	37°C mit 5 % CO ₂
THP1	RPMI 1640	10 % FCS NE AS 1 mM Natriumpyruvat 2 mM Glutamin	37°C mit 5 % CO ₂

2.5 Kultivierung eukaryotischer Zellen

2.5.1 Adhärente Zellen

Um die adhärenen Zellen zu passagieren, wurde das Medium abgegossen und die Zellen zwei Mal mit sterilem, einfach konzentriertem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml PBS mit 0,05% Trypsin pro Flasche nach einer 2 - 5 min Inkubationszeit unter leichtem Klopfen abgelöst. Die Suspension wurde nun mit 8,5 ml Medium aufgefüllt und mehrmals resuspendiert, um das Trypsin zu verdünnen und die Zellen zu singularisieren. Die adhärenen Zellen wurden montags und freitags passagiert:

Montags wurden jeweils 20 ml mit einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ /ml Zellen in frischem Medium in einer 75 cm² Kulturflasche angesetzt und bei 37°C mit dem entsprechenden CO₂-Gehalt kultiviert. Freitags wurden 20 ml mit einer Zelldichte von 1×10^6 /ml in frischem Medium ausgesät.

500 ml		PBS für die Zellkultur	
13,7	ml	5 M NaCl	137 mM
1,35	ml	1 M KCl	2,7 mM
4,05	ml	1 M Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
735	µl	1 M KH ₂ PO ₄	1,47 mM
pH nicht einstellen!			

2.5.2 Suspensionszellen

Die Passage erfolgte hier durch Übertragen des Volumens der Suspension in frisches Medium, das der gewünschten Zellzahl entsprach. Wenn es sich hierbei um ein Volumen handelte, das größer war, als die Hälfte der gesamten Kultur, so wurden die Zellen 5 min bei 1500 rpm abzentrifugiert und das Zell-Pellet in frischem Medium aufgenommen. MonoMac6 wurden am Montag und am Donnerstag passagiert und mit einer Zelldichte von 2×10^6 /ml in 20 ml frischem Medium ausgesät. THP1 Zellen wurden am Montag und am Mittwoch mit einer Zelldichte von 1×10^6 /ml in 20 ml Medium passagiert, und freitags mit einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ /ml über das Wochenende ausgesät. Bei dieser Zelllinie konnte in einer 75 cm² Kulturflasche auch ein größeres Volumen Zellsuspension mit bis zu 60 ml kultiviert werden.

2.5.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl von Suspensions- und adhärennten Zellen (nach dem Ablösen) wurde mit Hilfe einer Probe bestimmt, die zu gleichen Teilen mit Trypanblau (0,8 % (v/v) Trypanblaulösung in PBS) gemischt wurde. Die Suspension wurde in eine Neubauer Zählkammer gegeben und mikroskopisch die Lebendzellzahl bestimmt. Alle toten Zellen erschienen dabei blau, da durch eine defekte Plasmamembran der Farbstoff in die Zelle eindringen konnte und diese anfärbt wurden. Lebende Zellen dagegen erschienen farblos. Es wurden stets alle 4 Quadranten ausgezählt, der Mittelwert gebildet und die Zellzahl pro ml errechnet.

2.5.4 Gewinnung von PBMCs

Einige Bioassays wurden auch mit Frischzellmaterial durchgeführt. Dabei handelte es sich um *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC), einem Gemisch aus mononukleären, lymphatischen und wenigen dendritischen Zellen. Ein diese Zellen enthaltendes Gemisch wurde als Buffy Coat vom Blutspendezentrum bezogen. Buffy Coat ist ein Blutprodukt, das aus Vollblutkonserven durch Zentrifugation hergestellt wird. Dabei entstehen 4 Schichten, die durch ihr unterschiedliches Gewicht aufgetrennt werden. Die unterste Schicht enthält die Erythrozyten (= Erythrozytenkonzentrat). Darüber befinden sich die Leukozyten und über diesen die Thrombozyten, die gemeinsam als Buffy Coat separiert werden. Zu oberst wird das zellfreie Plasma als Frischplasmapräparat abgenommen. PBMCs konnten mit Hilfe eines Histopaque®-Gradienten aus Buffy Coat aufgereinigt werden. Hierfür wurden 15 ml Histopaque® vorgelegt und ein Gemisch aus 10 ml Buffy Coat mit 20 ml PBS und 2 mM EDTA vorsichtig darüber geschichtet. Der Gradient wurde anschließend für 20 min bei RT und 1500 rpm mit deaktivierter Bremsfunktion zentrifugiert. Auf der Grenzschicht beider Phasen befanden sich nun die PBMCs, welche als weiße Schicht zu erkennen war. Nach entfernen der oberen Schicht wurden die PBMCs abpipettiert und in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden 3 x mit PBS und 5 mM EDTA gewaschen und konnten anschließend in Medium aufgenommen, und die Zellzahl ermittelt werden.

Weil es sich bei dem Gemisch um Suspensions- und adhärente Zellen handelt, sind PBMCs schwierig zu passagieren, ohne Zellen einer Population dabei zu schädigen oder zu verlieren. Deshalb wurden die Zellen direkt in Versuche eingesetzt. Für Bioassays wurden die Zellen in RPMI 1640 mit 10 % FCS und 2 mM L-Glutamin aufgenommen und bei 37°C mit 5 % CO₂ kultiviert.

2.5.5 Einfrieren von Zellen

Um Zellen über längere Zeiträume verfügbar zu machen und aufzubewahren, wurden Zellen aus der laufenden Zellkultur eingefroren. Zuerst wurde eine Zellsuspension mit der gewünschten Gesamtzellzahl in Medium hergestellt. Die Zellen wurden für 10 min bei 4°C mit 1500 rpm abzentrifugiert und das Medium verworfen. Das Pellet wurde dann mit der entsprechenden Menge kaltem FCS, welches 10 % DMSO enthielt, resuspendiert um die gewünschte Zellkonzentration zum Einfrieren zu erhalten (~5 x 10⁶/ml). Die Suspension wurde anschließend in beschriftete Kryo-Röhrchen a´ 1 ml verteilt, und die befüllten Aliquots in einen Behälter mit einem Isopropanol-Tank gestellt. Dieser Behälter wurde für 3

Tage bei -80°C stehen gelassen. Diese Prozedur soll verhindern, dass die Zellen durch zu rasches Einfrieren platzen, da das Isopropanol den Vorgang des Einfrierens verlangsamt ($\sim 1^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Dadurch wird eine schädliche Kristallbildung im Zytoplasma verhindert. Nun konnten die Zellen in flüssigem Stickstoff umgelagert werden. Wichtig war an dieser Stelle, ein Aliquot wieder aufzutauen und die Zellen erneut zu kultivieren, um die sterile Arbeitsweise zu überprüfen und sicher zu stellen, dass die Zellen das Einfrieren gut überstanden haben.

2.5.6 Auftauen von Zellen

Um Zellen wieder in Kultur zu bringen, wurde ein Kryo-Röhrchen mit den zu kultivierenden Zellen in ein Wasserbad bei 37°C gehalten bis der Inhalt aufgetaut war. Danach wurde die Zellsuspension in 10 ml steriles PBS überführt, um die Zellen zu waschen und das für physiologisch voll aktive Zellen gefährliche Frostschutzmittel DMSO zu entfernen. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1500 rpm wurde das Zell- Pellet in 20 ml frischem Medium aufgenommen und je nach Zelltyp kultiviert.

2.6 Bioassay und ELISA

Um unter den verschiedenen Zelllinien jene zu identifizieren, die nach einem Stimulus eine bestimmte Signalkaskade einleiten, wurden *enzyme-linked-immuno-sorbent-assays* (ELISAs) durchgeführt. Die Reaktion der Zellen kann anhand der produzierten und ausgeschiedenen Zytokine festgestellt werden, die sich im Zellüberstand befinden. Dieser wurde abgenommen und in ELISAs eingesetzt. Dabei wurden mit spezifischen Antikörpern Zytokine nachgewiesen, die Hinweise auf einen benutzten Signalweg geben. Zum einen wurden IL-10 ELISAs durchgeführt, um Zellen zu identifizieren, die den klassischen STAT3-Weg nach IL-6 Stimulus benutzen. Bei der Verwendung von anderen Stimuli sollten Zelllinien erkannt werden, bei denen es zu Überschneidungen von Signalwegen kommt. IL-8 ELISAs wurden zur Kontrolle mit denselben Zellüberständen durchgeführt, um das Reaktionsvermögen der Zellen zu kontrollieren, da auf die verabreichten pro-inflammatorischen Stimuli fast immer IL-8 produziert wird. Des Weiteren sollte auch eine Zelllinie gefunden werden, die nach IL-1 β Stimulation eine starke IL-8 Antwort zeigt, um mit dieser den CHIP Assay am NF- κ B-Weg zu etablieren.

Hierfür wurden 10^4 Zellen/well in 100 μl des entsprechenden Mediums in einer 96 well Mikrotiterplatte ausgesät und verschiedene Stimuli in ebenfalls 100 μl dazugegeben. Die

Zellen wurden über Nacht kultiviert und der Überstand nach Anzentrifugieren (5 min bei 1500 rpm) der Platte abgenommen. Für IL-8 Untersuchungen wurde der Zellüberstand 1:50 verdünnt; in IL-10 Versuchen wurde der Zellüberstand unverdünnt eingesetzt.

2.7 Proteinchemische Methoden

2.7.1 Zytosol-Kern-Trennung in A549

Für Westernblotanalysen in A549 wurden 4×10^6 Zellen in einer 57 cm² Petrischale in 10 ml Medium pro Ansatz ausgesät und die Zellen über Nacht kultiviert, um diese erneut adhären zu lassen. Am Folgetag wurden die Zellen bei Bedarf stimuliert und nach einer entsprechenden Inkubationszeit zweimal mit eiskaltem, unsterilem PBS gewaschen. Alle Folgeschritte erfolgten bei 4°C auf Eis oder im Kühlraum. Nun wurden 400 µl des Cao-Lysepuffers mit Zusätzen auf den Zellrasen gegeben, die Zellen mit einem Gummischaber von der Platte gelöst und in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Das Lysat wurde für 30 min bei 4°C rotiert und anschließend 10 min bei 500 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und als zytosolische Fraktion aufbewahrt. Das Pellet wurde in 800 µl Cao-LP ohne Zusätze resuspendiert und erneut wie oben abzentrifugiert. Der Waschschrift wurde wiederholt und das Pellet in 200 µl Kochsalzpuffer (KE-Puffer) mit Zusätzen aufgenommen und anschließend mit dem Sonicator homogenisiert (30 s, 5 % Puls = 1 x 0,5 s bei 10 % Energie). Um die Kernfraktion zu erhalten, wurde nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 14000 x rpm der Überstand abgenommen.

200 mL	10× Cao-Stammlösung	1×	
23,83 g	HEPES (freie Säure)	50	mM
29,22 g	NaCl	250	mM
8,64 g	β-Glycerophosphat	20	mM
3,72 g	Na ₂ -4-Nitrophenylphosphat · 6 H ₂ O	5	mM
744 mg	Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	1	mM
	pH 7,9 einstellen, bei 4 °C dunkel lagern		

200 ml		1× Cao-Lysepuffer	1×	
20	ml	10× Cao-Stammlösung	1×	
40	ml	50 % (w/v) Glycerol	10	%
10	ml	10 % (w/v) IGEPAL = NP-40	0,5	%
bei 4 C dunkel lagern				
~1 ml		1× Cao-Lysepuffer (+Zusätze)	direkt vor Versuchsbeginn ansetzen	
1	ml	1× Cao-Lysepuffer	1×	
40	µl	25× Proteinaseinhibitoren Complete	1×	
10	µl	500 mM DTT	5	mM
10	µL	100 mM NaOrthovanadat	1	mM
50 ml		1X KE-Puffer		
2	ml	0,5 M HEPES pH7,9	20	mM
4	ml	5 M NaCl	400	mM
100	µl	0,5 M EDTA pH 8,0	1	mM
100	µl	0,5 M EGTA pH 7,6	1	mM
~1 mL		1X KE-Puffer (+Zusätze)	direkt vor Versuchsbeginn ansetzen	
2	µL	0,5 M DTT	1	mM
10	µL	100 mM PMSF	1	mM

2.7.2 Zytosol-Kern-Trennung in THP1

Für Westernblotanalysen in THP1 wurden 2×10^7 Zellen pro Ansatz verwendet. Diese wurden bei 1500 rpm abzentrifugiert und mit 10 ml frischen, warmen Medium versetzt. Die Suspensionszellen konnten nun in dem locker verschraubten Falcon-Röhrchen stimuliert werden. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen bei 4°C für 5 min mit 1500 rpm abzentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen, erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach der Zugabe von 1 ml eiskaltes PBS wurde die Suspension in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und bei 4°C für 30 s bei 2000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde jegliches PBS entfernt, die Zellen mit 1,2 ml Brij-

Lysepuffer versetzt und die Ansätze für mindestens 20 min, aber nicht länger als 25 min bei 4°C rotiert, da sonst auch die Kernmembranen lysiert wurden. Nach einer Zentrifugation bei 4°C für 30 s mit 8000 rpm, wurde 1 ml als zytosolische Fraktion abgenommen. Der Rest des Überstandes wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml Brij-Lysepuffer ohne Zusätze durch vorsichtiges Resuspendieren gewaschen und wie zuvor abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, 180 µl KE-Puffer mit Zusätzen zugegeben und anschließend durch Beschallen homogenisiert (30 s, 5 % Puls = 1x 0,5 s bei 10 % Energie). Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 14000 rpm wurde der Überstand abgenommen und als Kernfraktion analysiert.

500 mL		1x 0,3 % Brij-Lysepuffer	1x	
5	mL	5 M NaCL	50	mM
16,6	mL	1,5 M Tris	50	mM
1,5	mL	Brij	0,3	%
		pH von 7,4 vor Zugabe von Brij einstellen		
~1 mL		1x Brij-Lysepuffer (+Zusätze)	direkt	vor Versuchsbeginn ansetzen
40	µL	25x Proteinaseinhibitoren Complete	1x	

2.7.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford wird der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 verwendet. Dabei handelt es sich um einen Farbstoff, der an basische und aromatische Aminosäurereste von Proteinen bindet und in saurer Lösung eine Verschiebung des Absorptionsmaximum von 465 auf 595 nm verursacht. Dies gilt aber nur über einen gewissen Bereich, in dem das Verhältnis von Protein proportional mit der Farbentwicklung korreliert [74].

Sollte die Proteinmenge aus Totallysaten, oder Fraktionen quantifiziert werden, so wurde eine 1:50 bis 1:100 Verdünnung in einem Volumen von 250 (Doppelwerte) oder 350 µl (Dreifachwerte) angefertigt und jeweils 100 µl/well in eine 96 well- Mikrotiterplatte aufgetragen. Parallel zu den Proben wurde ein Proteinstandard mitgeführt, der in Doppelwerten aufgetragen wurde. Als Standardprotein wurde BSA in folgenden Konzentrationen verwendet: 0- Referenzwert (Leerwert), 5, 10, 20, 30, 60 und 80 µg/ml. Anschließend wurden 100 µl der 2:3 verdünnten Bradford Assay Reagenz dazu

pipettiert. Die Optische Dichte der Proben wurde nach wenigstens 5 min, aber spätestens nach einer Stunde Inkubationszeit (für die Farbentwicklung) im ELISA- Reader bei 595 nm ermittelt. Von der optischen Dichte der Standards wurde eine Eichgerade erstellt, mit deren Formel auf die Proteinkonzentration in den untersuchten Proben geschlossen werden konnte. Diese Verfahrensweise wurde benutzt um die Menge an Gesamtprotein in der SDS-PAGE zu standardisieren und letztendlich eindeutige Aussagen über Veränderungen im Proteinhaushalt treffen zu können.

2.7.4 Immunpräzipitation

Sollten Proteine aus Totallysaten oder Fraktionen aufkonzentriert werden, so wurde eine IP durchgeführt. Je nach verwendetem Lysepuffer musste die Probe noch verdünnt oder modifiziert werden.

Zytosolische Proteine im Cao-LP konnten ohne weitere Umpufferung aufkonzentriert werden, indem die Probe, deren Volumen 0,8 - 1,2 ml betrug, mit 0,5 - 1 µg Antikörper gegen das gewünschte Protein versetzt, und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert wurde. Kern-Proben im KE-Puffer mussten vorher verdünnt werden, da die hohe Salzkonzentration von 400 mM NaCl eine Bindung mit dem Antikörper verhindert hätte. Mit einer finalen Konzentration von 150 mM Salz konnte auch hier eine IP ohne Bedenken durchgeführt werden. Am nächsten Tag wurden beads vorbereitet. Da die verwendete Protein G-Sepharose in 20 % Ethanol gelagert wird, wurde das benötigte Gesamtvolumen (10 - 15 µl beads pro Ansatz) 3 x mit PBS mit 0,1% Igepal gewaschen. Dabei war darauf zu achten, dass auch hier möglichst bei 4°C gearbeitet wird und kein Resuspendieren stattfindet, da die beads sehr klebrig sind und sich so in jedem Waschschrift ein ungleichmäßiger Verlust ergeben hätte. Deshalb wurde stets ein Volumen von 1 ml Waschpuffer hart auf die beads pipettiert und für 1 min bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die beads in 1 ml des Puffers in dem sich die Probe befand äquilibriert und in frische Eppendorf-Gefäße verteilt. Die Proben konnten nun direkt auf die beads pipettiert werden. Zwei Stunden wurden die Ansätze rotierend bei 4°C inkubiert. Die beads wurden dann wie oben beschrieben pelletiert und der Überstand für eine andere IP oder eine Kontrolle im Westernblot verwahrt, um feststellen zu können, ob das Protein quantitativ durch den Immunkomplex präzipitiert wurde.

2.7.5 SDS-PAGE von Proteinen

Zur Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht wurden diskontinuierliche Polyacrylamidgele angefertigt, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel, um eine entsprechende Bandenschärfe zu erhalten [75]. Proben von Zell-Lysaten wurden stets 3:1 mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 10 min inkubiert. Wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt, so wurden 10 µl beads mit 30 µl Laemmli aufgearbeitet und wie oben beschrieben behandelt. Anschließend wurden die aufgetragenen Proteine im Gel für ca. 1 - 1,5 h mit einer Spannung von 100-200 V der Größe nach aufgetrennt, da sie durch die SDS-Maskierung negativ geladen sind und so zum Plus-Pol wandern. Bei der Fokussierung wurde immer ein vorgefärbter Standardproteinmix mitgeführt, um sich nach einem Westernblot-Transfer und einer Immun-Färbung an den Größenstandards zu orientieren und das gefärbte Protein anhand seiner Größe wieder zu identifizieren.

Trenngel			7,5 %		10 %		12,5 %	
Reagenz	[c]		Volumenanteile					
H ₂ O	-		40	%	31,7	%	23,3	%
Tris-HCl pH 8,8	1,5	M	25	%	25	%	25	%
SDS	1	%	10	%	10	%	10	%
AA / Bis-AA	30/0,8	%	25	%	33,3	%	41,7	%
APS / TEMED	40	% / -	0,15	%	0,15	%	0,15	%

Sammelgel			5 %	
Reagenz	[c]		Volumenanteile	
H ₂ O	-		6	%
Tris-HCl pH 6,8	1,5	M	12,5	%
SDS	1	%	10	%
AA / Bis-AA	30/0,8	%	16,5	%
APS / TEMED	40	% / -	0,25	%

5 L		10× Stammlösung	1×	
721	g	Glycin	192	mM
151	g	Tris Base	25	mM

pH ~8,5 nicht einstellen!

5 L		1× PAGE Elektrodenpuffer		
500	mL	10× Stammlösung	1×	
50	mL	10 % SDS	0,1	%
150 ml		3× Laemmli Probenpuffer 1×		
7,9	ml	1 M Tris pH 6,8	17,6	mM
9	g	SDS	2	%
45	g	Glycerol	10	%
22,5	ml	β-Mercaptoethanol	5	%
36	mg	Bromphenolblau	0,008	%
2 ml Aliquots bei -20 °C einfrieren				

2.7.6 Westernblot, Immunfärbung und ECL-Reaktion

Die SDS-Gele mit den fokussierten Proteinen wurden anschließend als Teil eines Sandwichs aus Filterpapier, PVDF-Membran, Gel und Filterpapier in eine semi-dry Blot-Apparatur gelegt und die Proteine bei einer Spannung von 1 mA/cm² für zwei Stunden auf eine PVDF-Membran geblottet. Hierbei war darauf zu achten, dass sich in dem Sandwich keine Luftblasen befanden und alles ausreichend mit Blotpuffer benetzt war. Anhand des vorgefärbten Proteinstandards konnte überprüft werden, ob die Proteine gut auf die Membran übertragen wurden. Diese wurden anschließend für eine Stunde mit 5 % Milchpulver (MP) in TBS/T abgesättigt, bzw. geblockt und 3 x 10 min in TBS/T gewaschen. Über Nacht wurde der Erstantikörper auf die Blots gegeben, so dass diese gerade damit bedeckt waren (10 ml). Nach Entfernen des ersten AKs wurden die Blots 3 x für 10 min mit TBS/T gewaschen und mit dem zweiten AK behandelt. Der Zweitantikörper wurde für 2 Stunden auf den Membranen leicht geschwenkt, anschließend verworfen und die Blots 3 x für 10 min mit TBS/T gewaschen. Mit Hilfe der am zweiten Antikörper assoziierten Peroxidase wurde eine ECL-Lösung (Substrat) umgesetzt. Da bei dieser Reaktion Licht emittiert wird, ist es möglich Proteinbanden zu detektieren, an die der erste Antikörper spezifisch gebunden hat. Hierfür wurden die benetzten Blots in einer lichtdichten Box mit einer Kamera exponiert (INTAS), oder bei schwachen Lichtsignalen ein Röntgenfilm in einer lichtdichten Kassette aufgelegt und später entwickelt.

5 L		10× Stammlösung	1×	
721	g	Glycin	192	mM
151	g	Tris Base	25	mM
		pH ~8,5 nicht einstellen!		
1 L		1× Blotpuffer		
100	mL	10× Stammlösung	1×	
100	mL	Methanol	10	%
1 L		10× TBS	1×	
24,2	g	Tris	20	mM
80	g	NaCl	137	mM
		pH 7,6 mit HCl einstellen		
1 L		1× TBS/T		
100	ml	10× TBS	1×	
1	ml	Tween-20	0,1	%

2.7.7 „Strippen“ von Westernblots

Sollte ein schon gefärbter Blot noch einmal für eine Immunfärbung verwendet werden, so konnten die gebundenen Antikörper und Sättigungsproteine aus dem MP noch einmal entfernt werden. Dafür wurde der Blot für 10 bis höchstens 15 min bei RT in Stripping-Puffer geschwenkt und anschließend 3 x mit TBS/T gewaschen. Die Membran wurde erneut für eine Stunde mit 5 % MP in TBS/T abgesättigt und stand nun für eine neue Färbung zur Verfügung. Die maximale Anzahl der Färbungen sollte dennoch nicht über 3 hinausgehen, da auch Proteine beim strippen geschädigt werden können und so weitere Färbungen nicht aussagekräftig sind.

1 L		Stripping-Puffer		
24,2	g	Glycin	25	mM
80	g	SDS	1	%
		pH 2,0 mit HCl einstellen		

2.8 CHIP Analysen

2.8.1 Aussaat und Crosslink

Zur Etablierung des ChIPs wurden A549 Zellen verwendet und pro Ansatz 10^7 Zellen in 20 ml Medium in einer 14 cm Petrischale ausgesät. Die Zellen wurden einen Tag lang kultiviert und konnten nun stimuliert werden. Hierfür wurde das Medium auf 10 ml eingestellt (auch beim unstimulierten Ansatz). Anschließend wurde der Zellrasen vorsichtig mit PBS gewaschen und 10 ml frisches PBS auf die Platte gegeben. Nun wurden die Zellen in ihrem momentanen physiologischen Zustand „gecrosslinkt“ durch Zugabe von 1 ml Fixierlösung, wobei eine finale Konzentration von 1 % Formaldehyd verabreicht wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von final 0,125 M Glycin gequencht, um das reaktive Formaldehyd abzusättigen. Die Platte wurde so für 5 min bei RT inkubiert und schließlich die Lösung so vollständig wie möglich abgenommen und entsprechend gesammelt bzw. entsorgt. Der Zellrasen wurde nach zwei weiteren Waschschrinen mit PBS mit einem Gummischaber in 5 ml PBS abgelöst und die Zellsuspension in einem Facon bei 4°C und 1500 rpm für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurde 1 ml Lysepuffer (hier wurden verschiedene verwendet) auf das möglichst PBS- freie Pellet gegeben und gut resuspendiert. Je nach Versuch konnte auch eine Zytosol-Kern-Trennung vorgenommen werden, die dem oben aufgeführten Protokoll unter 2.7.1 entspricht.

500 ml		Fixierlösung	
10	mL	5 M NaCl	100 mM
1	mL	0,5 M EDTA	1 mM
5	mL	0,5 M EGTA	5 mM
25	mL	1 M Tris-HCl, pH 8	50 mM
frisch 11% Formaldehyd (in 10 ml: 2,973 ml)			
100 ml		SDS-Lysepuffer	
10	mL	10 % SDS	1 %
2	mL	0,5 M EDTA	10 mM
5	mL	1 M Tris-HCl, pH 8,1	50 mM
1 ml		frisch	
10	µL	100 mM PMSF	1 mM
40	µL	25 x Proteinaseinhibitoren	1 X

2.8.2 Sonifizierung

Für die Sonifizierung ist es absolut notwendig, immer die gleichen Bedingungen zu schaffen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Deshalb wurde stets ein Volumen von 1 ml Lysat oder Kernfraktion von 10^7 Zellen verwendet. Dieses befand sich immer in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß, da jeglicher Kontakt zu Gefäßwandungen mit der Sonicatorspitze zu vermeiden waren. Luftblasen unter der Spitze wurden durch leichtes Anschnipsen des Horns beseitigt, da sonst beim ersten Puls der Ansatz aus dem Gefäß schießt. Die Eintauchtiefe der Sonicatorspitze betrug etwa 5 - 7 mm über dem Boden des Eppendorf-Gefäß'. In dieser Form wurde die Probe in die Halteklammer am Stufenhorn eingespannt und ein Becherglas mit Eis und 70 % Ethanol durch eine Hebebühne so unter der Probe platziert, dass sich der Meniskus des Lysats nur kurz über dem des Kühlwassers befand. Kühlung ist bei einer derart starken Beschallung, wie für DNA-Fragmentierung, absolut notwendig, da hier eine hohe Wärmeproduktion auftritt, was zu einer unkontrollierbaren Erhitzung des Ansatzes und zur Zerstörung von Proteinen bzw. ihren Epitopen (für die Antikörpererkennung) führen kann. Sollte der Sonicator bei mehr als 10 % Gesamtenergie (= minimales Energielevel) betrieben werden, so musste beim ersten Dauerpuls (d.h. Pulse länger als 1 s) die Gesamtenergie vorsichtig in höhere Bereiche moduliert werden. Die so justierten Einstellungen wurden dann beibehalten, oder bei Bedarf nachjustiert. Die Probe wurde im Dauerbetrieb (in der mittleren Anzeige bei '10 x % /s' steht "- ,") für 10 s sonifiziert und mindestens 30 s bis zum nächsten Zyklus gewartet. Bei allen Pulsen sollte immer auf die Probe geachtet werden, da es zu starker Schaumbildung kommen kann. Solche Proben können nicht weiter sonifiziert werden, sondern müssen abzentrifugiert oder auf Eis stengelassen werden.

2.8.3 Immunkomplexbildung und Waschschrte

Nach der Sonifizierung wurden die Proben für 10 min bei 4°C und 10000 rpm abzentrifugiert. Wichtig war hier, dass das Pellet schwarze Bereiche aufwies, was ein Zeichen für eine gute Beschallung ist, da es sich hierbei um Kernmembrantrümmer handelt. Die Probe enthielt nun einen Komplex aus gescherter DNA, Formaldehyd und Protein, der nun durch eine IP aufkonzentriert werden konnte. Je nach verwendetem Lysepuffer musste der Ansatz mit einem Verdünnungspuffer versetzt werden, um hohe Konzentrationen an Detergenz (s. SDS-LP unter 2.8.1) oder Salz (s. KE-Puffer unter 2.7.1)

zu verringern und eine optimale Antikörper-Bindung zu gewährleisten.

An dieser Stelle wurden 5 - 10 % des Volumens als Input-Kontrolle abgenommen und bei -80°C eingefroren, um später die Effizienz der Beschallung beurteilen zu können und um eine Positiv-Kontrolle für die am Ende stehende PCR anzufertigen. Optional konnte an dieser Stelle ein Preclearing mit dem selben Volumen beads, das später in die IP eingesetzt werden sollte, durchgeführt werden. Für eine halbe Stunde wurden, 3 x mit 0,1 % Igepal in PBS gewaschene und äquilibrierte, beads in die Probe gegeben und bei 4°C rotiert. So sollten alle unspezifischen Bindungen an die Sepharose eliminiert werden um den unspezifischen Hintergrund zu minimieren. Die beads wurden nach dem Pelletieren für 1 min bei 1500 rpm und 4°C verworfen und jede Probe in 2 Ansätze aufgeteilt. Einer wurde mit 1 - 2 µg des Antikörpers gegen das Protein im Komplex versetzt („ChIP“), der andere diente als Negativkontrolle („-AK“) um den unspezifischen Hintergrund darzustellen. Beide Ansätze wurden gleich weiterbehandelt und über Nacht bei 4°C rotiert. Am Folgetag wurden erneut 15 µl beads pro Ansatz vorbereitet (gewaschen und äquilibriert) und die Probe darauf pipettiert. 2 Stunden wurde der Ansatz bei 4°C rotierend inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die beads mit verschiedenen Puffern für je 5 min bei 4°C, rotierend gewaschen. Zuerst wurde ein Niedrigsalzpuffer eingesetzt, gefolgt von einem Hochsalzpuffer und einem LiCl-Waschpuffer. Abschließend wurden die Komplexe 2 x mit einem TE- Puffer gewaschen.

200 ml		Niedrigsalz komplex- Wasch-Puffer	Immun-	
2	ml	10 % SDS	0,1	%
2	ml	100 % Triton X- 100	1	%
800	µl	0,5 M EDTA	2	mM
4	ml	1 M Tris- HCl, pH 8,1	20	mM
6	ml	5 M NaCl	150	mM
200 ml		Hochsalz Immunkomplex- Wasch- Puffer		
2	ml	10 % SDS	0,1	%
2	ml	100 % Triton X- 100	1	%
800	µl	0,5 M EDTA	2	mM
4	ml	1 M Tris- HCl, pH 8,1	20	mM
20	ml	5 M NaCl	500	mM

200 ml		LiCl	Immunkomplex- Wasch- Puffer		
50	ml	1 M LiCl		250	mM
2	ml	100 % IGEPAL- CA630		1	%
2	g	Deoxycholinsäure		1	%
400	µl	0,5 M EDTA		1	mM
2	ml	1 M Tris- HCl, pH 8,1		10	mM
200 ml		TE-Puffer			
2	ml	1 M Tris- HCl		10	mM
400	µl	0,5 M EDTA , pH 8		1	mM

2.8.4 Gewinnung des DNA-Präzipitats

Der nun gewaschene Immunkomplex aus DNA, Crosslink, Protein und AK konnte nun vom bead eluiert werden. Hierfür wurde der Elutionspuffer immer frisch angesetzt. 250 µl wurden davon auf die Sepharose gegeben und die Ansätze bei RT für 20 min bei 1400 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die beads bei 1000 rpm für 1 min pelletiert und der Überstand in einem frischen Eppendorf-Gefäß gesammelt. Der Elutionsschritt wurde wiederholt und beide Überstände vereinigt. Die Input-Proben wurden ebenfalls auf 500 µl mit Elutions-Puffer aufgefüllt. Diese mussten ab hier wieder mitverarbeitet werden.

Um die DNA aus dem quervernetzten Komplex herauszulösen, wurden 12 µl einer 5 M NaCl Lösung (final 0,2 M) zugegeben und die Proben bei 65°C für mindestens 4 h inkubiert. Des weitern wurden 20 µl 0,5 M EDTA und 40 µl 1 M Tris-HCl, pH 6,5 zugegeben, gefolgt von einer Behandlung mit RNaseA für eine halbe Stunde bei 37°C. Im Anschluss daran wurden die Ansätze einem Verdau mit Proteinase K bei 45°C über Nacht unterzogen. Aus den Proben wurde die DNA mit Hilfe eines Nucleo Spin Extract II Kits gemäß der Anleitung extrahiert und in ein Volumen von 20- 30 µl eluiert.

5 ml		Elutions-Puffer			
1	ml	0,5 M NaHCO ₃		100	mM
500	µl	10 % SDS		1	%

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Bei der photometrischen DNA-Quantifizierung wurde eine 1:50 bis 1: 100 Verdünnung der Probe in Wasser mit einem Endvolumen von 150 µl hergestellt, die anschließend in einer Quarzküvette bei drei verschiedenen Wellenlängen im Photometer vermessen wurde: bei 260 nm, bei welcher DNA und RNA das Absorptionsmaximum erreicht; bei 280 nm, um festzustellen ob es Verunreinigungen durch Proteine gibt, welche hier ein Absorptionsmaximum aufweisen und bei 320 nm, um weitere Verunreinigungen festzustellen. Die Optische Dichte ($OD = \lambda \times \epsilon \times D$) von 320 nm wurde jeweils von den übrigen OD-Werten abgezogen. Da bei $\lambda = 260$ nm, 1 OD einer Menge von 50µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht, kann man leicht unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ermitteln, welche DNA-Menge in der Probe vorhanden ist. Zusätzlich kann man aus dem Quotienten aus OD 260/OD 280 Aussagen über die Reinheit der DNA in der Probe treffen. Wird dieser Wert $< 1,8$, so liegen Verunreinigungen durch Proteine vor.

2.9.2 DNA-Amplifikation durch PCR

Am Ende eines jeden ChIP-Experimentes wurde eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt, um die sehr geringe Menge präzipitierter DNA-Fragmente auf das Vorhandensein der vollständigen, spezifischen Bindestelle für das Protein zu prüfen und diese Sequenz zu amplifizieren. Die aufgereinigte DNA dient hier als *template*, oder Vorlage. Zur Kontrolle wird auch jeweils die totale DNA („Input“) eingesetzt, um festzustellen, ob der Ansatz das gewünschte Stück vor der IP besessen hat. Darüber hinaus wurde alle 10 PCR-Ansätze eine Negativkontrolle beigefügt, die statt des templates nur Wasser enthielt. Die Bedingungen wurden für die einzelnen PCRs optimiert (Tab. 7).

Tab. 7: Optimierte Protokolle zur Amplifikation des IL-8 Promotors und des β -Aktin Gens

PCR Verfahren	Humaner IL-8 Promotor	Humanes β -Aktin
Aufschmelzen	2 min bei 95°C im ersten Zyklus, dann immer 60 s	
Anlagern der Primer	35 s bei 61°	30 s bei 56°C
Taq Pol aktiv	20 s bei 72°C	60 s bei 72°C
Taq Pol aktiv	Am Ende 4 min bei 72°C	
Zyklenzahl	35	

Bei allen PCRs handelte es sich um Ansätze mit einem finalen Volumen von 30 μ l. Dabei wurden zu 25 μ l Mastermix (Tab. 8) 5 μ l Probe pipettiert (Tab. 9).

Tab. 8: Mastermix für PCR

1 x Mastermix	10 x	Final
3 μ l 10 x Taq - Puffer	30 μ l	1 x
0,6 μ l d NTP's (je 10 mM)	6 μ l	200 μ M
MgCl ₂ (25 mM)	18 μ l	1,5 mM
0,2 μ l Taq (5 U/ml)	2 μ l	1 U
3 μ l sense Primer (10 μ M)	30 μ l	1 μ M
3 μ l antisense Primer (10 μ M)	30 μ l	1 μ M
H ₂ O	134 μ l	
Gesamt	250 μ l	25 μ l

Tab. 9: Templates für PCR

Ansatz	Template	Master Mix	Wasser
ChIP, -AK	5 μ l	25 μ l	-
Input	1 μ l		4 μ l
Wasser	-		5 μ l

2.9.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Um DNA Fragmente verschiedener Größen aufzutrennen, wurden Agarosegele angefertigt, die 1 - 2,5 % Agarose in TAE enthielten. Das Gemisch wurde so lange abwechselnd erhitzt und gerührt, bis die Lösung klar wurde und etwas abgekühlt war. Nach dem Gießen und vollständigen Erkalten des Gels wurde dieses (im Gelträger) in einer horizontalen Kammer mit TAE platziert und die Proben aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 150 V und

eine Stromstärke von 100 mA angelegt, wobei die DNA-Fragmente der Proben nur so lange aufgetrennt wurden, bis sich die Laufmittelfront in der Mitte der Kammer befand. Durch das negativ geladene Phosphat-Rückgrat wandert die DNA zur Anode und braucht im Gegensatz zu Proteinen nicht maskiert zu werden. Dennoch wurden die Ansätze mit einem 10 x Ladepuffer versetzt, um die Proben für das Auftragen zu beschweren und um farblich erkennen zu können, wie weit die kleinsten Fragmente schon gewandert sind. Die Laufgeschwindigkeit der hängt dabei von der Größe und der Form der DNA ab. Des Weiteren ist die Porengröße des Gels entscheidend für die Auftrennung. Je geringer der Agarose-Gehalt, umso größer sind die Poren und umso besser werden große Fragmente aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in ein Ethidiumbromid-Bad gelegt und 20 min gefärbt. Nachdem das Gel kurz in Wasser geschwenkt wurde, konnte es unter einer UV-Lichtquelle betrachtet und dokumentiert werden. Um die einzelnen DNA-Banden erkennen zu können, macht man es sich zu Nutze, dass sich die physikalischen Eigenschaften von Stoffen ändern, wenn sie in unpolare Umgebung gelangen. Ethidiumbromidkationen können in GC-reichen DNA-Doppelsträngen interkalieren und verlieren dadurch ihre polare Umgebung. Das führt dazu, dass nach einer Anregung (Excitation) im UV Bereich, $\lambda = 252$ nm, die Emission in den längerwelligen, energieärmeren Bereich bei 605 nm verschoben wird.

150 ml		10 x DNA-Lade-Puffer		
7,5	ml	1 M Tris- HCl, pH 8,0	50	mM
3,75	ml	1 % Bromphenolblau	0,025	%
75	ml	100 % Glycerol	50	%
500 ml		1 x TAE		
20	ml	1 M Tris- HCl, pH 8,0	40	mM
1	ml	0,5 M EDTA	1	mM
10	ml	1 M Eisessig	20	mM
500 ml		EtBr-Färbelösung		
0,5	g	Ethidiumbromid	1	mg/ml
500	ml	TAE	1x	

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der CHIP-Technik

Um die CHIP-Technik zu entwickeln, sollte vorerst an einem bekannten Signaltransduktionsweg gearbeitet werden. Hierfür wurde der IL-1 Signalweg ausgewählt. Die Chromatin-Immünpräzipitation sollte dabei auf die, durch IL-1 induzierbare, Aktivierung von NF- κ B als Transkriptionsfaktor [24] fokussiert werden, die sich letztlich in der Produktion von IL-8 äußert. Nach der Optimierung der einzelnen Arbeitsschritte sollte das Protokoll getestet werden, indem die, durch den CHIP extrahierten, DNA-Fragmente mittels PCR auf das Vorhandensein der IL-8 Promotorsequenz überprüft, und mit einem unstimulierten Ansatz verglichen werden sollten.

3.1.1 Auswahl geeigneter humaner Zelllinien

Um geeignete Zelllinien für die Methodische Aufgabenstellung, als auch für spätere Crosstalk-Analysen zu identifizieren, wurden mit allen unter 2.3.3 aufgeführten Zellen verschiedene Bioassays durchgeführt und Proben der Zellüberstände hier in einen IL-8 ELISA (Abb. 5) eingesetzt. Zum einen sollte dabei überprüft werden, ob die Zellen gut stimuliert wurden; und zum anderen, um eine Zelllinie für weitere Versuche zu identifizieren, die nach IL-1 β Stimulation mit einer starken IL-8 Ausschüttung reagiert.

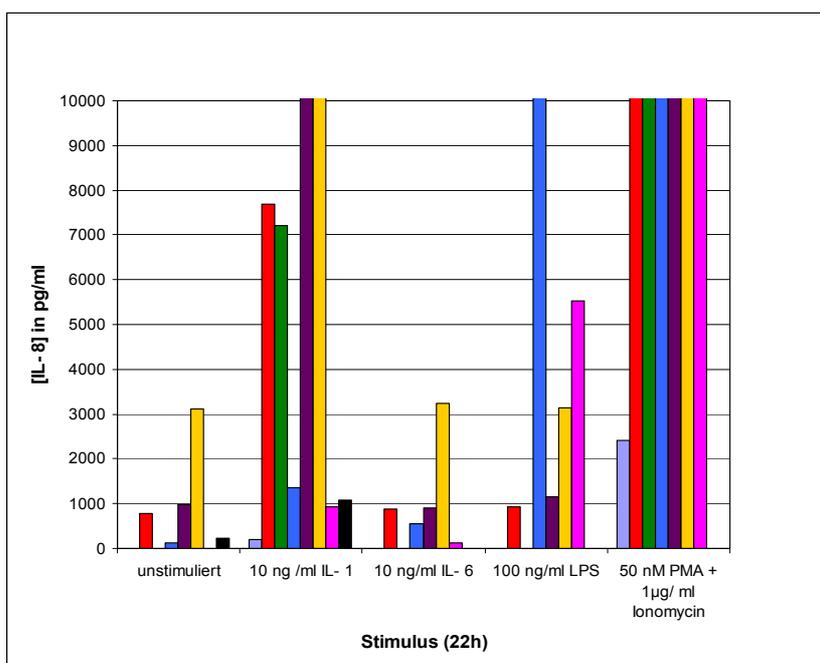
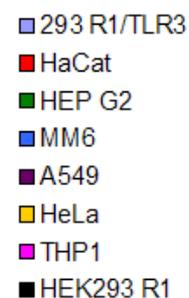


Abb. 5: IL-8 ELISA mit Überständen verschiedener Zelllinien: 10^4 Zellen pro well für 22 h stimuliert. Datenpunkt pro Ansatz aus Doppelwerten. Darstellung ohne Verdünnungsfaktor.



Alle Zellen zeigen nach IL-1 β -, und besonders nach PMA/Ionomycin Stimulation eine IL-8 Antwort. Anders verhält es sich nach einer Behandlung mit IL-6. Gegenüber den unstimulierten Ansätzen sind hier nur geringfügige Schwankungen sichtbar.

Nach einer Inkubation mit LPS reagieren MonoMac6 am stärksten, gefolgt von THP1 Zellen. Alle übrigen Zellen zeigten nach der LPS Stimulation eine ähnliche IL-8 Produktion, wie die unbehandelten Zellen.

Dieser Versuch zeigt, dass alle untersuchten Zelllinien durchaus gut stimuliert waren. Dabei richtet sich die Antwort nach dem zellspezifisch vorhandenen Rezeptorspektrum, was das unterschiedliche Vermögen auf eine Antwort, hier IL-8 zu produzieren, beeinflusst.

Für die Etablierung eines ChIP-Assays am IL-1 Weg wurden anhand von Abb. 5 A549 Zellen ausgewählt. Nach einer Stimulation mit rhIL-1 β reagierten diese am deutlichsten mit einer starken IL-8 Antwort gegenüber den unstimulierten Zellen.

3.1.2 Erstellen eines Protokolls für reine Zytosol-Kern-Trennungen in A549

Um Aussagen über die Translokation eines Proteins machen zu können, das durch bestimmte Einflüsse in den Kern wandert, ist es notwendig, reine Fraktionen von Zytosol- und Kern-Kompartimenten anzufertigen, die nicht kreuzkontaminiert sind (Abb. 6). Zur Etablierung des Protokolls wurden jeweils 4 Ansätze mit 4×10^6 Zellen angefertigt und die Trennung optimiert. Die Proben wurden mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, geblottet und die Membran gegen Proteine gefärbt, die in den Zell-Kompartimenten spezifisch vorkommen.

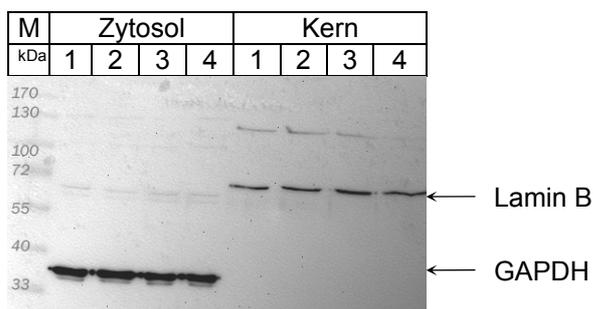


Abb. 6: Kontrollblot mit 10 μ g Gesamtprotein in jeder Spur, Erst-Antikörper rabbit- α -GAPDH 1:400 und goat- α -Lamin B 1:400 über Nacht inkubiert; Zweit-Antikörper goat- α -rabbit und mouse- α -goat 1:10000 für 2h inkubiert; nach ECL Reaktion 60 min im INTAS exponiert.

Im Kontrollblot kann man in den Zytosol-Fractionen das Protein GAPDH bei 35 kDa gut erkennen. Lamin B ist bei etwa 65 kDa in den Kernfraktionen vertreten. Beide Proteine sind ausschließlich nur in den Fraktionen zu finden, in denen sie funktionell angesiedelt sind.

Wichtig ist an dieser Stelle im Trennungsprotokoll, dass das Kern-Pellet zweimal gewaschen wird, um restliche zytosolische Proteine aus der KF zu entfernen.

3.1.3 Überprüfen der Translokation von p65/Rel-A in den Kern nach verschiedenen langer IL-1 β Simulation

In diesem Versuch sollte nach einer Stimulation mit rekombinanten humanem IL-1 β das Abwandern von NF- κ B in den Kern gezeigt werden. Dabei war es entscheidend, den optimalen Zeitpunkt der Translokation zu bestimmen, um in späteren ChIP-Analysen den Proteinkomplex dann zu „crosslinken“, wenn dieser tatsächlich im Kern an der DNA bindet und eine Antwort auf den Stimulus zunächst auf transkriptioneller Ebene einleitet. Es wurden 4 Ansätze vorbereitet, die unterschiedlich lange (0, 10, 15 und 20 min) mit 10 ng/ml rhIL-1 β inkubiert wurden. Untersucht wurden sowohl die ZF als auch die KF auf das Vorhandensein von p65.

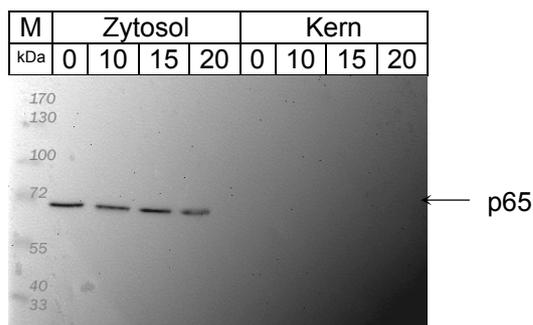


Abb. 7: Blot mit 20 μ g Gesamtprotein in jeder Spur, Erst-Antikörper goat- α -p65 1:500 über Nacht inkubiert; Zweit-Antikörper mouse- α -goat 1:10000 für 2h inkubiert; nach ECL Zugabe 60 min im INTAS exponiert.

In allen zytosolischen Fraktionen kann man die große Untereinheit p65 finden. Diese liegt im unstimulierten Zustand dort konstitutiv in einem Komplex mit einem weiteren Mitglied der Rel-Familie sowie einem Inhibitor I- κ B vor, welcher die NLS maskiert. Nach Aktivierung sollte eine Kern-Translokation innerhalb des gemessenen Zeitrahmens stattfinden. In diesem Versuch wurde das Kern-Pellet erneut in Cao-LP aufgenommen. Unter diesen Pufferbedingungen ist allerdings die Bindung des Transkriptionsfaktor-Komplexes an die DNA noch so stark, dass das Protein nicht gelöst vorliegt und sich deshalb nach dem letzten Zentrifugationsschritt zusammen mit der DNA im Pellet befindet und nicht in der Kernfraktion. Dementsprechend wurde ein neuer Versuch geplant, in dem das Kern-Pellet mit einem Hochsalzpuffer (KE-Puffer) versetzt wurde, um auch DNA- gebundene Proteine in der Fraktion zu lösen und nachweisen zu können. Da aber auch hier im WB keine Signale detektierbar waren, musste eine IP mit den Kern-Proben angefertigt werden, um das Protein so aufzukonzentrieren, dass es im WB nachgewiesen werden kann (Abb. 8).

Die Ansätze wurden auf 150 mM Salz umgepuffert und mit 0,5 µg des goat- α -p65 (sc-372) AKs pro Ansatz eine IP durchgeführt.

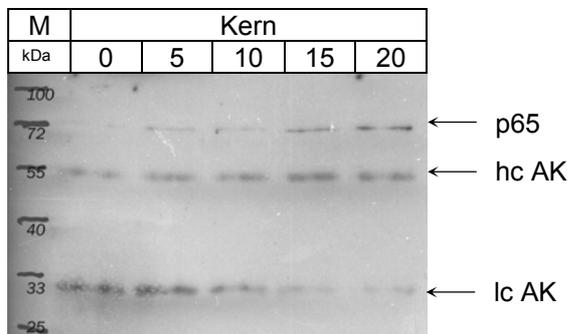


Abb. 8: Blot mit 30 µl aus IP (= gesamte Probe) in jeder Spur, Erst-Antikörper goat- α -p65 1:500 über Nacht inkubiert; Zweit-Antikörper mouse- α -goat 1:10000 für 2h inkubiert; nach ECL Zugabe über Nacht auf Röntgenfilm exponiert. Dieser wurde entwickelt und eingescannt.

Durch die IP befindet sich nun auch der AK mit in der Probe und kann als Maß für die Pipettiergenauigkeit dienen, da in jeder Probe mit der gleichen Menge des AKs präzipitiert werden sollte. Dieser zerfällt durch die Behandlung mit denaturierendem Puffer [75] und Wärme. So findet man im WB eine schwere Kette des AK bei ca. 55 kDa und die leichten Ketten bei etwa 25 - 30 kDa. Darüber hinaus konnte auch p65 angereichert werden, wobei das Protein mit zunehmender Stimulationsdauer umso präsenter im Kern war. Das stärkste Signal findet man nach 20 min Stimulation. Um die Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Translokation zu untermauern, wurden die zytosolischen Fraktionen aus diesem Experiment eingesetzt, um das Schicksal des im Zytoplasma lokalisierten Inhibitors nach der Stimulation zu verfolgen. I- κ B α wird in der aktivierten IL-1 Kaskade durch IKK β phosphoryliert (Abb. 9) und schließlich nach einer Poly-Ubiquitinylierung abgebaut. Mit Hilfe eines pI- κ B Antikörpers, der als Epitop ausschließlich die phosphorylierten Reste Ser32/36 des Inhibitorproteins erkennt, kann man den Beginn des Abbauprozesses verfolgen.

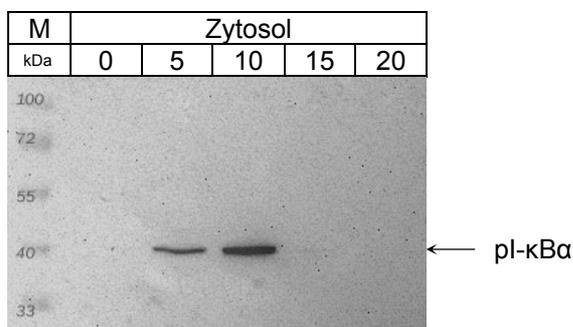


Abb. 9: Blot mit 40 µg Gesamtprotein in jeder Spur, Erst-Antikörper mouse- α -pI- κ B α 1:2000 über Nacht inkubiert; Zweit-Antikörper goat- α -mouse 1:10000 für 2h inkubiert; nach ECL Reaktion 90 min im INTAS exponiert

Schon nach 5 min Stimulation wird der Inhibitor phosphoryliert und kann bei 40 kDa nachgewiesen werden. Die Reaktion steigert sich und das modifizierte I- κ B α reichert sich

bis zum Zeitpunkt von 10 min an. Danach ist I- κ B α , abgesehen von einem sehr schwachen Bande bei 15 min, nicht mehr zu detektieren. Der Blot wurde „gestrippt“ und erneut gegen unmodifiziertes I- κ B α gefärbt (Abb. 10), um festzustellen, ob dieses quantitativ nach einem Stimulus phosphoryliert wird und ob es schon nach 20 min wieder neu synthetisiert vorliegt.

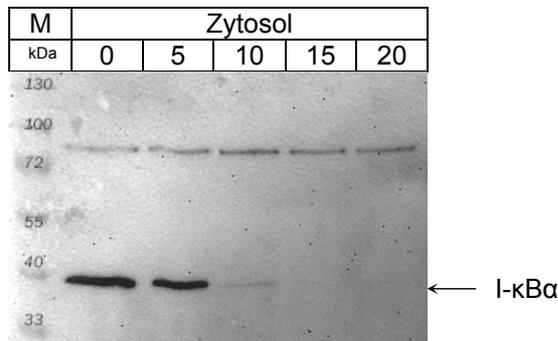


Abb. 10: gestrippter Blot mit 40 μ g Gesamtprotein in jeder Spur, Erst-Antikörper rabbit- α -I- κ B α 1:1000 über Nacht inkubiert; Zweit-Antikörper goat- α -rabbit 1:10000 für 2h inkubiert; nach ECL Reaktion 90 min im INTAS exponiert

Mit der Färbung gegen das ruhende I- κ B α konnte gezeigt werden, dass der gesamte Pool an unmodifiziertem I- κ B α , welches bei 37 kDa zu finden ist, nach 15 min komplett modifiziert wurde und bis zum Zeitpunkt von 20 min nicht wieder neu synthetisiert wird. Der Inhibitor ist demnach im Zytosol nicht verfügbar und die Translokation des Rel-A:NF- κ B1-Komplexes kann stattfinden. Um zu zeigen, dass dies der beste Zeitpunkt nach der Stimulation für den Crosslink ist, wurden noch einmal zytosolische Proben im WB analysiert, die bis zu einer Stunde alle 10 min stimuliert wurden (Abb. 11). Die Immunfärbung gegen pI- κ B α sollte Aufschluss geben, wann der Inhibitor nicht mehr modifiziert wird und die primäre Antwort abgeschlossen ist.

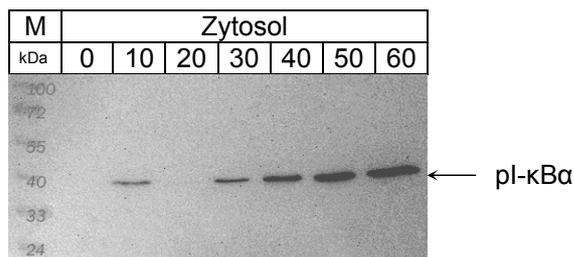


Abb. 11: Blot mit 40 μ g Gesamtprotein in jeder Spur, Erst-Antikörper mouse- α -p-I- κ B α 1:2000 über Nacht inkubiert; Zweit-Antikörper goat- α -mouse 1:10000 für 2h inkubiert; nach ECL Reaktion 60 min im INTAS exponiert

Wie in Abb. 9, findet man auch hier nach 20 min kein pI- κ B α (40 kDa) mehr in der ZF vor. Im weitem zeitlichen Verlauf der Stimulation reichert sich immer mehr phosphoryliertes I- κ B α im Zytosol an. Betrachtet man nur unphosphoryliertes I- κ B α (Abb.12), sollte dies Aufschluss darüber geben, wann der Inhibitor neu synthetisiert wird und die Kern-Translokation des Transkriptionsfaktors beendet wird.

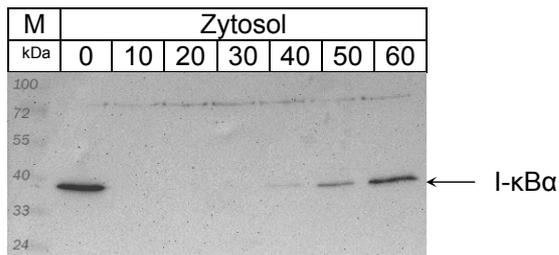


Abb. 12: gestrippter Blot mit 40 µg Gesamtprotein in jeder Spur, Erst-Antikörper rabbit- α -I- κ B α 1:1000 über Nacht inkubiert; Zweit-Antikörper goat- α -rabbit 1:10000 für 2h inkubiert; nach ECL Reaktion 90 min im INTAS exponiert

Die Färbung gegen das ruhende I- κ B α (37 kDa) zeigt, dass der Pool an unmodifiziertem I- κ B α in dem Zeitrahmen von 10 bis 30 min drastisch abnimmt. Erst nach 40 min wird neu synthetisiertes Protein wieder verfügbar, das an den Komplex aus p50 und p65 binden kann und das Heterodimer wieder im Zytosol „fixiert“. Dementsprechend wurde in den folgenden CHIP-Experimenten nach einer Stimulationsdauer von 15 - 20 min quervernetzt.

3.1.4 Überprüfen der Stabilität des Immunkomplexes während der CHIP-Waschschritte

Um zu testen, ob der Immunkomplex aus Protein und Antikörper den Waschschritten des CHIP-Protokolls standhält, wurden Proben für einen WB aufbereitet (Abb. 13). Hierfür wurden zwei zytosolische Fraktionen aus quervernetzten Proben vereinigt und wieder aufgeteilt. Dementsprechend lagen nun 2 Ansätze vor, die je mit 1 µg goat- α -p65 (sc-372) Antikörper versetzt, und über Nacht rotierend bei 4°C inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden beads vorbereitet, wobei ein Ansatz mit 50 µl Protein A-Agarose und ein Ansatz mit 50 µl Protein G-Sepharose versetzt wurde, da gegensätzliche Aussagen über die Präzipitierbarkeit von Antikörpern aus Ziege gefunden wurden [76, 77]. Nach 2 Stunden bei 4°C wurden je 2 x 200 µl aus jedem Ansatz entnommen. Nr. 1 sollte als IP-Kontrolle (= IP) dienen, Nr. 2 wurde noch 4 x mit Cao-LP gewaschen und diente als Waschkontrolle (= Wk) um den generellen Verlust von beads und damit Immunkomplex bei den Waschschritten abzuschätzen. Anschließend wurden die restlichen 30 µl beads 2 x für 5 min bei 4°C mit 600 µl Niedrigsalzpuffer gewaschen, wieder 200 µl entnommen (= NS) und verwahrt. Danach folgte ein Waschschritt mit 400 µl Hochsalzpuffer, nach dem 200 µl (= HS) vor dem Abzentrifugieren entnommen wurden. Die restlichen beads wurden mit 200 µl LiCl-Puffer versetzt und inkubiert (= Li). Schließlich wurden alle 5 Proben noch einmal mit 1 ml TE-Puffer gewaschen und die jeweils 10 µl beads für den Probenauftrag im Gel vorbereitet.

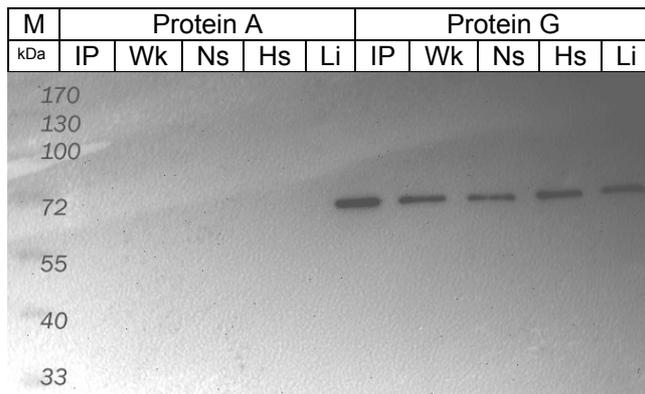


Abb. 13: Blot mit 25 μ l Probe in jeder Spur, Erst-Antikörper goat- α -p65 1:500 über Nacht inkubiert; Zweit-Antikörper mouse- α -goat 1:10000 für 2h inkubiert; nach ECL Zugabe 10 min im INTAS exponiert.

Um p65 mit dem Antikörper sc-372 präzipitieren zu können, eignet sich nur Protein G Sepharose. Der gebildete Immunkomplex aus p65, AK und Protein G, das am bead assoziiert ist, hält den verschiedenen Waschpuffern, die später im ChIP verwendet werden sollen, stand.

3.1.5 Erstellen eines reproduzierbaren Sonifizierungs-Protokolls

Um eine hohe Spezifität im ChIP zu erreichen, ist es notwendig die genomische DNA in Fragmente zu zerkleinern, die möglichst nur 200 - 1000 bp lang sind. Dies soll gewährleisten, dass im ChIP nur DNA Fragmente angereichert werden, die eine einzige Bindestelle für das fragliche Protein enthalten. Dies soll sicherstellen, dass nur relevante Sequenzen präzipitiert werden und in späteren PCR-Analysen die Produkte auch nur von einem Genlocus stammen.

3.1.5.1 Optimierung der benötigten Gesamtenergie und Zyklenzahl

Die Fragmentierung wurde mit Hilfe eines Bandelin-Sonicators (2.2) durchgeführt. Zunächst wurden wie unter 2.8.1 beschrieben A549 Zellen vorbereitet und für 1 min quervernetzt. Nach dem Abstoppen und Waschen der Zellen, wurde eine Zytosol-Kern-Trennung durchgeführt und die Kerne in 1 ml Cao-Lysepuffer aufgenommen. Anschließend wurde bei variabler Zyklenzahl und Gesamtenergie mit den verschiedenen Ansätzen getestet, wie gut sich die DNA fragmentieren lässt. Zunächst wurde die Zyklenzahl bei konstanter Energie (anfangs 10 %) erhöht, wobei die maximale Anzahl der Pulse nicht mehr als 30 betragen sollte. Unter diesen Bedingungen verblieben (nach Entfernen der Quervernetzung, Verdau mit RNaseA / Proteinase K und DNA-Aufreinigung) bei der Analyse der Proben die DNA-Fragmente in der Tasche des Gels. Die Gesamtenergie

wurde darauf auf 20 % erhöht und nochmals die Zyklenzahl variiert. Auch hier waren die Fragmente noch immer zu groß, um in das Gel einzuwandern. Schließlich wurden verschiedene Zyklenzahlen bei 30 % der Gesamtenergie getestet, wobei nun eine Fragmentierung zu beobachten war (Abb. 14).

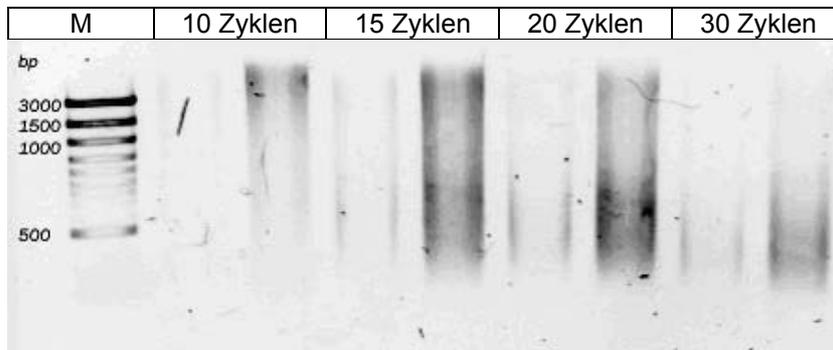


Abb. 14: 1,5% iges Agarosegel mit 4 verschieden sonifizierten Ansätzen mit je 2 aufgetragenen Mengen (5 und 15 μ l), die Proben wurden für 1 min mit 1% Formaldehyd fixiert und 30 Zyklen bei 30% Energie sonifiziert

Die Sonifizierung mit 30 Zyklen bei 30 % der Gesamtenergie zeigt das beste Fragmentierungsergebnis. Bei Beschallungs-Experimenten mit noch höherem Energielevel werden die DNA-Fragmente wieder größer. Somit wurde in den folgenden Schritten immer 30 Zyklen bei 30 % der Gesamtenergie sonifiziert, sowie das Probenvolumen und die lysierte Zellzahl konstant gehalten.

3.1.5.2 Auswirkung verschieden langer Crosslinkzeiten auf die Effizienz der Sonifizierung

Das Quervernetzen von Proteinen mit DNA wurde hier durch die Behandlung mit Formaldehyd erreicht, das mit einer finalen Konzentration von 1 % den Zellen im Überstand appliziert wurde. Entscheidend war dabei die Inkubationszeit, die bis zur Zugabe von final 125 mM Glycin gewartet wurde, da hierdurch das reaktive Formaldehyd abgebunden wurde und kaum weitere Quervernetzung in den Zellen stattfand. Nach einigen Experimenten, in denen die Zellen bei maximaler Zeitdauer von 10 min mit Formaldehyd inkubiert wurden, konnten mit dem etablierten Sonifizierungs-Protokoll die gewünschten Fragmentgrößen nicht reproduziert werden. Selbst in einem Experiment, in dem 5 min quervernetzt wurde, führten die gleichen Fragmentierungsprotokolle wie in Abb. 13 zu sehr viel größeren Fragmenten (Abb. 15).

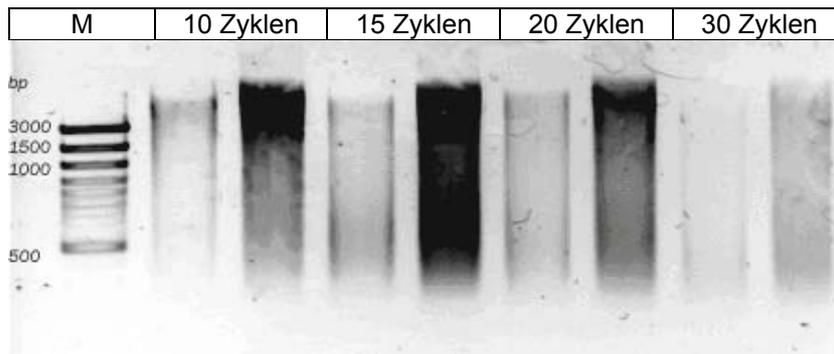


Abb. 15: 1,5% iges Agarose-gel mit 4 verschieden sonifizierten Ansätzen mit je 2 aufgetragenen Mengen (5 und 15 μ l), die Proben wurden für 5 min mit 1% Formaldehyd fixiert und 30 Zyklen bei 30% Energie sonifiziert

Besonders erkennbar wird dies nach 20 und 30 Zyklen, wobei Fragmente in 2 größeren Abschnitten zu finden sind. Zum einen findet man DNA-Bruchstücke, die in der Größe um 500 bp rangieren. Zusätzlich gibt es Fragmente, die immer noch über 3000 bp groß sind.

3.1.5.3 Auswirkungen verschiedener Lysepuffer auf die Sonifizierung

Für die ChIP-Analysen bieten sich verschiedene Protokolle zur Lyse der quervernetzten, gewaschenen Zellen an. Zum einen kann ein Ganzzell-Lysat angefertigt werden, wobei die Zellen hier in Cao-LP, oder in SDS-LP aufgenommen wurden. Proben im Cao-LP (Abb. 16) lassen sich schlecht mit dem etablierten Beschallungsprotokoll bei der maximalen Crosslinkzeit von 10 min fragmentieren.

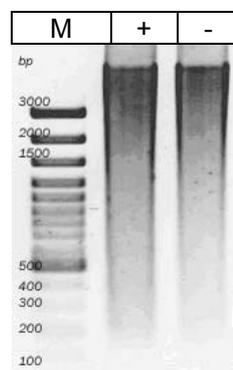


Abb. 16: 2% iges Agarose-gel mit 10 μ l des Inputs aus zwei Ansätzen („+“ induziert, „-“ unbehandelt), die Proben wurden für 10 min mit 1% Formaldehyd fixiert und 30 Zyklen bei 30% Energie sonifiziert

Die DNA Fragmente sind hier hauptsächlich noch über 3000bp groß, was in einem ChIP keine spezifische Aufreinigung von Sequenzen gewährleisten kann. Die 10 minütige Quervernetzung ist dennoch notwendig, da PCRs nach einer IP mit den Proben aus Abb. 14 und 15 gezeigt haben, dass selbst nach 5 min das gewünschte template (IL-8 Promotor) nach einer IP nicht vorhanden war.

Deshalb wurde dieser Puffer nicht weiter für einen Ganzzell-Lysat-ChIP verwendet, sondern nur noch zur Lyse für eine bevorstehende Zytosol-Kern-Trennung, bei der

schließlich mit KE-Puffer weitergearbeitet wird.

Werden die Zellen in SDS-LP aufgenommen, erweist sich die Beschallung an sich als kritisch, da meist sehr starke Schaumbildung auftritt und sich die Proben auch nicht durch Abzentrifugieren oder ruhen lassen erholen. Dabei lässt sich die DNA im SDS-LP nach einem 10 min Crosslink sehr gut fragmentieren (Abb. 17), doch müssen Proben für die IP wegen des 1%igen SDS- Gehalts 1:10 verdünnt werden, wobei in späteren PCR Analysen mit Präzipitaten ebenfalls nie die gewünschten Produkte amplifiziert werden konnten.

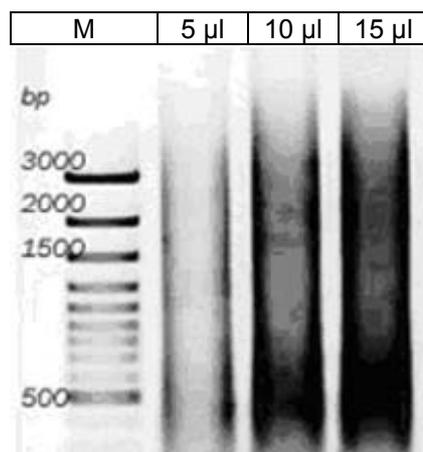


Abb. 17: 1,5% iges Agarosegel mit 3 verschiedenen Mengen einer Probe, die für 1 min mit 1% Formaldehyd fixiert, und 30 Zyklen bei 30% Energie sonifiziert wurde

Ein weiterer Nachteil von Ganzzell-Lysaten ist, dass bei einem ChIP mit p65 das Protein schon konstitutiv im Zytoplasma vorliegt und dadurch die Effizienz der IP von Protein im Komplex mit DNA sinkt, da auch das ruhende p65 präzipitiert wird. Somit ist es sinnvoll eine Zytosol-Kern-Trennung vorzunehmen.

Um zu beurteilen, wie gut die Trennung in quervernetzten Zellen funktioniert, wurden Proben mit einem für Westernblots üblichen Ansatz hergestellt, der ebenfalls für 10 min mit 1 % Formaldehyd, und anschließend mit Glycin behandelt wurde (Abb. 18). Mit diesen Proben konnte allerdings kein standardisierter Auftrag vorgenommen werden, da der Bradford-Assay wegen des Formaldehydanteils nicht zu Quantifizierung genutzt werden konnte. Erfahrungsgemäß war nach einer Trennung laut 2.7.1 der Proteingehalt in der ZF etwa doppelt so hoch, wie in der KF. Dementsprechend wurden hier ein Teil ZF mit zwei Teilen KF verglichen. In einem Kontrollblot wurden die Proben nach einer Immunfärbung gegen GAPDH und Lamin B untersucht.

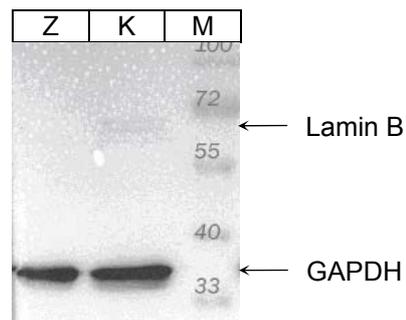


Abb. 18: Kontrollblot mit 10 μ l ZF und 20 μ l KF in den jeweiligen Spuren, Erst-Antikörper rabbit- α -GAPDH 1:400 und goat- α -Lamin B 1:400 über Nacht inkubiert; Zweit-Antikörper goat- α -rabbit und mouse- α -goat 1:10000 für 2h inkubiert; nach ECL Reaktion 10 min im INTAS exponiert.

Die KF ist durch das Quervernetzen stark mit zytosolischen Proteinen kontaminiert. Allerdings wirkt die Trennung hier wie ein Waschschrift, wie sich in ChIP-Versuchen herausgestellt hat.

Werden nun quervernetzte und gewaschene Zellen einer Zytosol-Kern-Trennung unterzogen und die Kernfraktion in KE-Puffer aufgenommen, so konnte nicht die gleiche Effizienz bei der Sonifizierung, wie im SDS-LP erzielt werden, doch konnte die DNA so fragmentiert werden, dass sie in einem ChIP Protokoll eingesetzt werden konnte (Abb. 19).

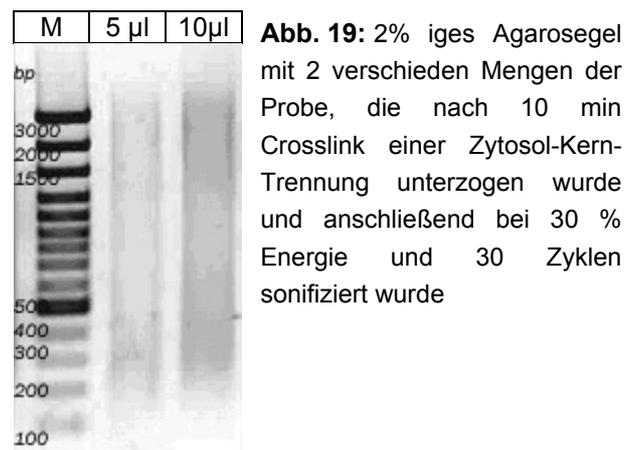
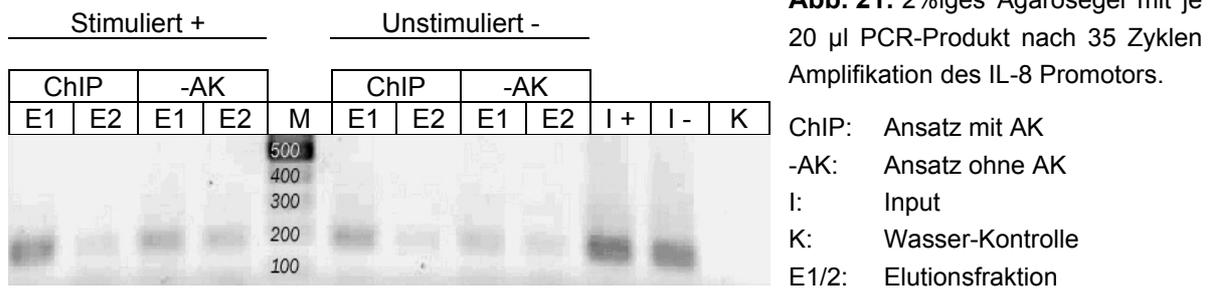


Abb. 19: 2% iges Agarosegel mit 2 verschiedenen Mengen der Probe, die nach 10 min Crosslink einer Zytosol-Kern-Trennung unterzogen wurde und anschließend bei 30 % Energie und 30 Zyklen sonifiziert wurde

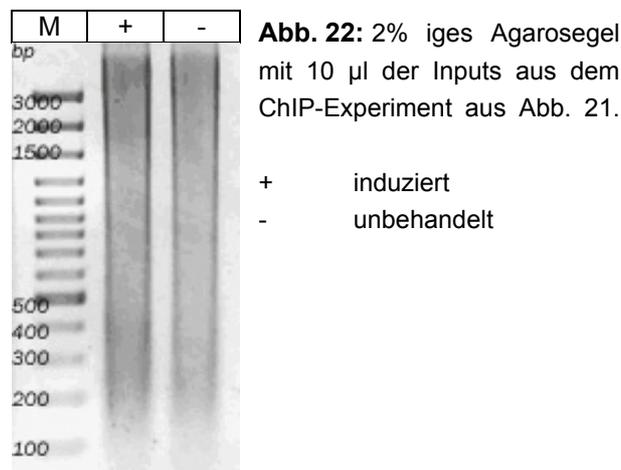
Die Fragmente kumulieren nun in zwei Bereichen: Zum einen findet man Fragmente zwischen 3000 und 1500 bp und kleinere Fragmente, die zwischen 500 und 200 bp groß sind. Unter diesen Bedingungen wurden nun die folgenden ChIP-Analysen durchgeführt, da sie einen guten Kompromiss zwischen Sonifizierbarkeit nach 10 minütigem Crosslinken und auch der Präzipitierbarkeit von Protein-DNA Komplexen darstellen.



Sowohl im stimulierten als auch im unstimulierten Ansatz wurde durch die PCR die 170 bp große Promotorregion des IL-8 Gens in den „ChIP“ Ansätzen amplifiziert, wobei in der ersten Elutionsfraktion mehr template enthalten war, und so die Produktmenge dementsprechend größer ist. Darüber hinaus wird ersichtlich, dass im stimulierten Ansatz mehr PCR-Produkt vorliegt und dies auf die Induktion mit rhIL-1 β zurückzuführen ist.

Auch in den Proben ohne Antikörper, die als Negativ-, oder Hintergrundkontrolle mitgeführt wurden, konnten Produkte in der gewünschten Größe vervielfältigt werden. Dies ist möglicherweise auf unspezifische Bindungen an die für die IP eingesetzten beads zurückzuführen.

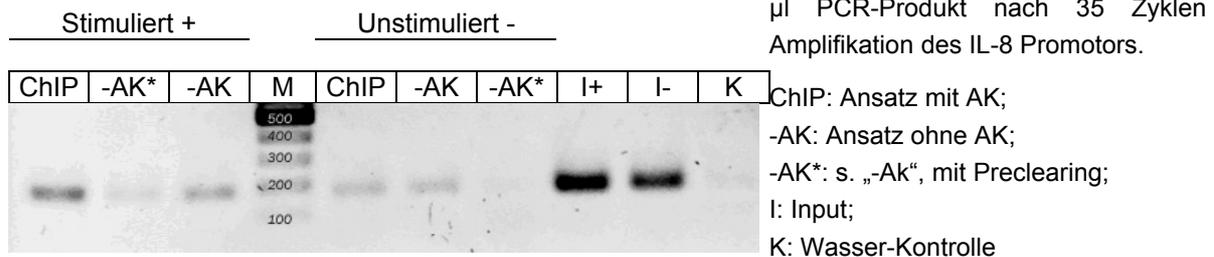
Die beiden Inputs dienen in diesem Experiment als Positivkontrolle. In diesen Proben ist die gesamte DNA im fragmentierten Zustand enthalten. Deshalb konnte mit diesen Ansätzen auch die Effizienz der Sonifizierung überprüft werden (Abb. 22).



Die Sonifizierung führte, wie unter Abschnitt 3.1.5.3, zu einem Gemisch aus DNA-Fragmenten, die um 500 bp streuen und zu Fragmenten, welche immer noch größer als 3000 bp sind. Dementsprechend ist der ChIP nicht sehr aussagekräftig, da nicht klar ist, ob nun vorwiegend große Fragmente präzipitiert wurden, die mehrere Bindesequenzen

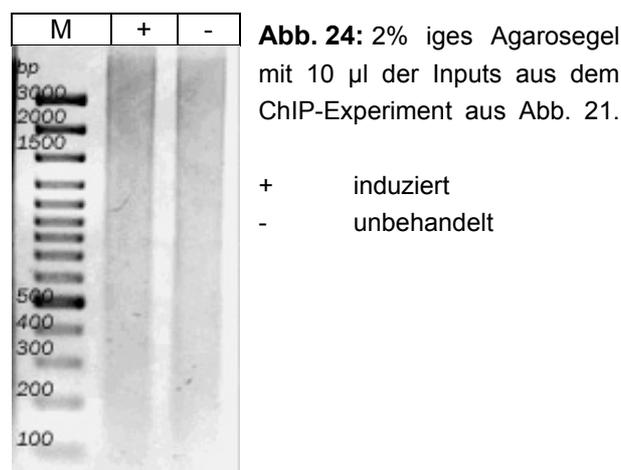
enthalten können, oder kleine Bruchstücke, die nur den IL-8 Promotor enthielten.

Um den Hintergrund zu vermindern, konnte vor der IP ein Preclearing durchgeführt werden (s. Abschnitt 2.8.3). Dafür wurde der Versuch noch einmal wiederholt (Abb. 23), wobei beide Eluate von den beads vereinigt wurden und ein Preclearing vorerst nur mit den „-AK“ Ansätzen vorgenommen wurde.



Zunächst zeigt das Experiment die Reproduzierbarkeit des Versuchs aus Abb. 18. Auch hier liegt im stimulierten Ansatz, der mit AK behandelt wurde, eine größere Menge an PCR Produkt bei 170 bp vor, als in der unstimulierten Probe.

Das durchgeführte Preclearing in den „-AK*“- Ansätzen zeigt, dass ein Großteil von unspezifischen Bindungen an die Sepharose für die IP eliminiert werden konnten und so weniger Hintergrund bei der PCR mitamplifiziert wird. Um die Effizienz der Sonifizierung festzustellen, wurden die Inputs in einem weiteren Gel analysiert (Abb. 24).



In diesem Versuch war die Effizienz der Sonifizierung, der im Vorversuch ähnlich. Dementsprechend findet man noch immer große Fragmente um 3000 bp und kleinere um 500 bp, wobei hier die DNA-Konzentration in den Inputs geringer war.

3.1.8 Etablieren einer konstitutiven ChIP-Positiv-Kontrolle

Will man die ChIP-Technik an neuen Zelllinien etablieren, ist es sinnvoll das System anhand einer einfachen Kontrolle zu testen, bei der die Zellen nicht stimuliert werden müssen. Dabei eignen sich Enzyme oder Proteine für eine IP, die konstitutiv an der DNA arbeiten, bzw. dort assoziiert sind.

An dieser Stelle wurde die Polymerase II ausgewählt, die ständig mRNA von stetig benötigten Proteinen und Enzymen abliest. Nach einer Fixierung, DNA-Fragmentierung, und IP mit einem α -Pol II-Antikörper, sollte im Präzipitat ein solches Gen in einer PCR nachweisbar sein. Hierfür eignet sich das Aktin Gen, da die Zellen diesen Baustoff besonders für die Zellteilung benötigen. Demzufolge eignet sich dieses System besonders für sehr schnell proliferierende Zellen.

Auch hier muss der, Antikörper den Bedingungen der einzelnen Schritte des ChIP-Protokolls standhalten und dementsprechend getestet werden.

3.1.8.1 Testen des Antikörpers im WB

Zunächst wurde der Pol II AK im Westenblot getestet (Abb. 25). Dafür wurden zytosolische und nukleäre Fraktionen aus A549 Zellen (s. Abschnitt 2.7.1) und aus THP1 Zellen (s. Abschnitt 2.7.2) gewonnen und für einen Westernblot vorbereitet. Es wurde ein 7,5% iges SDS-Gel gegossen und auch das 5 %ige Sammelgel mitgeblottet. Dies sollte sicherstellen, dass das bis zu 220 kDa große Protein nicht versehentlich beim Entfernen des Sammelgels mit abgeschnitten, oder das Bandenmuster beschädigt wird, weil es sich vermutlich an der oberen Kante des Trenngels befand.

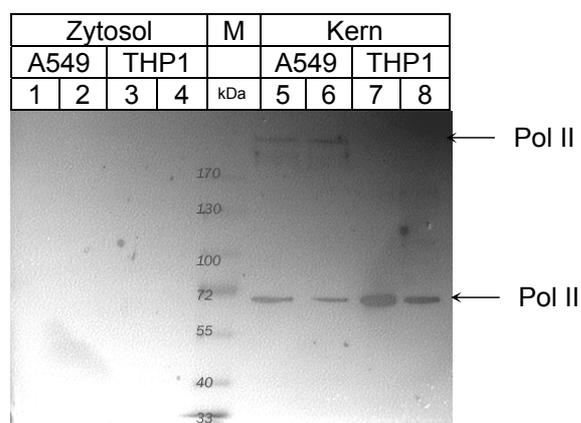


Abb. 25: Blot mit 10 μ g Gesamtprotein in jeder Spur, Erst-Antikörper rabbit- α -Pol II (sc- 900) 1:200 über Nacht inkubiert; Zweit-Antikörper goat- α -rabbit 1:10000 für 2h inkubiert; nach ECL Reaktion 120 min im INTAS exponiert

Bei allen ungeraden Nummerierungen handelt es sich um unstimulierte Proben, bei allen übrigen um 30 min induzierte Ansätze. A549 wurden mit 10 ng/ml IL-1 β behandelt, THP1 wurden mit 10 ng/ml IL-6 stimuliert.

Es war keine Polymerase II in den ZF bei beiden Zelllinien nachzuweisen. In den KF findet man das Protein bei etwa 65 kDa sowohl in A549, als auch in THP1 Zellen. Des Weiteren findet man in A549 auch bei etwa 200 kDa die Polymerase II. Dieser Proteinkomplex besteht aus bis zu 14 Untereinheiten und kann dementsprechend, je nach Denaturierungsgrad in Größen von 10–220 kDa nachgewiesen werden.

3.1.8.2 Überprüfen der Stabilität des Immunkomplexes während der ChIP-Waschschritte

Um den Antikörper in einem ChIP einsetzen zu können, wurde hier die Stabilität bei den verschiedenen Waschschritten nach einer Immunpräzipitation mit 1 µg des rabbit- α -Polymerase II AK (sc-900) in einer quervernetzten KF aus A549 Zellen nachgestellt (Abb. 26). Bei jedem Pufferwechsel wurde nach der jeweiligen Inkubationszeit eine Probe abgenommen. Grundsätzlich wurde wie unter Abschnitt 3.1.4 verfahren und die Präzipitation mit Protein G-Sepharose durchgeführt.

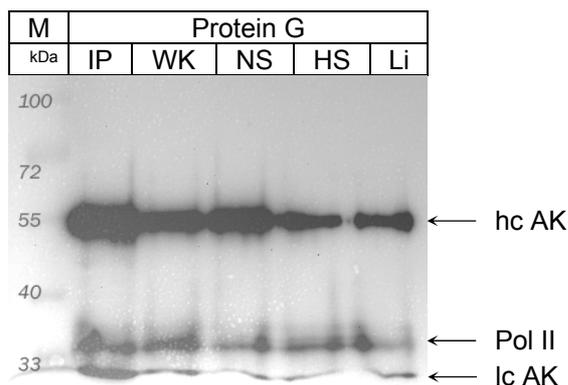
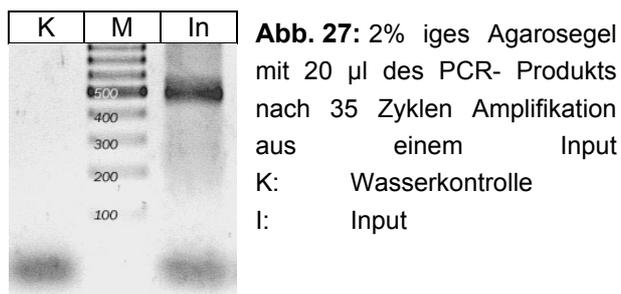


Abb. 26: Blot mit 30 µl (= gesamte Probe aus IP) in jeder Spur, Erst-Antikörper rabbit- α -Pol II (sc-900) 1:200 über Nacht inkubiert; Zweit-Antikörper goat- α -rabbit 1:10000 für 2h inkubiert; nach ECL Reaktion 30 min im INTAS exponiert

Da sowohl die schwere (55 kDa), als auch die leichte Kette (30 kDa) des Antikörpers nach allen Immunkomplex-Waschschritten nachweisbar ist, scheint der Antikörper prinzipiell für einen ChIP Assay geeignet zu sein. Fraglich ist hier die Größe der Polymerase II. In Abb. 25 konnten Größen von ca. 200 und etwa 65 kDa detektiert werden. Hier wurde ein Fragment präzipitiert, dass nur etwa 35 kDa groß ist.

3.1.8.3 Überprüfen der PCR Bedingungen für das Aktin Gen

Um die Bedingungen für die Aktin-PCR zu überprüfen, wurde aus einem erfolgreich beschallten Ansatz aus A549 Zellen, der als ChIP-Input aufgearbeitet wurde, 1 µl für eine Test PCR als template eingesetzt (Abb. 27). Dabei wurden die Bedingungen wie unter 2.9.2 beschrieben eingehalten und 35 Zyklen amplifiziert.



Ein Teil des humanen β -Aktin-Gens konnte in dieser PCR erfolgreich amplifiziert werden. Das Fragment ist 495 bp lang und entspricht damit der erwarteten Größe.

3.2 Untersuchungen zur Beteiligung von STAT3 am IL-1-Weg

3.2.1 Auswahl von Zelllinien für „Crosstalk“-Analysen

Um geeignete Zelllinien zu identifizieren, die für Untersuchungen sich überschneidender Signalwege geeignet sind, wurden Proben der unter 3.1.1 verwendeten Zellüberstände in einen IL-10 ELISA eingesetzt.

Bei diesem Experiment konnten 2 Zelllinien identifiziert werden, die auf den jeweils gebotenen Reiz mit einer IL-10 Produktion reagierten. Die messbaren IL-10 Mengen befanden sich jedoch unterhalb des kleinsten Standards von 30 pg/ml. Dabei handelte es sich um MonoMac6 Zellen, die mit 100 ng/ml LPS behandelt wurden und THP1 Zellen, die mit 10 ng/ml IL-6 stimuliert wurden.

3.2.2 Kinetik der ansprechbaren Zelllinien im Bioassay

Nachdem zwei Zelllinien identifiziert werden konnten, die mit einer sehr schwachen IL-10 Antwort auf den jeweiligen Stimulus reagierten, wurden diese nun in einer Kinetik untersucht (Abb. 28). Dabei wurden Zellüberstände nach einer Stimulation alle 8 h abgenommen und für einen weiteren IL-10 ELISA verwahrt. Der Gesamtzeitraum des Experiments erstreckte sich über 48 h. Zusätzlich wurde der IL-10 Standard halbiert und mit einer geringsten Konzentration von 15 pg/ml gearbeitet.

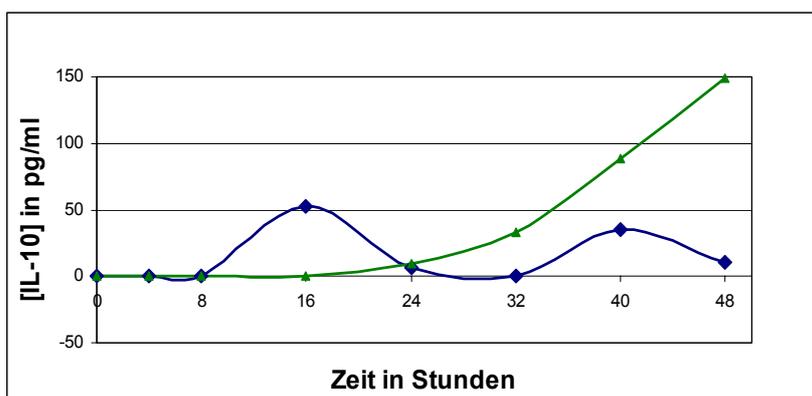


Abb. 28: IL-10 ELISA mit Zellüberständen von MonoMac6 und THP1: 10^4 Zellen pro well stimuliert. Datenpunkt pro Ansatz aus Doppelwerten. Darstellung ohne Verdünnungsfaktor.

◆ Mono Mac 6 100 ng/ml LPS
 ▲ THP1 10 ng/ml IL-6

Beide Zelllinien verhielten sich wie im ersten Experiment, da bei $t = 22$ h eine geringere Konzentration als 30 pg/ml IL-10 im Überstand zu finden war. MonoMac6 Zellen hatten nach 16 h etwa 50 pg/ml IL-10 in den Überstand abgegeben. Die Konzentration nahm daraufhin wieder ab und nach 24 h weiteren Stunden wurde eine zweite IL-10 Produktion mit ca. 35 pg/ml gemessen. Dieser Verlauf bestätigte sich beim Wiederholen des

Experimentes. Hingegen befanden sich die THP1 Zellen im ersten ELISA noch vor ihrer IL-10 Antwort. Hier war kein biphasischer Verlauf zu erkennen, sondern ein steter Anstieg der IL-10-Produktion. Ab dem Zeitpunkt $t = 32$ h nimmt in den folgenden Proben die IL-10 Menge um 55, bzw. 60 pg/ml zu, bis schließlich nach $t = 48$ h eine finale Konzentration von 150 pg/ml vorlag.

Zusätzlich wurden auch PBMCs in diesem Zusammenhang untersucht (Abb. 29). Unverdünnte Überstände von über Nacht stimulierten Zellen wurden in einen weiteren IL-10 ELISA eingesetzt.

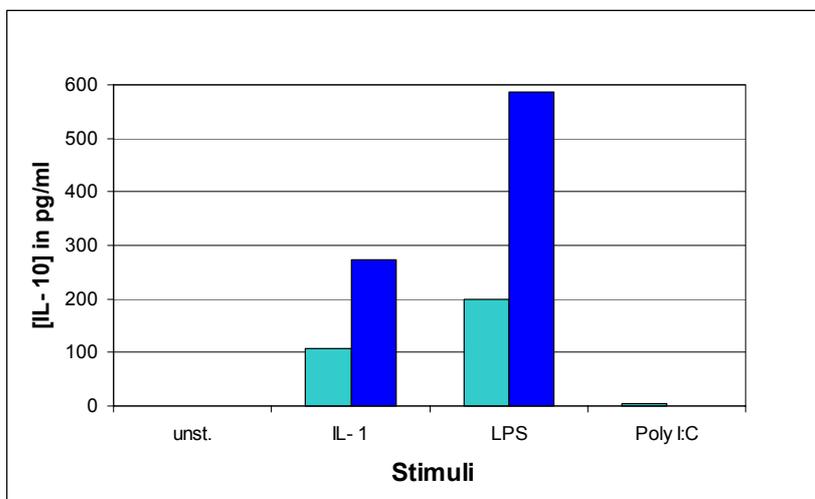


Abb. 29: IL-10 ELISA mit Zellüberständen von PBMCs: 10^5 Zellen pro well über Nacht stimuliert. Datenpunkt pro Ansatz aus Doppelwerten. Darstellung ohne Verdünnungsfaktor.

Vergleicht man die IL-10 Antwort nach IL-1 β und LPS Stimulation, so wird deutlich, dass mit gleichen Konzentrationen LPS eine in etwa doppelt so starke Antwort induziert wurde, als mit rhIL-1 β . Da diese Zellüberstände von einer Diplomandin mit einer anderen Fragestellung stammten und so kein Ansatz mit IL-6 behandelt wurde, sollte das Experiment wiederholt werden (Abb. 30). Dafür wurden frische PBMCs gewonnen und ebenfalls mit einer Zelldichte von 10^5 Zellen pro well ausgesät. Nach einer entsprechenden Stimulation über Nacht, wurden die Zell-Überstände in einen weiteren IL-10 ELISA eingesetzt.

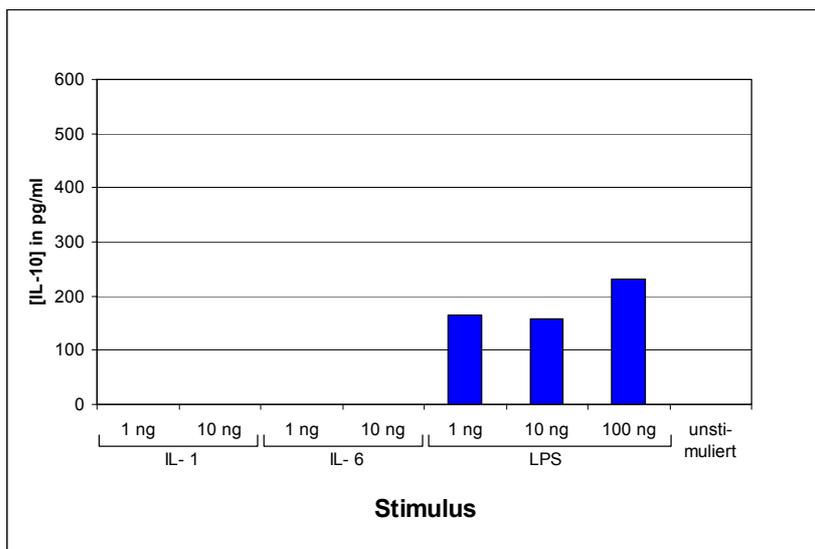


Abb. 30: IL-10 ELISA mit Zellüberständen von PBMCs: 10^5 Zellen pro well über Nacht stimuliert. Datenpunkt pro Ansatz aus Doppelwerten. Darstellung ohne Verdünnungsfaktor.

Nach einer Behandlung mit rhIL-1 β , blieb die IL-10 Antwort bei diesem Versuch komplett aus. Auch nach einer IL-6 Stimulation wurde keine messbare Menge an IL-10 in den Überstand sezerniert. Des Weiteren entsprachen die produzierten IL-10 Mengen, nach einer LPS Exposition, nicht ansatzweise denen aus dem vorangegangenen Versuch. Außerdem konnte hier keine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit bei unterschiedlichen LPS Konzentrationen mehr festgestellt werden, wie es aus Abb. 29 hervorging.

Die Experimente mit den PBMCs sind in diesem Zusammenhang nicht reproduzierbar. Dies mag auf unterschiedliche Aktivierungen des Immunsystems bei verschiedenen Blutspendern zurückzuführen sein. Da bei den zur Verfügung stehenden Blutprodukten keine Aussagen über den Immunstatus des Spenders verfügbar sind und mit hohen interindividuellen Schwankungen zu rechnen ist, wurde entschieden, dieses Zellgemisch nicht für weitere Crosstalk-Analysen einzusetzen.

In keiner der untersuchten Zelllinien konnte im ELISA eine reproduzierbare Überschneidung (Crosstalk) des IL-1 und IL-10 Weges nachgewiesen werden. Deshalb sollten weitere Versuche auf Protein-Ebene zunächst in THP1 Zellen nach IL-6 Stimulation durchgeführt werden, um die „klassische“ Induktion von IL-10 zu verfolgen. Weiterhin sollte überprüft werden, in wie fern der für LPS beschriebene Crosstalk [53] nachweisbar ist.

3.2.3 Erstellen eines Protokolls für reine Zytosol-Kern-Trennungen in THP1

Um den Zeitpunkt der Kern-Translokation von STAT3 eindeutig festzustellen zu können, musste auch für diese Zelllinie eine Zytosol-Kern-Trennung etabliert werden. Zunächst

wurde das Protokoll für A549 Zellen (2.7.1) getestet, doch diese Lyse-Bedingungen erwiesen sich als zu „hart“. Direkt nachdem die Zellen mit Cao-LP versetzt wurden, wurden sofort die Kernmembranen mit lysiert. Deshalb wurde ein neues Lyse-Protokoll entwickelt, bei dem zuerst die Plasmamembranen aufgelöst, und nach der Extraktion der ZF die Kerne separat aufgeschlossen werden konnten (Abb. 31).

Es wurden 2 Ansätze mit THP1 Zellen wie unter 2.7.2 vorbereitet und im Westernblot analysiert. Dabei wurden von beiden Ansätzen sowohl die ZF, als auch die KF im Gel doppelt aufgetragen und nach dem Westerblot-Transfer die Membran zerschnitten. Beide Fraktionen konnten so in separaten Immunfärbungen gleichzeitig analysiert werden.

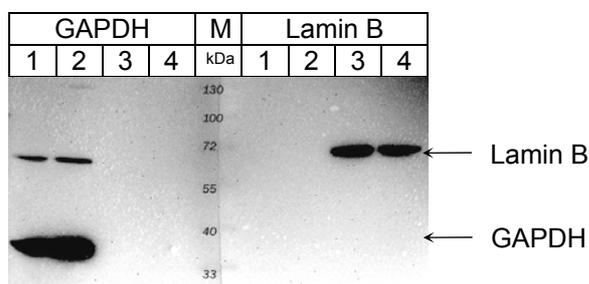


Abb. 31: Kontrollblot mit 20 µg Gesamtprotein in jeder Spur, Erst-Antikörper rabbit-α-GAPDH 1:400 oder goat-α-Lamin B 1:400 über Nacht inkubiert; Zweit-Antikörper goat-α-rabbit oder mouse-α-goat 1:10000 für 2h inkubiert; nach ECL Reaktion 30 min im INTAS exponiert.
1,2 : zytosolische Fraktionen
3,4 : nukleäre Fraktionen

In den ZF findet man nur die GAPDH und kein Lamin B mehr, wie es bei einer Trennung nach 7.2.1 nicht der Fall war. Auch die Kernfraktionen sind nicht mit der zytosolischen Fraktion kontaminiert. Zusätzlich wurden die Blots nach der 30 minütigen Belichtung noch auf einem Röntgenfilm exponiert, um festzustellen, ob noch Signale auftreten, die auf Kontaminationen hindeuten. Da dies nicht der Fall war, konnten mit diesem Protokoll weitere Versuche in THP1 Zellen zur Beobachtung einer Kern-Translokation von Proteinen geplant werden.

3.2.4 Translokation von STAT3 nach IL-6 Stimulation

In diesem Versuch sollte nach einer IL-6 Stimulation die Kern-Translokation von STAT3 in Abhängigkeit von dessen Phosphorylierungsstatus untersucht werden. Für diesen Versuch wurden THP1 Zellen vorbereitet (s. Abschnitt 2.7.2), die unterschiedlich lange mit 10 ng/ml IL-6 behandelt wurden. Die einzelnen Ansätze wurden in 10 min-Stimulationsschritten bis zu einer maximalen Zeitdauer von 60 min exponiert.

Sowohl die zytosolischen, als auch die Kernfraktionen wurden mit Hilfe von jeweils zwei Immunfärbungen untersucht. Bei der p-Tyr705-Färbung soll die generelle Aktivierung von STAT3 gezeigt werden, da diese Phosphorylierung nach einem Zytokin- vermittelten Reiz

durch die Rezeptortyrosinkinasen bzw. JAKs erfolgt.

In der ZF konnte das am Tyr705 modifizierte Protein während der gesamten Dauer der Stimulation nicht im WB detektiert werden. Anschließend wurden die Kernfraktionen im WB untersucht (Abb. 32).

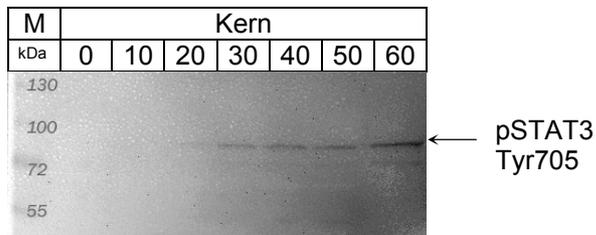


Abb. 32: Blot mit 20 µg Gesamtprotein in jeder Spur, Erst-Antikörper mouse- α -pTyr705 STAT3 (sc-8059) 1:400 über Nacht inkubiert; Zweit-Antikörper goat- α -mouse 1:10000 für 2h inkubiert; nach ECL Reaktion 60 min im INTAS exponiert

Ab 30 min sind am Tyrosinrest 705 phosphorylierte STAT3-Moleküle im Kern sichtbar, die jeweils 92 kDa groß sind. Ab diesem Zeitpunkt steigert sich die Menge des Proteins nicht, sondern bleibt eher auf einem gleichen Niveau. Nur nach 60 min findet man ein stärkeres Signal.

Betrachtet wurde zusätzlich noch die Phosphorylierungsstelle am Ser727 (Abb. 33), über welche die transkriptionelle Aktivität moduliert wird.

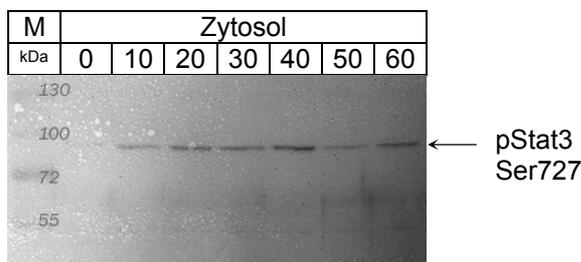


Abb. 33: Blot mit 20 µg Gesamtprotein in jeder Spur, Erst-Antikörper rabbit- α -pSer727 STAT3 (sc-8001-R) 1:400 über Nacht inkubiert; Zweit-Antikörper goat- α -rabbit 1:10000 für 2h inkubiert; nach ECL Reaktion 60 min im INTAS exponiert

In der ZF findet man schon nach 10 min STAT3, das am Ser727 phosphoryliert ist bei 86 kDa. Bis zu einer Stimulationsdauer von 40 min scheint die Menge etwas zuzunehmen, bis ab 50 min ein leichter Rückgang der STAT3 Menge zu verzeichnen ist. Auch die Kernfraktion wurde auf das am Serinrest phosphorylierte STAT3 untersucht (Abb. 34).

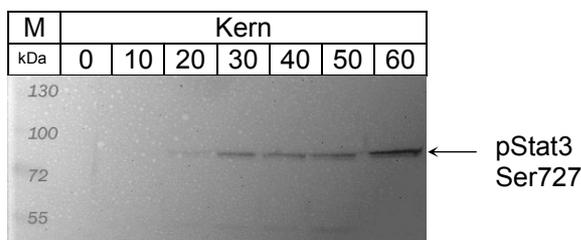


Abb. 34: Blot mit 20 µg Gesamtprotein in jeder Spur, Erst-Antikörper rabbit- α -pSer727 STAT3 (sc-8001-R) 1:400 über Nacht inkubiert; Zweit-Antikörper goat- α -rabbit 1:10000 für 2h inkubiert; nach ECL Reaktion 60 min im INTAS exponiert

Nach einer 30 minütigen Stimulation mit IL-6, ist am Ser727 phosphoryliertes STAT3 im Kern bei 86 kDa nachweisbar. Auch hier verändert sich die Menge des modifizierten

Proteins im zeitlichen Verlauf nicht sehr stark. Nur nach 60 min ist eine stärkere Bande sichtbar, wie in Abb. 32. Somit geht die Abschwächung des Signals aus Abb. 33 mit der hier detektierten Verstärkung einher und deutet damit auf eine bei 30 min beginnende Translokation hin, die sich noch bis zum Zeitpunkt von 60 zuspitzt.

3.2.5 Translokation von STAT3 nach LPS Stimulation

Zusätzlich wurde die STAT3 Modifikation nach einer LPS Behandlung überprüft. Auch hier wurden sieben Ansätze mit THP1 Zellen vorbereitet, die bis zu 60 min mit 100 ng/ml LPS behandelt wurden. Nach einer Zytosol-Kern-Trennung wurden die Fraktionen nach beiden Phospho-STAT3-Immunfärbungen analysiert.

Bei der p-Tyr705-Färbung konnten weder im Zytosol, noch im Kern STAT3 Moleküle mit dieser Modifikation gefunden werden. Auch nach der Exposition eines Röntgenfilms waren nach 24 h keine Banden detektierbar.

Anschließend wurden beide blots „gestrippt“ und die zytosolische (Abb. 35), als auch die Kernfraktion (Abb. 36) im WB nach einer p-Ser727-Färbung analysiert.

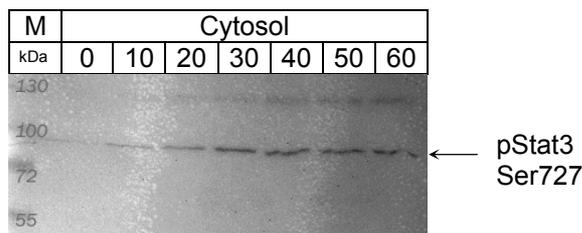


Abb. 35: Blot mit 20 µg Gesamtprotein in jeder Spur, Erst-Antikörper rabbit- α -pSer727 STAT3 (sc-8001-R) 1:400 über Nacht inkubiert; Zweit-Antikörper goat- α -rabbit 1:10000 für 2h inkubiert; nach ECL Reaktion 30 min im INTAS exponiert

Nach einer LPS Stimulation, findet auch hier im Zytosol frühzeitig eine Serin-Phosphorylierung statt. Das am Ser727 phosphorylierte STAT3 ist schon nach 10 min gut bei 86 kDa zu erkennen. Ebenfalls kann man den Effekt beobachten, dass sich ab 30 min die Menge des modifizierten STAT3 nicht verändert.

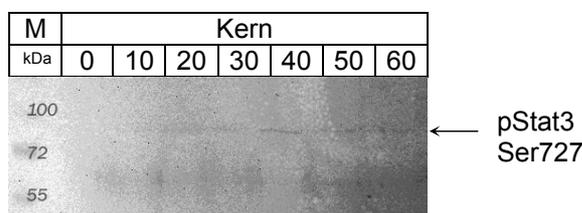


Abb. 36: Blot mit 20 µg Gesamtprotein in jeder Spur, Erst-Antikörper rabbit- α -pSer727 STAT3 (sc-8001-R) 1:400 über Nacht inkubiert; Zweit-Antikörper goat- α -rabbit 1:10000 für 2h inkubiert; nach ECL Reaktion 30 min im INTAS exponiert

Dabei findet man fast kein am Ser727 phosphoryliertes STAT3 im Kern. Wenn überhaupt, dann kann man hier nur nach einer 40 minütigen LPS-Stimulation von einer Kern-Translokation sprechen.

4 Diskussion

Die CHIP-Technik zählt heute zu einer der wichtigsten Methoden bei der Erforschung von proteinspezifischen DNA-Interaktionen. Dabei können unbekannte Bindestellen von Proteinen sogar für ein ganzes Genom mit Hilfe von immunpräzipitierten DNA-Fragmenten bestimmt werden, indem diese nach einer Markierung in einen Microarray eingesetzt werden [78-80]. Selbst für bekannte Bindestellen bietet sich die Möglichkeit, die Interaktion unter verschiedenen Bedingungen mit derselben Grundtechnik weiter zu analysieren. Der große Vorteil dabei ist, dass hier *in vivo* gearbeitet werden kann [65, 66] und so die direkten Auswirkungen von Umweltfaktoren, oder körpereigenen Mediatoren auf molekularer Ebene untersucht werden können.

Um einen CHIP-Assay zu entwickeln, wurde am IL-1-Weg gearbeitet, bei dem nach einer Signaltransduktion ein Chromatin-Remodeling stattfindet, um verschiedene Mediatoren zu induzieren, die eine Entzündung organisieren. Dabei spielt NF- κ B als Regulator und Transkriptionsfaktor eine große Rolle. Der dimere Komplex setzt sich dabei aus ein, oder zwei verschiedenen Mitgliedern der NF- κ B-Familie zusammen: Rel-A (p65), Rel-B, c-Rel, NF- κ B1(p50) und NF- κ B2(p52). Je nach Kombination wird der Zytosol-Kern-Transport und die Transkription von Genen reguliert [81]. Dabei werden zusätzlich Stimulus-abhängige MAPK-Wege aktiviert, wobei weitere Co-Faktoren rekrutiert werden, um spezifische Gene zu induzieren [79, 82].

Durch IL-1 β [83] wird unter Anderem IL-8 über einen NF- κ B- vermittelten Weg induziert. An diesem, auch durch andere Stimuli induzierbaren, Modell wurden bereits CHIP-Experimente durchgeführt und mit Hilfe von α -Rel-A Antikörpern die IL-8 Promotor-Region erfolgreich präzipitiert [79, 82]. Anhand dieses Fallbeispiels sollte der CHIP-Assay entwickelt werden.

4.1 Etablierung eines CHIP-Protokolls am IL-1 Weg

Für die Entwicklung eines NF- κ B abhängigen IL-8 CHIP wurde zunächst auf proteinbiochemischer Ebene die Aktivierung des Dimers im Kontext des IL-1 Signalweges in A549 Zellen untersucht.

In unstimulierten Zellen findet man einen Komplex aus Rel-A:NF- κ B1 vor, der durch die Assoziation mit Mitgliedern der I- κ B-Familie, meist I- κ B α , oder $\sim\beta$, im Zytosol gehalten wird und so keine Transkriptionsaktivität vermitteln kann [84]. Nach einer Aktivierung durch IL-1 β wird der Inhibitor I- κ B α durch die IKK β an zwei spezifischen Resten, Ser32 und

Ser36, in der N-terminalen Regulator-Domäne phosphoryliert [82, 85]. In A549 Zellen konnte diese Aktivierung anhand einer raschen, quantitativen Modifikation von I- κ B α (Abb. 9, Abb. 10) nachvollzogen werden. Die Phosphorylierung beginnt dabei schon nach 5 min Stimulationsdauer. Nach 10 min ist fast der gesamte Pool an I- κ B α umgesetzt.

Durch die Phosphatreste wird eine Poly-Ubiquitinylierung eingeleitet, die in diesem Signalweg immer wieder als Aktivator-Komponente auftritt [19] und zu einer schnellen proteolytischen Zerstörung von I- κ B α führt [86, 87]. Da nach 15 und 20 min Stimulation weder modifiziertes (Abb. 9), noch unphosphoryliertes (Abb. 10) I- κ B α nachweisbar war, wurde zunächst angenommen, dass I- κ B α zu diesem Zeitpunkt abgebaut wurde.

Dennoch konnte im weiteren Verlauf wieder phosphoryliertes I- κ B α nach 30 min wieder im Zytosol nachgewiesen werden (Abb. 11), wobei in diesem Zeitraum kein neues I- κ B α hergestellt wurde (Abb. 12). Die Neusynthese von I- κ B α , die in A549 nach 40-60 min einsetzt (Abb. 12), wurde in einem ähnlichen zeitlichen Rahmen auch in anderen Zelllinien verfolgt [85].

Dennoch ist der Verbleib des pI- κ B α im Zeitraum zwischen 15 und 30 min fraglich, da es offensichtlich weder abgebaut, noch neu synthetisiert wurde. In verschiedenen Studien wurde berichtet, dass den Mitgliedern der I- κ B-Familie nicht nur eine inhibitorische Funktion zukommt, sondern diese nach einer Aktivierung auch am Rücktransport von NF- κ B ins Zytosol beteiligt sind. Die genauen Mechanismen, die durch verschiedene Stimuli hervorgerufen werden, konnten bisher nicht genau aufgeklärt werden, wobei an den jeweiligen Effekten neben I- κ B α , auch I- κ B β entscheidend beteiligt ist [22, 81, 85] und die Phosphorylierung von Rel-A ebenfalls eine wichtige Rolle spielt [88]. Demnach wäre es denkbar, dass hier der phosphorylierte Inhibitor eine regulatorische Rolle für das shuttling von NF- κ B erfüllt.

Des weitern konnte die Kern-Translokation von NF- κ B (Abb. 8) nach einer Immunpräzipitation gegen p65 nachgewiesen werden. Dabei korrelierte hier die Modifikation von I- κ B α (Abb. 9) eindeutig mit der zunehmenden Menge an NF- κ B in der Kernfraktion. Durch diese Untersuchungen konnten die zeitlichen Abläufe einer schnellen Mobilisierung von NF- κ B nach einer IL-1 Stimulation in A549 nachgewiesen werden.

Danach kann das „befreite“ NF- κ B schließlich als Transkriptionsfaktor im Kern wirken, wobei induktionsabhängig eine, bzw. wenige der vielen verschiedenen Bindestellen angesteuert wird [79].

Dementsprechend wurde für einen ChIP die Quervernetzung von Proteinen und DNA nach einer 20 minütigen Stimulation geplant. In der Arbeitsgruppe Hoffmann [82] konnte nach

einer ähnlich langen IL-1 β -Behandlung die Bindung von NF- κ B an den IL-8 Promotor mittels ChIP bereits nachgewiesen werden.

Die Chromatin-Immunpräzipitation sollte dabei mit einem polyklonalen Antikörper gegen Rel-A erfolgen, da die kleine Untereinheit des Dimers NF- κ B1 (p50) auch Homodimere ausbilden kann, die die Induktion von verschiedenen Genen hemmen [22].

4.1.1 Crosslink und Sonifizierung

Bei der Quervernetzung von Proteinen mit DNA mittels Formaldehyd, ist es entscheidend, die Zellen nur so lange, wie unbedingt nötig zu crosslinken. Das heißt, dass für die jeweilige Fragestellung und Zelllinie die Dauer der Fixierung optimiert werden muss. Eine zu lange Exposition kann dabei zu einem „Overcrosslink“ führen, wobei hier neben der Gefahr des Epitop-Verlustes auch die Sonifizierung umso schwieriger zu bewerkstelligen wird [65, 66]. Anhand von Abb. 14 und 15 wird erkennbar, dass die Fixierdauer sich direkt auf die DNA-Fragmentierung auswirkt: Je länger die Exposition mit Formaldehyd andauert, umso größer ist der Grad der Quervernetzung. Je stärker eine Probe quervernetzt ist, umso schlechter lässt sich die DNA durch (gleiches) Sonifizieren in die gewünschte Fragmentgröße zerkleinern. Somit beeinflusst die Dauer der Behandlung mit Formaldehyd auch direkt Spezifität des ChIPs, da möglichst nur kleine DNA-Fragmente für die Chromatin-IP vorliegen sollten.

Dabei ist die Ultraschallbehandlung an sich ein kritischer Punkt, da die Zyklenzahl und auch die Gesamtenergie für eine Fragmentierung optimiert werden müssen. Weiterhin ist hier auch zu beachten, dass sich unter zu starker Beschallung die DNA in Superhelices verdrillt und so für einen ChIP unbrauchbar wird (siehe Abschnitt 3.1.5.1). Die Fragmente erscheinen dabei im Agarosegel wieder größer und können nicht richtig aufgetrennt werden.

Weitere Faktoren, die sich direkt auf die Beschallung auswirken, sind das verwendete Probenvolumen und die darin eingesetzte Zellzahl, die Eintauchtiefe der Sonicatorspitze und der Puffer in dem die Fragmentierung durchgeführt wird [65, 70]. Generell wird empfohlen in einem Detergenz-Puffer zu arbeiten, der 1% SDS enthält [69]. In diesem Puffer wurde auch nach einer 10 minütigen Fixierung die beste Fragmentierung erreicht (Abb. 17). Dennoch konnte nach einer entsprechenden Umpufferung, bzw. Verdünnung nie ein IL-8 Promotor über NF- κ B präzipitiert werden. Die Sonifizierung wurde schließlich nach einer Zytosol-Kern-Trennung in einem Hochsalzpuffer durchgeführt. Trotz der zytosolischen Verunreinigung in der Kernfraktion (Abb. 18), wird durch die Trennung hier

ein Großteil störender Protein-Protein-Komplexe entfernt, die die Effizienz in der Sonifizierung deutlich beeinträchtigen (Vgl. Abb.16 mit Abb. 19).

4.1.2 NF- κ B-ChIP und weiterführende Experimente

Nachdem die einzelnen Schritte optimiert, bzw. überprüft wurden, konnte ein vollständiger ChIP für die IL-8 Promotor-Region durchgeführt werden. In Abb. 21 ist erkennbar, dass nach einer PCR in den „ChIP“ Proben (mit Antikörper), sowohl nach einer IL-1 β Stimulation, als auch im Kontrollansatz die Promotorregion amplifiziert wurde. Das Signal im unbehandelten Ansatz ist dabei schwächer und kann mit der konstitutiven Produktion von IL-8, die in Abb. 5 erkennbar ist, in Verbindung gebracht werden. Die „-AK“ Kontrollen, die für jeden Ansatz mitgeführt wurden, spiegeln dabei den unspezifischen Hintergrund im Experiment wieder. Um die Reproduzierbarkeit zu testen und den Hintergrund zu minimieren, wurde das Experiment wiederholt und mit den „-AK“ Ansätzen die Wirkung eines Preclearings getestet (Abb. 23). Dabei konnte der Hintergrund verringert werden und der NF- κ B ChIP reproduziert werden.

Dennoch ist die Spezifität der Präzipitation in beiden Experimenten aufgrund der Effizienz beim Beschallen fraglich (Abb. 22, Abb. 24). Um diesen Sachverhalt aufzuklären, sollten zusätzliche Kontrollen in der PCR mitgeführt werden. Sinnvoll wäre dabei ein Primerpaar für eine spezifische Sequenz einzusetzen, die etwa 1000 bp 5' vor dem IL-8 Promotor liegt. Sollte diese Region in einer PCR mit amplifiziert werden, muss wiederum an der Sonifizierung gearbeitet werden. In diesem Zusammenhang könnte getestet werden, inwiefern es möglich ist, nach einer Stimulation (und Zytosol-Kern-Trennung) nur die Kernfraktion zu fixieren, um weitere quervernetzte Proteinkomplexe auszuschließen und so die Sonifizierungseffizienz zu erhöhen.

Ein weiteres Problem stellt die Quantifizierung der im ChIP angereicherten DNA-Fragmente dar. Diese ist insofern wichtig, da nur dann klare Aussagen über eine Geninduktion nach PCR-Reaktionen getroffen werden können, wenn bekannte Mengen vom Input und der dazugehörigen Probe eingesetzt wurden. Hier kann statt der Quantifizierung auch ein interner Standard mitgeführt werden. Dabei wird der PCR-Probe eine genau definierte Menge an DNA zugesetzt, die sich nur geringfügig von dem zu amplifizierenden template unterscheidet (z.B. gleiche Sequenz, nur einige Nukleotide kürzer, oder länger), im Agarosegel dennoch als separate Bande sichtbar ist und im Idealfall durch die selben Primer mit amplifiziert wird [89]. Anhand dieses Produktes können bei geringer Zyklenzahl (Produktherstellung in der logarithmischen Phase)

Aussagen über die ursprüngliche Menge an template gemacht, und diese gegebenenfalls für eine weitere PCR standardisiert werden. Um das CHIP-Protokoll in einem anderen biologischen Kontext einzusetzen, wurde begonnen, eine Polymerase II-Positivkontrolle zu etablieren (Abschnitt 3.1.8). Damit kann ohne besondere Vorbehandlung, wie Stimulation und anschließende Amplifikation eines induzierten Gens, der CHIP an anderen Zelllinien getestet werden, um z.B. auch dort die Fixierung und die Sonifizierung zu optimieren. Nach der Anreicherung in einem Polymerase II-ChIP sollten so häufig frequentierte *housekeeping genes*, wie z.B. β -Aktin, in einer PCR amplifiziert werden können. Zusätzlich kann in einem etablierten System der Zusammenhang zwischen Induktion und Transkription untermauert werden, indem mit einem Polymerase II-Präzipitat und den Primern des Zielgens ebenfalls das entsprechende PCR-Produkt amplifiziert wird.

4.2 Unterschiedliche Phosphorylierungsmuster von STAT3

Zuerst wurde STAT3 als ein Mitglied der STAT-Familie identifiziert, das durch den JAK-STAT-Weg schnelle Geninduktionen und damit verbundene regulatorische Effekte bei der Immunantwort erzielt. Dabei wurde allein durch die unterschiedliche Wirkung in verschiedenen Effektorzellen die Bedeutung von STAT3 immer deutlicher.

Demzufolge ist STAT3 in viele Signalwege verwickelt, wobei die Feinmodulation hier entscheidend ist. Experimente mit transformierten STAT3-Molekülen, die stets dimerisieren, konnten die verheerende Wirkung von konstitutiv aktivem STAT3 und dessen Einfluss als Onkogen verdeutlichen [90]. Jedoch konnten keine derartigen Formen des Moleküls in den verschiedenen Tumoren gefunden werden, was darauf hinweist, dass dabei stets die Expression und Aktivität von Kinasen oder Rezeptormolekülen als onkogene Auslöser wirken [91]. In diesem Zusammenhang ist die Untersuchung der verschiedenen Signalwege, bei denen STAT3 aktiviert wird, von großer Bedeutung.

Um weitere Anhaltspunkte auf alternative Signalwege zu finden, sollte bei verschiedenen Zellen nach pro-inflammatorischen Stimuli der Phosphorylierungsstatus von STAT3 untersucht werden, wenn diese in der Lage waren eine anti-inflammatorische IL-10 Antwort zu produzieren. Mehrfach wurde in der Literatur beschrieben, dass gerade durch LPS diese Reiz-Antwort in den verschiedenen Zellen auftritt: in MonoMac6 [52], in PBMCs [52, 53] und in THP1 Zellen [53]. Da LPS über den TLR 4 eine Signaltransduktion vermittelt, wurde hier durch eine „Abkürzung“ in den verschiedenen Effektorzellen des angeborenen Immunsystems eine Eindämmung von übermäßigen pro-inflammatorischen

Immunantworten postuliert. Dabei lag die Vermutung nahe, dass durch gemeinsam genutzte Signaltransduktionsmodule im TIR-Weg auch nach IL-1 β Stimulation eine Verbindung zum JAK-STAT-Weg hergestellt werden kann.

All diese Zellen wurden in dieser Arbeit in mehreren IL-10 ELISAs, sowohl nach LPS-, als auch nach IL-1 Exposition untersucht (Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2). Dabei konnte eine reproduzierbare und eindeutig messbare IL-10 Antwort nach LPS Stimulation nicht nachvollzogen werden und auch nach einer IL-1 Stimulation kein reproduzierbarer Effekt nachgewiesen werden.

In THP1 Zellen wurde daher vorerst nur der „klassisch“ (über JAK-STAT-Moleküle) vermittelte Weg der IL-10 Induktion auf proteinbiochemischer Ebene, nach einer Stimulation mit IL-6, untersucht. Dabei wurden Zytosol- und Kernfraktionen auf das Vorhandensein von aktiven, und damit phosphorylierten STAT3 Molekülen getestet.

Nach einer Immunfärbung gegen den p-Tyr705-Rest, welcher am Rezeptorkomplex durch JAK3 zur generellen Aktivierung von STAT3 modifiziert wird [51], konnte nach einer IL-6-Exposition zu keinem Zeitpunkt im Zytosol nachgewiesen werden. Hingegen konnte nach 20 minütiger Stimulation p-Tyr705-STAT3 im Kern angefärbt werden, welches bis zum Ende der durchgeführten Stimulation in nahezu konstanter Menge nachgewiesen werden konnte (Abb. 32).

Zusätzlich wurde auch der Phosphorylierungsstatus des Ser727 überprüft, da eine IL-10 Induktion nur von STAT3 vermittelt werden kann, wenn dieses an der N-terminalen SH2-Domäne und am Serin in der Nähe der TAD-Domäne phosphoryliert ist [34, 50]. Schon nach 10 min Stimulation mit IL-6 liegt hier am Ser727 phosphoryliertes STAT3 im Zytosol vor (Abb. 33). Im Kern konnte das Molekül ebenfalls nach 20 min anhand der p-Ser727-Färbung nachgewiesen werden (Abb. 34). Dadurch kann die Vermutung, dass die Serin-Modifikation entscheidend bei der Bindung an den Rezeptorkomplex beteiligt ist, zum Teil bestätigt werden, da hier der zeitliche Verlauf der nachweisbaren Phosphorylierungen (nach 10 min p-Ser727 im Zytosol, dann nach 20 min p-Tyr705 im Kern) auf eine sequenzielle Aktivierung von STAT3 hinweist.

Zusätzlich wurde auch nach LPS Stimulation die Phosphorylierung von STAT3 in THP1 beobachtet. Dabei konnte keine Tyr705 Phosphorylierung festgestellt werden, da hier schließlich keine JAK-STAT-Rezeptorvermittlung stattfinden konnte. Dennoch wurde hier STAT3 schon nach 10 min am Ser727 phosphoryliert (Abb. 35), was auf die Aktivität von MAPKs zurückzuführen sein könnte [35].

Eine Translokation in den Kern konnte über die p-Ser727-Färbung nur bei 40 min mit

einem sehr schwachen Signal nachgewiesen werden. An dieser Stelle sollte im Zusammenhang mit der Kern-Translokation von IRAK1 [54] untersucht werden, inwiefern hier eine Dimerisierung möglich ist, da es ausgeschlossen ist, dass der Tyr705 Rest durch diese Kinase modifiziert wird und nur der Serinrest ein potentielles Substrat darstellt. Demnach ist auch fraglich, wie eine derartige Phosphorylierung in der Publikation von Huang et. al. [53] zustande kommen konnte. Hier wurde allerdings auch für 4 Stunden mit LPS stimuliert, so dass durch eine Zytokin-Produktion der behandelten Zellen ein synergistischer Effekt von TIR- und JAK-STAT-vermittelten Weg denkbar ist.

5 Zusammenfassung

Im Zentrum dieser Arbeit stand die Etablierung eines Chromatin-Immunpräzipitations Assay, der für die Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen *in vivo* geeignet ist. Mit Hilfe dieser Arbeitstechnik können auf molekularbiologischer Ebene die Auswirkungen von verschiedenen Einflüssen auf Zellen untersucht werden, da eine reizabhängige Antwort meist durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA eingeleitet wird und darauf hin spezifische Gene induziert werden.

Die wesentlichen Arbeitsschritte der Technik wurden dabei erfolgreich in A549 Zellen am IL-1 Signalweg etabliert und optimiert. Hierfür wurden die zeitlichen Rahmenbedingungen der Aktivierung und Mobilisierung von NF- κ B auf Proteinebene untersucht.

Nach einer entsprechenden Stimulation wurde durch Quervernetzen eine Momentaufnahme von allen an der DNA befindlichen Proteinen gemacht und mittels ihrer spezifischen Bindung, an den relevanten Sequenzen der DNA fixiert.

Durch Ultraschallpulse wurde anschließend das „beladene“ Chromatin fragmentiert, um schließlich durch eine Rel-A-spezifische Immunpräzipitation nur die Protein-DNA-Komplexe aufzureinigen, die durch den IL-1 Stimulus vermittelt wurden.

Nach Entfernen der Crosslinks konnte in der spezifisch angereicherten DNA, mittels PCR-Reaktionen der IL-8-Promotor nachgewiesen werden. Nach einem Vergleich des PCR-Produktes von stimulierten und unbehandelten Zellen, wurde deutlich, dass eine Gen-Induktion des chemotaktisch wirksamen Zytokins IL-8 durch IL-1 β -Stimulation erfolgt.

Zusätzlich sollte geklärt werden, inwiefern STAT3 von Signaltransduktionsmodulen aus dem IL-1 Weg rekrutiert werden kann. Dem lag eine Arbeit zu Grunde in der gezeigt wurde, dass durch LPS, einem pro-inflammatorischen Reiz, direkt ein anti-inflammatorisch wirkendes Zytokin, IL-10, induziert werden kann. Der Crosstalk zwischen den Signalwegen sollte dabei zwischen der IRAK1 und STAT3 stattfinden, wobei rein mechanistisch der Serinrest von STAT3 ein Substrat für IRAK1 darstellt.

Da IRAK1 auch ein Bestandteil des IL-1 Weges ist, lag die Vermutung nahe, dass auch IL-1 β einen STAT3 Weg auslösen kann.

Ein derartiger Crosstalk konnte hier weder für LPS, noch für IL-1 beobachtet werden. Allein für LPS ließen sich die Ergebnisse weder in Bioassays mit anschließendem ELISA, noch auf Protein-chemischer Ebene nachvollziehen, wobei hier auch an den gleichen Zellen gearbeitet wurde.

6 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
α	anti
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTPmix	Gemisch aus Desoxyadenosin-, ~guanosin-, ~cytosin- und ~thymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
x g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, ein Enzym der Glycolyse
h	human
hc	schwere Antikörperkette (heavy chain)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny]-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish Peroxidase)
Ig	Immunglobulin
I- κ B	Inhibitor κ B
IKK	I- κ B Kinase

IL-1 β	Interleukin- 1
IL-1R	Interleukin- 1 Rezeptor (IL- 1RI: Typ I, IL- 1RII: Typ II)
IL-1Ra	Interleukin- 1 Rezeptorantagonist
IL-1RAcP	Interleukin- 1 Rezeptor akzessorisches Protein
IP	Immunpräzipitation
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase
JAK	Janus Kinase
kDa	Kilo Dalton
KF	Kernfraktion
Ic	Leichte Antikörperkette (light chain)
LP	Lysepuffer
LPS	Lipopolysaccharid
M	Marker
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MAPKKK	mitogenaktivierte Protein Kinase Kinase Kinase
MP	Milchpulver
MyD88	MyD88-adapter-like
NE AS	nicht essenzielle Aminosäuren
NF- κ B	Nukleärer Transkriptionsfaktor κ B
NLS	Kerntranslokationssequenz (nuclear localisation sequence)
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
p-	phospho-
PBS	Phosphat- gepufferte Salzlösung
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	pH-Wert
Pol II	Polymerase II
PAMP	Pathogene Struktur (pathogen associated molecular pattern)
PRR	Mustererkennungszepetoren (pathogen recognition receptors)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	rekombinant
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	phospho-Tyrosin-bindende Domäne (src homology 2)
STAT	signaltransduzierende und Transkriptions- aktivierende Proteine (signal transducers and activators of transcription)
Tab.	Tabelle
TAD	Transkriptions-Aktivierungs-Domäne
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TIR	TLR-IL-1R-related
TLR	Toll- ähnlicher Rezeptor (toll- like- receptor)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
Üs	Überstand
WB	Westernblot
ZF	Zytosolfraktion

7 Literatur

1. O'Neill, L.A., *The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defense. Biochem Soc Trans*, 2000. **28**: p. 557-562.
2. O'Neill L.A., D.C., *The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. Immunol Today*, 2000. **21**(5): p. 206–209.
3. Hultmark, D., *Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **199**(1): p. 144–146.
4. Martin, M.U.a.W., H., *Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. Biochem Biophys Acta*, 2002. **1592**(3): p. 265-280.
5. Letsou, A., S. Alexander, K. Orth, and S.A. Wasserman, *Genetic and molecular characterization of tube, a Drosophila gene maternally required for embryonic dorsoventral polarity. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(3): p. 810-814.
6. Morisato, D.a.K.V.A., *The spatzle gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo. Cell*, 1994. **76**(4): p. 677-688.
7. Morisato, D.a.K.V.A., *Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo. Annu Rev Genet*, 1995. **29**: p. 371-399.
8. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart, and J.A. Hoffmann, *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell*, 1996. **86**(6): p. 973-983.
9. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity. Cell*, 2006. **124**: p. 783-801.
10. Kawai, T., S. Akira, *Toll- like receptor downstream signaling. Arthritis Res Ther*, 2005. **7**(1): p. 12-19.
11. O'Neill, J., Luke A., *After the Toll Rush. Science*, 2004. **303**(5663): p. 1481-1482.
12. Mantovani, A., M. Locati, A. Vecchi, S. Sozzani, P. Allavena, *Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. Trends Immunol*, 2001. **22**: p. 328–336.
13. Thomassen, E., B.R. Renshaw, J.E. Sims, *Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the IL-1R superfamily. Cytokine*, 1999. **11**: p. 389–399.
14. Martin, M.U.a.W.F., *The interleukin-1 receptor complex and interleukin-1 signal transduction. Eur Cytokine Netw*, 1997. **8**(1): p. 5-17.
15. Greenfeder, S.A., P. Nunes, L. Kwee, M. Labow, R.A. Chizzonite, G. Ju, *Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. J Biol Chem*, 1995. **270**: p. 13757– 13765.
16. Debets, R., J.C. Timans, B. Homey, S. Zurawski, T.R. Sana, S. Lo, J. Wagner, G. Edwards, T. Clifford, S. Menon, J.F. Bazan, and R.A. Kastelein., *Two novel IL-1 family members, IL-1 delta and IL-1 epsilon, function as an antagonist and agonist of NF-kappa B activation through the orphan IL-1 receptor-related protein 2. J Immunol*, 2001. **167**(3): p. 1440-1446.

17. Suzuki, N., S. Suzuki, G.S. Duncan, D.G. Millar, T. Wada, C. Mirtsos, H. Takada, A. Wakeham, A. Itie, S. Li, J.M. Penninger, H. Wesche, P.S. Ohashi, T.W. Mak, and W.C. Yeh, Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature*, 2002. **416**(6882): p. 750-756.
18. Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart, Z.J. Chen, Activation of I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, 2000. **103**: p. 351– 361.
19. Chen, Z.J., Ubiquitin Signaling in the NF- κ B Pathway. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(8): p. 758-765.
20. Ninomiya-Tsuji J., K.K., A. Hiyama, J.-I. Inoue, Z. Cao, and K. Matsumoto, The kinase TAK1 can activate the NIK-I κ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signaling pathway. *Nature*, 1999. **398**: p. 252-256.
21. Rechsteiner, M.a.S.W.R., PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, 1996. **21**(7): p. 267-271.
22. Gosh, S., and M. Karin, Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell*, 2002. **109**: p. 81-96.
23. Sen, R.a.B., D., Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 1986. **46**: p. 705-716.
24. Stein B. and A. S. Baldwin, J., Distinct mechanisms for regulation of the Interleukin-8 Gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF- κ B. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(11): p. 7191-7198.
25. Janeway, C.A., *Immunobiology: The immune system in health and disease*. 6th edition, ed. G. Science. 2005, New York and London.
26. Leonard, W.J., Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nat Rev Immunol*, 2001. **1**(3): p. 200-208.
27. O'Shea J.J., G., M., Schreiber, R.D., Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*, 2002. **109**(Suppl): p. 121-131.
28. Horvath, C.M., STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *TIBS*, 2000. **25**: p. 496-502.
29. Lackmann, M.e.a., Biomolecular interaction analysis of IFN gamma-induced signaling events in whole-cell lysates: relevance of latent STAT1 in highmolecular weight complexes. *Growth Factors* 16, 39–513, 1998. **16**: p. 39–51.
30. Haan, S.e.a., Cytoplasmic STAT proteins associate prior to activation. *Biochem J*, 2000. **345**: p. 417–421.
31. Darnell, D.E.L.J.E., STATs: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**: p. 651-662.
32. Heim, M.H., et al., STAT SH2 groups contribute to specific interferon signalling by the Jak-STAT pathway. *Science*, 1995. **267**: p. 1347–1349.
33. Darnell, J.E., Kerr, I.M., and Stark, G.R., Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular proteins. *Science*, 1994. **264**: p. 1415–1421.

34. Wen, Z., Zhong Zhong and James E. Darnell Jr., *Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both Thyrosine and Serine phosphorylation*. *Cell*, 1995. **82**: p. 241-250.
35. Decker, T., P. Kovarik, *Serine phosphorylation of STATs*. *Oncogene.*, 2000. **19**: p. 2628-2637.
36. Ihle, J.N., *The Stat family in cytokine signaling*. *Cell Biol*, 2001. **13**: p. 211-217.
37. Decker, T., Lew, D. J., Mirkovitch, J., and Darnell, J. E., Jr., *Cytoplasmic activation of GAF, an IFN- γ regulated DNA binding factor*. *EMBO J*, 1991. **10**: p. 927-932.
38. Kotaja, N., U. Karvonen, O.A. Jänne, J.J. Palvimo, *PIAS Proteins Modulate Transcription Factors by Functioning as SUMO-1 Ligases*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(14): p. 5222–5234.
39. Taga, T., and Kishimoto, T., *gp130 and the interleukin-6 family of cytokines*. *Annu Rev Immunol*, 1997. **15**: p. 797-819.
40. Heinrich, P.C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway1*. *Biochem J*, 1998. **334**: p. 297-314.
41. Schmitz, J., Dahmen, H., Grimm, C., Gendo, C., Müller-Newen, G., Heinrich, P.C., Schaper, F., *The cytoplasmic tyrosine motifs in full-length glycoprotein 130 have different roles in IL-6 signal transduction*. *J Immunol*, 2000. **164**: p. 848–854.
42. Hirano, T., Ishihara, K., and Hibi, M., *Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors*. *Oncogene*, 2000. **19**(2548-2556).
43. Takeda, K., et al., *Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997. **94**: p. 3801-3804.
44. Chapman, R.S., et al., *Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3*. *Genes Dev*, 1999. **13**: p. 2604-2616.
45. Alonzi, T., et al., *Role of STAT3 and PI 3-kinase/Akt in mediating the survival actions of cytokines on sensory neurons*. *Mol Cell Neurosci*, 2001. **18**: p. 270–282.
46. Sano, S., et al., *Keratinocyte-specific ablation of STAT3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis*. *EMBO J*, 1999. **18**(17): p. 4657-4668.
47. Sano, S., et al., *Stat3 in thymic epithelial cells is essential for postnatal maintenance of thymic architecture and thymocyte survival*. *Immunity*, 2001. **15**: p. 261–273.
48. Alonzi, T., et al., *Essential Role of STAT3 in the control of the acute phase response as revealed by inducible gene inactivation in the liver*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**: p. 1621-1632.
49. O'Farrell A.M., L.Y., Moore K.W., Mui A.L., *IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways*. *EMBO J.*, 1998. **17**(4): p. 1006-1018.
50. Wen, Z.a.J.E.D., Jr*, *Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of*

- Stat1 and Stat3. Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(11): p. 2062–2067.
51. Levy, D.E.a.J.E.D., *STATs: transcriptional control and biological impact. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**: p. 651-662.
 52. Benkhart, E.M., Maciej Siedlar, Angela Wedel, Thomas Werner and H. W. Loems Ziegler-Heitbrock, *Role of STAT3 in LPS- induced IL- 10 Expression. J Immunology*, 2000. **165**: p. 1612-1617.
 53. Huang Y., T.L., David C. Sane and Liwu Li, *IRAK1 serves as a novel regulator essential for LPS- induced IL-10 gene expression. J Biol Chem*, 2004. **279**(03.12.): p. 51697-51703.
 54. Böhl G.-F., O.J.K., R. Brigelius-Flohe´, *Translocation of the interleukin- 1 receptor-associated kinase- 1 (IRAK-1) into the nucleus. FEBS Letters*, 2000. **477**: p. 73-78.
 55. Yan, Y., T. Kluz, P. Zhang, H.B. Chen, and M. Costa, *Analysis of specific lysine histone H3 and H4 acetylation and methylation status in clones of cells with a gene silenced by nickel exposure. Toxicol Appl Pharmacol*, 2003. **190**: p. 272-277.
 56. Weinmann, A.S., P.S. Yan, M.J. Oberley, T.H. Huang, and P.J. Farnham, *Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis. Bio Techniques*, 2002. **969**(16): p. 235-244.
 57. Ren, B.a.B.D.D., *Use of Chromatin Immunoprecipitation Assays in Genome-Wide Location Analysis of Mammalian Transcription Factors. Meth Enzymology*, 2004. **376**: p. 304-315.
 58. Niranjana Kumari, S., E. Lasda, R. Brazas, and M.A. Garcia-Blanco, *Reversible cross-linking combined with immunoprecipitation to study RNA-protein interactions in vivo. Methods*, 2002. **26**: p. 182-190.
 59. O'Neill, L.P.a.T., B.M., *Immunoprecipitation of native chromatin: N-ChIP. Methods*, 2003. **31**: p. 76-82.
 60. BioLynx, *ChIP-IT™ from Active Motif, in Internet, Abruf am 09.05.2006. <http://www.biolyx.ca/promotions/chipit.html>; Brockville, Ontario.*
 61. Toth, J.a.M.D.B., *The specificity of protein-DNA crosslinking by formaldehyde: in vitro and in drosophila embryos. Nucleic Acids Res*, 2000. **28**: p. e4.
 62. Tuite, E.M.a.J.M.K., *Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. J Photochem Photobiol B*, 1993. **21**: p. 103-124.
 63. Samuel, S.K., V.A. Spencer, L. Bajno, J.M. Sun, L.T. Holth, S. Oesterreich, and J.R. Davie, *In situ cross-linking by cisplatin of nuclear matrix- bound transcription factors to nuclear DNA of human breast cancer cells. Cancer Res*, 1998. **58**: p. 3004-3008.
 64. Spencer, V.A., S.K. Samuel, and J.R. Davie, *Altered profiles in nuclear matrix proteins associated with DNA in situ during progression of breast cancer cells. Cancer Res.*, 2001. **61**: p. 1362-1366.
 65. Orlando, V., H. Strutt, and R. Paro, *Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. Methods*, 1997. **11**: p. 205-214.
 66. Orlando, V., *Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. Trends Biochem Sci*, 2000. **25**: p. 99-104.

67. Lejnine, S., G. Durfee, M. Murnane, H.C. Kapteyn, V.L. Makarov, and J.P. Langmore, Crosslinking of proteins to DNA in human nuclei using a 60 femtosecond 266 nm laser. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**: p. 3676-3684.
68. Dedon, P.C., J.A. Soultz, C.D. Allis, and M.A. Gorovsky, A simplified formaldehyde fixation and immunoprecipitation technique for studying protein- DNA interactions. *Anal Biochem*, 1991. **197**: p. 83-90.
69. Upstate, manual for Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit, in Internet. <http://www.upstate.com/img/coa/17-295-33519A.pdf>. New York.
70. Spencer, V.A., J.M. Sun, L. Li, and J.R. Davie, Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods*, 2003. **31**: p. 67-75.
71. Bernd Schmeck, J.Z., Kerstin Moog, Vincent van Laak, Sylvia Huber, Andreas C. Hocke, Bastian Opitz, Elke Hoffmann, Michael Kracht, Jens Zerrahn, Sven Hammerschmidt, Simone Rosseu, Norbert Suttrop and Stefan Hippenstiel, Streptococcus pneumoniae- induced p38 MAPK-dependent phosphorylation of RelA at the Interleukin- 8 Promotor. *J of Biol Chem*, 2004. **279**(17.12.): p. 53241-53247.
72. Yingsu Huang, T.L., David C. Sane and Liwu Li, IRAK1 serves as a novel regulator essential for LPS- induced IL-10 gene expression. *J Biol Chem*, 2004. **279**(03.12.): p. 51697-51703.
73. Tedder, Z.a., A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells. *Blood*, 1995. **86**(9): p. 3295-3301.
74. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
75. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
76. Roche, A.S., Lab FAQs. Find a quick Solution. Vol. 2nd Edition. 2000, Penzberg, Germany.
77. B. David Hames, S.J.H., Gene Probes 1. a practical approach. 1995, reprinted 2002, New York: Oxford University Press.
78. Horak, C.E., M.C. Mahajan, N.M. Luscombe, M. Gerstein, S.M. Weissman, M. Snyder, GATA-1 binding sites mapped in the beta-globin locus by using mammalian chip-chip analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002. **99**: p. 2924-2929.
79. Martone, R., G. Euskirchen, P. Bertone, S. Hartman, T. E. Royce, N. M. Luscombe, J. L. Rinn, F. K. Nelson, P. Miller, M. Gerstein, S. Weissman, M. Snyder, Distribution of NF-kB-binding sites across human chromosome 22. *PNAS*, 2003. **100**(21): p. 12247-12252.
80. Buck, M.J.a.L., J.D., ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. *Genomics*, 2004. **83**: p. 349-360.
81. Hayden, M.S., and S. Ghosh, Signaling to NF-kB. *Genes Dev*, 2004. **18**: p. 2195–2224.

82. Hoffmann, E., O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann, and M. Kracht, Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol*, 2002. **72**: p. 847-855.
83. Kasahara, T., et al, IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line. *Immunology*, 1991. **74**(1): p. 60-67.
84. Hoffmann, A., A. Levchenko, M. L. Scott, and D. Baltimore., The I κ B-NF κ B signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science*, 2002. **298**: p. 1241–1245.
85. Thompson, J.E., R.J. Phillips, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S. Gosh, I κ B-beta regulates the persistent response in a Biphasic Activation of NF κ B. *Cell*, 1995. **80**: p. 573-582.
86. Baeuerle, P.A., Baltimore D., NF- κ B: Ten Years After. *Cell*, 1996. **87**(1): p. 13-20.
87. Karin, M., Y. Ben-Neriah, Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF κ B activity. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 621-663.
88. Schmitz, M.L., s.Bacher, M. Kracht, I κ B-independent control of NF κ B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem Sci*, 2001. **26**(3): p. 186-190.
89. Pingoud, A., C. Urbanke, *Arbeitsmethoden der Biochemie*. 1997, Berlin - New York: Walter de Gruyter.
90. Bromberg, J., STAT3 as an Oncogene. *Cell*, 1999. **98**: p. 295-303.
91. Bromberg, J., Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest*, 2002. **109**: p. 1139–1142.