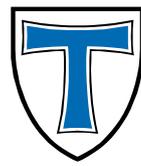


JUSTUS-LIEBIG-



UNIVERSITÄT
GIESSEN

Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie

Prof.Dr.med.M.Kracht

Mechanismen der nukleären
Genregulation in der Entzündungsantwort
von Epithelzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaft (Dr.rer.nat.)

am Fachbereich für Biologie und Chemie

vorgelegt von Liane Moana Jurida

Gießen, 2015

1. Gutachter: Prof.Dr. Rainer Renkawitz (JLU Gießen)
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Kracht (JLU Gießen)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung / Summary	7
	1.1 Zusammenfassung	7
	1.2 Summary	8
2	Einleitung	9
	2.1 Interleukin 1 und seine Rolle in der Entzündungsantwort	9
	2.2 Der Interleukin 1 Signalweg und seine wichtigsten Komponenten	11
	2.2.1 Der Schlüsselproteinkomplex NF- κ B	12
	2.2.2 Die MAPK Kinase Kinase TAK1	15
	2.2.3 Chemokine: Typische Zielgene	16
	2.3 Chromatinstruktur und Histonmodifikationen als entscheidende Komponenten der Genregulation	19
	2.4 Regulatorische Elemente im Genom	23
	2.5 Zielsetzung der Arbeit	27
3	Material	28
	3.1 Verbrauchsmaterial	28
	3.2 Geräte	28
	3.2.1 Allgemeine Geräte	28
	3.2.2 Systeme für Elektrophorese, Western Blot und Fotografie	29
	3.2.3 Zentrifugen	29
	3.2.4 Mikroskope und Photometer	29
	3.2.5 Zellkultur	29
	3.3 Chemikalien	30
	3.4 Puffer und Lösungen	30
	3.4.1 Puffer für Chromatinimmunopräzipitation (ChIP)	30
	3.4.2 Puffer für Agarose-Gelelektrophorese	31
	3.4.3 Puffer für SDS-PAGE und Western Blot	31
	3.4.4 Puffer für DNA-Methylierungsanalysen	33
	3.4.5 Medien	33
	3.5 Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien	34
	3.6 Enzyme und Inhibitoren	35

3.7 Standards	35
3.8 Plasmide	35
3.9 Zelllinien	36
3.10 Bakterienstämme	36
3.11 Zusätze beim Bakterienwachstum	36
3.12 Synthetische Oligonukleotide	36
3.12.1 <i>ChIP Primer – IL8 Scanning Primer Promotor</i>	36
3.12.2 <i>ChIP Primer – IL8 Scanning Gen</i>	37
3.12.3 <i>Weitere ChIP Primer</i>	38
3.12.4 <i>Primer zur Analyse von lincRNAs</i>	39
3.12.5 <i>Primer für methylierungsspezifische PCR (MS-PCR)</i>	39
3.12.6 <i>Primer für Bisulfit-Sequenzierung</i>	39
3.13 <i>TaqMan-Assays on Demand (Applied Biosystems)</i>	39
3.14 Antikörper	40
3.14.1 <i>Antikörper für ChIP</i>	40
3.14.2 <i>Antikörper für Immunfluoreszenz</i>	41
3.14.3 <i>Antikörper für Western Blot</i>	41
4 Methoden	43
4.1 Isolierung von Nukleinsäuren	43
4.1.1 <i>Isolierung von Plasmid-DNA</i>	43
4.1.2 <i>Isolierung von RNA</i>	43
4.1.3 <i>Isolierung von genomischer DNA</i>	43
4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	44
4.2.1 <i>PCR im Standard-Thermocycler mit Analyse über Agarosegelelektrophorese</i>	44
4.2.2 <i>Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)</i>	45
4.2.3 <i>Real-time PCR</i>	46
4.3 Arbeiten mit Bakterien	47
4.3.1 <i>Herstellung chemisch kompetenter Bakterien</i>	47
4.3.2 <i>Transformation</i>	48
4.3.3 <i>Dauerkulturen von Bakterien</i>	48
4.4 RNA-Analyse	48

4.4.1	<i>Microarray-basierte mRNA-Expressionsanalyse</i>	48
4.4.2	<i>RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)</i>	49
4.5	Analyse von Chromatin	49
4.5.1	<i>Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)</i>	49
4.5.2	<i>ChIP-DNA-Sequenzierung (ChIP-Seq)</i>	50
4.5.3	<i>Chromatin-Reimmunopräzipitation (ReChIP)</i>	51
4.6	Zellkultur	51
4.6.1	<i>Auftauen und Einfrieren von Zellen</i>	51
4.6.2	<i>Kultivieren und Passagieren von Zellen</i>	52
4.6.3	<i>Stimulation und Ernten von Zellen</i>	52
4.7	Indirekte Immunfluoreszenz mit Kernfärbung	52
4.8	DNA-Methylierungsanalyse	53
4.8.1	<i>In-vitro Methylierung</i>	53
4.8.2	<i>Bisulfit-Behandlung</i>	53
4.8.3	<i>Methylierungsspezifische PCR (MS-PCR)</i>	54
4.8.4	<i>Bisulfit-Sequenzierung</i>	54
4.9	SDS-PAGE und Western Blot	55
4.9.1	<i>Lysate zur Immunodetektion im Western Blot</i>	55
4.9.2	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford</i>	56
4.9.3	<i>Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	56
4.9.4	<i>Western Blot und Immunodetektion mittels ECL-Reaktion</i>	57
4.10	Bioinformatische/statistische Analysen	58
4.10.1	<i>Microarray Daten</i>	58
4.10.2	<i>RNA-Seq Daten</i>	59
4.10.3	<i>ChIP-Seq Daten</i>	59
4.10.4	<i>Fehlerberechnungen</i>	61
5	Ergebnisse	62
5.1	Der Einfluss von IL-1 auf Epithelzellen	62
5.1.1	<i>Genomweite Erfassung der TAK1-abhängig regulierten IL-1 Zielgene</i>	62
5.1.2	<i>IL-1- und TAK1-abhängige Modulation wichtiger Signalproteine und Transkriptionsfaktoren in KB Zellen</i>	70

5.2 Identifizierung und Charakterisierung von NF- κ B p65-Bindestellen in IL-1 induzierten Genen mittels Chromatinimmunopräzipitation (ChIP).....	75
5.2.1 Die induzierbaren Gene des CXC-Chemokingen-Clusters auf Chromosom 4 besitzen eine regulierte p65- Bindestelle im Bereich des Transkriptionsstarts.....	75
5.2.2 Charakterisierung des Histonstatus an p65-Bindestellen im CXC-Chemokingen-Cluster.....	79
5.2.3 Analyse des DNA-Methylierungsstatus an den „CpG island“- Promotoren ausgewählter Chemokingene.....	80
5.3 ChIP-Seq basierte Analyse der Bindungsereignisse und Histonmodifikationen im CXC-Chemokingen-Cluster.....	86
5.3.1 Analyse der IL-1 abhängigen Rekrutierung von NF- κ B p65 und Polymerase II im gesamten CXC-Chemokingen-Cluster.....	86
5.3.2 Für die IL-1 abhängigen Chromatinveränderungen im CXC-Chemokingen-Cluster ist die Proteinkinase TAK1 essentiell.....	90
5.3.3 Die Bindungsereignisse im CXC-Chemokingen-Cluster sind übertragbar auf andere Zellsysteme und Stimulationsereignisse.....	90
5.4 Charakterisierung von weiteren an der IL-1 abhängigen Genregulation beteiligten Chromatinfaktoren.....	95
5.4.1 IL-1 und TAK1 abhängige Rekrutierung von AP-1 Proteinen und CBP Faktoren an den IL8 Promotor.....	96
5.4.2 Bindungskinetik an der IL-1 abhängigen Genregulation beteiligter Kofaktoren.....	98
5.5 Die Cyclin-abhängige Kinase 6 (CDK6) kann an Chromatin rekrutiert werden und beeinflusst die Induktion von IL8 und weiteren IL-1 Zielgenen.....	100
5.5.1 CDK6 wird nach IL-1 Induktion an den Promotor von IL8 sowie an alle anderen induzierten Gene des CXC-Chemokingen-Clusters rekrutiert.....	101
5.5.2 CDK6 bindet als genereller Kofaktor an die Promotoren IL-1 regulierter Gene und kolokalisiert genomweit mit p65 und Pol II an aktiven Genen.....	102
5.5.3 CDK6 spielt eine wichtige Rolle im Aktivierungskomplex an den Genpromotoren.....	105
5.6 Identifizierung und Charakterisierung zweier Enhancerbereiche „upstream“ der beiden Startgene im IL-1 koregulierten Chemokingen-Cluster.....	110
5.6.1 Die Chromatinabschnitte im Bereich der IL-1 regulierten p65 Peaks „upstream“ der beiden Startgene des Clusters weisen Enhancer-typische Histonmodifikationen auf.....	111
5.6.2 Vergleich der Kofaktor-Rekrutierung an p65 Promotor und Enhancer Peaks.....	115
5.6.3 CTCF und Kohesin Bindestellen im Chemokingen-Cluster deuten auf eine komplexe dreidimensionale Struktur hin.....	119

5.7 Identifizierung IL-1 regulierter long intergenic non-coding (linc) RNAs als weitere mögliche TAK1-abhängige Chromatinregulatoren	125
6 Diskussion	131
6.1 KB-Zellen als Modellsystem zur Untersuchung chromatin-basierter Mechanismen der inflammatorischen Signaltransduktion und Genexpression in humanen Epithelzellen	131
6.2 Chromatin-basierte Mechanismen als Determinanten der IL-1abhängigen Signaltransduktion und Genexpression in humanen Epithelzellen	133
6.2.1 Charakterisierung von IL-1 regulierten Promotoren	133
6.2.2 Zelltypspezifische Expressionsmuster durch veränderte DNA-Methylierung	134
6.2.3 CTCF und Kohesin an IL-1 Zielgenen	135
6.2.4 Der Faktor JunD kann bereits basal an Zielgen-Promotoren detektiert werden	136
6.3 IL-1 abhängige Veränderungen an koregulierten Genclustern	137
6.4 Identifikation IL-1 induzierter regulatorische Elemente im Genom von Epithelzellen	140
7 Anhang	145
7.1 Literaturverzeichnis	145
7.2 Abbildungsverzeichnis	157
7.3 Abkürzungsverzeichnis	159
7.4 PhD Portfolio	162
7.5 Danksagung	166
7.6 Eidesstattliche Erklärung	167
7.7 Publikation „Jurida et al., 2015“	168

1 Zusammenfassung / Summary

1.1 Zusammenfassung

Bei Entzündungsreaktionen des menschlichen Körpers nimmt das Cytokin Interleukin(IL)L-1 eine Schlüsselrolle ein. IL-1 bewirkt auf zellulärer Ebene eine schnelle und starke Regulation der Expression mehrerer hundert Zielgene. Für die intrazelluläre Übermittlung von IL-1 Signalen ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B von großer Bedeutung, der nach seiner Aktivierung in den Zellkern transloziert und dort an seine DNA-Bindestellen rekrutiert wird. Ein weiterer zentraler Regulator im IL-1 Signalweg ist die Kinase TAK1, die „inhibitor of NF- κ B (I κ B) kinases (IKKs)“ und „mitogen activated protein kinase kinases (MAPKK)“ phosphoryliert und in der Folge die NF- κ B, p38 und JNK Signalwege aktiviert. Während die Komponenten des cytosolischen IL-1 Signalwegs bereits sehr detailliert untersucht wurden, sind die Erkenntnisse zur nukleären Regulation begrenzt. Im Verlauf dieser Arbeit wurden in einem Modell menschlicher Epithelzellen die Mechanismen der nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort analysiert. Die IL-1-vermittelte Regulation eines 400 Kilobasen umfassenden CXC-Chemokinen-Clusters auf Chromosom 4 wurde modellhaft mittels ChIP-PCR und ChIP-seq hinsichtlich der Chromatinveränderungen und der Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren untersucht und mit den mRNA Expressionsänderungen von IL-1-induzierten Genen des Clusters korreliert. Charakteristisch für den Promoterbereich IL-1-aktivierter Zielgene war vor allem die Zunahme der Histonmodifikation H3K9ac, eine regulierte p65 NF- κ B Bindestelle, sowie die Bindung von CTCF und JunD. Reprimierte Zielgene des Clusters zeigten ein methyliertes „CpG island“, konnten durch Anwendung eines DNA-Methyltransferase-Inhibitors reaktiviert werden und wiesen eine ausgeprägte H3K9me3 auf. Mittels ChIP Kinetiken konnte an den IL-1 induzierten Promotoren der Aufbau eines Aktivierungskomplexes mit einer Öffnung der Nukleosomen-Struktur beobachtet werden. Dabei wurde auch eine bisher nicht bekannte Chromatinrekrutierung der Zellzykluskinase CDK6 an IL-1 Zielgene nachgewiesen. Im Bereich des CXC-Chemokinen-Clusters konnten zudem IL-1 abhängige Enhancer-Strukturen identifiziert werden und genomweite ChIP-Seq Auswertungen zeigten, dass diese neue Enhancer-Klasse von genereller Bedeutung ist (81). Neben diesen Enhancern wurden mittels RNA-seq IL-1 induzierte „long intergenic non-coding (linc)“ RNAs in Epithelzellen detektiert. Nicht nur die Rekrutierung von p65 NF- κ B und von sechs AP-1 Proteinen an Promotoren und Enhancern, sondern auch alle gemessenen IL-1-regulierten epigenetischen Effekte und die lincRNA-Induktion waren von der Kinase TAK1 abhängig. Diese Ergebnisse weisen TAK1 und p65 NF- κ B die Rolle von „master regulators“ in der IL-1 abhängigen nukleären Genregulation zu, die im Rahmen dieser Arbeit tiefergehend aufgeklärt werden

konnte und so einen Ausgangspunkt für neue Studien und therapeutische Strategien entzündlicher Erkrankungen bietet.

1.2 Summary

The cytokine interleukin(IL)-1 plays a key role for inflammatory reactions of the body. At the cellular level, IL-1 causes rapid and strong regulation of the mRNA expression of several hundred target genes. The transcription factor NF- κ B plays an important role for the transduction of IL-1 signals. Upon activation by IL-1, NF- κ B translocates to the nucleus and is recruited to its DNA-binding sites. Another central regulator of IL-1 signaling is the protein kinase TAK1 which phosphorylates inhibitor of NF- κ B (I κ B) kinases (IKKs) and mitogen activated protein kinase kinases (MAPKK) followed by activation of the NF- κ B, p38 und JNK signaling pathways. Whereas the components of the cytosolic IL-1 signaling pathway have been investigated at considerable detail, knowledge on the nuclear events is limited. In this thesis, using human epithelial cells, the nuclear mechanisms of inflammatory gene regulation were investigated. The IL-1-mediated regulation of a CXC chemokine gene cluster comprising 400 kilobases and located at chromosome 4 served as a model to investigate chromatin changes and recruitment of transcription factors and cofactors by ChIP-PCR and ChIP-seq. These changes were also correlated with changes of mRNA expression of IL-1-induced genes of the cluster. The promoter regions of IL-1-activated genes were characterized by induced levels of H3K9ac, regulated binding of NF- κ B p65 and recruitment of CTCF and JunD. Repressed genes of the cluster were characterized by methylated „CpG islands“, reactivation by application of a DNA-methyltransferase-inhibitor and high levels of H3K9me3. By ChIP-PCR kinetic analyses the formation of an activating multiprotein complex and the relaxation of the chromatin structures within the cluster were observed. Additionally, a hitherto unknown recruitment of the cell cycle kinase CDK6 to chromatin was found. Moreover, within the CXC chemokine gene cluster IL-1-regulated enhancer structures were identified. Genome wide analyses by ChIP-seq revealed a general role of these enhancers for IL-1 signaling. By RNA-seq IL-1-induced long intergenic non-coding (linc) RNAs were detected in these epithelial cell cultures. Most of the investigated events at promoters and enhancers, including the recruitment of p65 NF- κ B and six AP-1 proteins as well as histone modifications and regulation of lincRNAs turned out to depend on TAK1 kinase activity. Collectively, these results reveal TAK1 and p65 NF- κ B as master regulators of IL-1-mediated nuclear regulation of gene expression. The mechanistic insights achieved in this thesis define starting points at the level of chromatin and chromatin-regulating pathways for novel approaches to tackle inflammatory diseases.

2 Einleitung

2.1 Interleukin 1 und seine Rolle in der Entzündungsantwort

Das Immunsystem des Menschen ist ein sehr komplexes und vielschichtiges biologisches Abwehrsystem, das den Organismus vor Schädigung durch Pathogene, fremde Substanzen, aber auch fehlerhafte, körpereigene Zellen schützen soll. Es besteht aus einem Netzwerk verschiedener Komponenten wie Organen, Zelltypen und Molekülen. Um seine Funktion korrekt ausüben zu können, ist die genaue Synchronisation der verschiedenen Komponenten essentiell, die intra- und extrazelluläre Signalübertragung und Kommunikation nimmt also eine Schlüsselrolle in der Immunabwehr und Entzündungsantwort ein. Dabei sind Botenstoffe entscheidend, zu denen unter anderem die Gruppe der Cytokine gehört. Cytokine sind kleine Proteine, die von nahezu allen Zellen mit Zellkern synthetisiert und durch spezifische Rezeptoren auf diesen Zellen erkannt werden können (42). Die Cytokin-Expression kann als Reaktion auf verschiedenste Arten von Stress (Infektionen, Entzündungssignale, Stress durch Hitze oder Osmolarität usw.) erfolgen und ist ein bedeutender Signalgeber des Immunsystems (42). Zu den Cytokinen gehört auch die Familie der Interleukine, zum Beispiel die IL-1 Superfamilie. Zu dieser zählen elf verschiedene Interleukine (Tabelle 1.1), die nicht nur lokale und systemische Entzündungsreaktionen induzieren oder als spezifische Rezeptor-Antagonisten hemmen können, sondern wiederum auch Schutzmechanismen gegen überschießende Entzündungs- oder Immunreaktionen bilden (44, 45, 120, 135, 165).

Familiename	Name	Rezeptor	Eigenschaft
IL-1 F1	IL-1 α	IL-1RI	Agonist
IL-1 F2	IL-1 β	IL-1RI	Agonist
IL-1 F3	IL-1 Ra	IL-1RI	Antagonist für IL-1 α , β
IL-1 F4	IL-18	IL-18R α	Agonist
IL-1 F5	IL-36Ra	IL-1Rrp2	Antagonist für für IL-36 α , β , γ
IL-1 F6	IL-36 α	IL-1Rrp2	Agonist
IL-1 F7	IL-37	(?)IL-18R α	Anti-inflammatorisch
IL-1 F8	IL-36 β	IL-1Rrp2	Agonist
IL-1 F9	IL-36 γ	IL-1Rrp2	Agonist
IL-1 F10	IL-38	unbekannt	Anti-inflammatorisch
IL-1 F11	IL-33	ST2	Agonist

Tabelle 1.1 - Mitglieder der IL-1 Familie

Die 11 Mitglieder der Interleukin 1-Superfamilie und ihre Eigenschaften.

Die Bedeutung von Interleukin 1 für ein funktionierendes Immunsystem wird besonders deutlich, wenn die Regulation dieses Cytokins gestört ist. Hierbei kann die IL-1 Konzentration in Geweben oder Blut erhöht sein oder es liegt ein Defekt in der Herunterregulation von IL-1 vor. Dies führt bei den betroffenen Patienten zu lebensbedrohlichen Erkrankungen mit Immunschwächen und/oder systemischer Entzündung (152). So verursacht ein genetischer Defekt des IL-1 Rezeptor-Antagonisten zum Beispiel Hautentzündungen, massive epiphyseale Schwellungen von langen Knochen und andere Skelettveränderungen (152). Der Aufklärung der Aminosäuresequenz von IL-1 α und IL-1 β sowie der molekularen Klonierung der cDNAs vor etwa dreißig Jahren folgte eine kontinuierliche Weiterentwicklung auf diesem Feld der Cytokin-Forschung, in dessen Verlauf die Schlüsselrolle von Interleukin 1 in der Signalübertragung des Immunsystems immer mehr zum Tragen kam (135). IL-1 α und IL-1 β werden von zwei verschiedenen Genen (*IL1A* und *IL1B*) codiert und können an den gleichen Rezeptor (IL-1 Rezeptor Typ 1, IL-1RI) binden, den man auf der Oberfläche von nahezu jedem Zelltyp finden kann (46). Dabei handelt es sich um einen multimeren Rezeptor mit IL-1 RAcP („Interleukin-1 receptor accessory protein“) als zweiter Rezeptorkette, die für die Umsetzung des Signals in das Cytoplasma essentiell ist (172). Interleukin 1 setzt also letztlich eine Kaskade von verschiedenen Signalmolekülen in Gang und fungiert so als wichtigster Vermittler von lokaler und systemischer Entzündungsreaktion (46). Sowohl IL-1 α als auch IL-1 β werden als Vorläuferproteine im Körper synthetisiert. IL-1 α wirkt juxtamembranär und wird aus sterbenden Zellen freigesetzt, worin die vor allem lokale Wirkung begründet liegt (42, 46). IL-1 β dagegen gilt als Vermittler einer dominanten, systemischen Entzündungsreaktion, da es zur raschen Sekretion und Aktivierung des Inflammasoms kommt (42, 46). Außerhalb des Körpers in einer Zellkultur weisen beide Interleukine die gleiche Wirkung auf, da sie an den gleichen Rezeptor binden.

Die große Bedeutung von IL-1 bei der Koordination der Immunantwort rückte es auch bei der Behandlung verschiedener Erkrankungen in den Fokus, eine Entwicklung, die mit dem Einsatz des rekombinanten IL-1 Rezeptor-Antagonisten „Anakinra“ bereits 1993 begann (46). Nach der Zulassung von „Anakinra“ als Medikament (1999 in den USA, 2000 in Deutschland) hat sich die Blockade von Interleukin 1 in der Zwischenzeit als erfolgreiche Therapieoption bei verschiedensten Entzündungserkrankungen, wie zum Beispiel rheumatoider Arthritis oder der systemischen juvenilen idiopathischen Arthritis, herausgestellt (46). Dabei wird unter anderem auch auf einen IL-1 β Antikörper („Canakinumab“, seit 2009) oder lösliche Rezeptorkonstrukte („Rilonacept“, Zulassung ruht) zurückgegriffen, die IL-1 β binden und so blockieren (20, 43).

Neben solchen Immunerkrankungen existiert ein Zusammenhang zwischen Entzündungsvorgängen und der Entstehung von Krebs, sodass sich die Bedeutung von

Interleukin 1 und den damit verbundenen Signalwegen auch auf die Behandlung von onkogenen Erkrankungen weiter ausweiten könnte, eine Entwicklung, die zum Beispiel mit der Behandlung eines IL-6 abhängigen B-Zell Lymphoms bereits begonnen hat. Hier kann eine IL-1 Blockade und die damit verbundene Suppression des IL-1 Zielgens *IL-6* das Tumorwachstum bremsen (40).

Die hier beschriebene Schlüsselrolle von Interleukin 1 in der Entzündungsantwort macht dieses Cytokin zu einem interessanten Stimulus bei der Untersuchung der Mechanismen der nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort von Epithelzellen im Rahmen dieser Arbeit. Bislang sind die dabei zugrunde liegenden molekularen, nukleären Mechanismen nicht bekannt, während Stimuli wie LPS (Lipopolysaccharid) wesentlich häufiger im Fokus Chromatin-orientierter Studien standen (59, 65, 156, 158). Die zudem beobachtete starke Wirkung von IL-1 auf die Genexpression deutet auf massive Geschehnisse im Zellkern hin. Um die Übermittlung von Signalen vom IL-1 Rezeptor in den Zellkern zu verstehen, ist es wichtig, sich mit Befunden und davon abgeleiteten Prinzipien der zytoplasmatischen Signalvorgänge auseinanderzusetzen. Diese werden daher in dem nachfolgenden Kapitel beschrieben.

2.2 Der Interleukin 1 Signalweg und seine wichtigsten Komponenten

Interleukin 1 ist nach der Bindung an seinen Rezeptor an der Zelloberfläche in der Lage die Expression hunderter Gene zu verändern und dies in den verschiedensten Zelltypen (8, 68, 80). Dazu ist ein Netzwerk aus Multiproteinkomplexen notwendig, deren Bildung schnell, transient und reversibel erfolgt und sowohl Enzyme, als auch nicht-enzymatische Adapter-Proteine, beinhaltet (170).

Wenn IL-1 an seinen Rezeptor (IL-1 RI) bindet, induziert es am Rezeptor selbst eine Konformationsänderung in der ersten extrazellulären Domäne, was zur Rekrutierung des IL-1 Rezeptor akzessorischen Proteins (IL-1 RAcP) führt (26, 172). Durch die rasche Anlagerung der intrazellulären Proteine MYD88 („myeloid differentiation primary response gene 88“) und IRAK4 („interleukin-1 receptor-activated protein kinase 4“) entsteht ein erster wichtiger Multiproteinkomplex im IL-1 Signalweg (22). An IRAK4 kommt es zur Autophosphorylierung, was wiederum die Phosphorylierung von IRAK1 und IRAK2 zur Folge hat, die als Adapter und Kinasen bei der Signalweiterleitung fungieren und mit TRAF6 („tumor necrosis factor-associated factor 6“) vom initialen Rezeptorkomplex dissoziieren. Im sich anschließenden komplexen cytosolischen Signalweg spielen sogenannte nicht-degradative, über K63 Quervernetzungen vermittelte Protein-Ubiquitinierungen eine wichtige Rolle, an denen unter anderem TRAF6 beteiligt ist (170). Dazu gehört die Ubiquitinierung der Kinase TAK1 („TGF- β -activated protein kinase 1“) an Lysin 209 und deren Assoziation mit MEKK3 (MAP3K3, „mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3“) sowie mit TRAF6 (73, 149, 184). Diese Proteinkomplexe sind schließlich an der Aktivierung mehrerer

Signalkaskaden im IL-1 Signalweg beteiligt, zu denen die NF- κ B („nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“)-, JNK („c-Jun N-terminal kinase“)- und p38 MAPK („P38 mitogen-activated protein kinases“)-Wege gehören (170).

Ein wichtiger Prozess im cytosolischen IL-1 Signalweg ist die Aktivierung des sogenannten kanonischen NF- κ B Weges. Der Schlüsselschritt der Aktivierung ist die proteasomale Zerstörung des I κ B α Proteins, welches die p65 NF- κ B Untereinheit im Zytosol verankert. Der proteasomale I κ B α Abbau erfolgt, nachdem der IKK („inhibitor of nuclear factorB kinase“)-Komplex I κ B α an S32 und S36 phosphoryliert hat (185). Das aktivierte NF- κ B Dimer mit seinen möglichen Untereinheiten p50 und p65 ist nun frei und transloziert in den Zellkern, wo es in der Lage ist, selbst an Zielgene zu binden und deren Transkription zu beeinflussen. In diesem Schritt erfolgt also die direkte Weiterleitung des IL-1 Signals aus dem Cytoplasma in den Zellkern. Die Untereinheit p50 wird dabei aus Spaltung des Vorläuferproteins p105 freigesetzt, was einer Aktivierung des nicht-kanonischen NF- κ B Wegs bedarf, der in den in unseren Studien verwendeten Epithelzellen vermutlich eine ausreichende basale Aktivität besitzt.

Der IL-1 Signalweg besteht aus mehreren derartigen Signalkaskaden, die aber nicht getrennt voneinander operieren, sondern sich gegenseitig im Sinne eines Netzwerks modulieren (170, Abb.2.1). Neben NF- κ B nehmen auch andere aktive Proteine Einfluss auf die Vorgänge im Nukleus. So phosphoryliert zum Beispiel JNK verschiedene AP-1 („activator protein 1“) Proteine wie die Transkriptionsfaktoren c-Jun oder ATF-2 („activating transcription factor 2“), die dann auch eine Wirkung auf die Transkription der Zielgene haben können (32). Der IL-1 Signalweg beeinflusst aber nicht nur die Transkription von Zielgenen, er greift auch auf der Regulationsebene der mRNA-Stabilisierung und –Degradation ein und kann so die Synthese von Zielproteinen steuern (62, 70). Durch komplizierte „feedback“ und „feed-forward“ Regelkreise erfolgt außerdem eine Selbstkontrolle des IL-1 Signalweges über die Synthese, Aktivierung oder Hemmung eigener Komponenten (152), was letztlich auch das Abschalten des Signalweges herbeiführt. Betrachtet man Darstellungen des komplexen Netzwerks aus Komponenten des IL-1 Signalweges (Abb.2.1), so können diese meist nur einen Bruchteil der Vorgänge aufgreifen. Dennoch wird deutlich, dass der cytosolische Wegabschnitt dieses für die Entzündungsantwort und das Immunsystem so entscheidenden Signalweges bereits Gegenstand intensiver Forschung war und immer noch ist, während die Vorgänge im Nukleus und an den Zielgenen selbst erst in Anfängen aufgeklärt werden konnten.

2.2.1 Der Schlüsselproteinkomplex NF- κ B

Die Aktivierung von NF- κ B stellt einen wichtigen Schritt innerhalb des IL-1 Signalweges dar, weswegen noch einmal genauer auf die beteiligten Proteinkomplexe und regulatorischen Schritte eingegangen werden soll. Sowohl die Funktion als auch die Struktur von NF- κ B ist

zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert (151).

Der NF- κ B Komplex kann sich aus verschiedenen Untereinheiten (Homo- oder Heterodimeren) zusammensetzen, zu denen RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 und p52 gehören, wobei p50 und p52 aus den Vorläuferformen p105 und p100 entstehen (151). Die DNA-Bindung der NF- κ B Proteine erfolgt über die sogenannte RHD („Rel homology domain“) am N-Terminus, während die Transkription der Gene über Transaktivierungsdomänen (TAD) am C-Terminus beeinflusst werden kann (151, 150). Dabei kann es nicht nur zu einer Transkriptionsaktivierung kommen, sondern p50 und p52 können zum Beispiel auch inhibitorisch auf die Genexpression wirken (151). Die Wirkung der NF- κ B Bindung an einen Genpromotor hängt aber nicht nur von der Zusammensetzung des Komplexes ab, sondern wird außerdem durch die vorliegende Chromatinstruktur, die assoziierten Histonmodifikationen und durch das Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren und posttranslationalen Modifikationen an den NF- κ B Untereinheiten hervorgerufen (151, 132). Alle NF- κ B Dimere sind in der Lage direkt an DNA zu binden und zwar an eine Familie von DNA-Bindestellen mit einer Länge von neun bis elf Basenpaaren (112). Diese κ B-Motive sind stark degeneriert und werden als „G₋₅G₋₄G₋₃R₋₂N₋₁N₀Y₊₁Y₊₂C₊₃C₊₄“, beschrieben wobei „R“ für ein Purin, „N“ für ein beliebiges Nukleotid und „Y“ für ein Pyrimidin steht (Numerierung reflektiert das Zentrum der Struktur). Zusätzlich sind auch abweichende DNA-Bindestellen mit hoher Affinität zu NF- κ B bekannt, was insgesamt zu einer extrem hohen Anzahl möglicher NF- κ B-Bindestellen im Genom führt (112). Dies bedeutet wiederum, dass die tatsächlich vorliegenden NF- κ B-Bindungsmuster an die DNA im Genom extrem variabel sind und folglich hoch reguliert sein müssen.

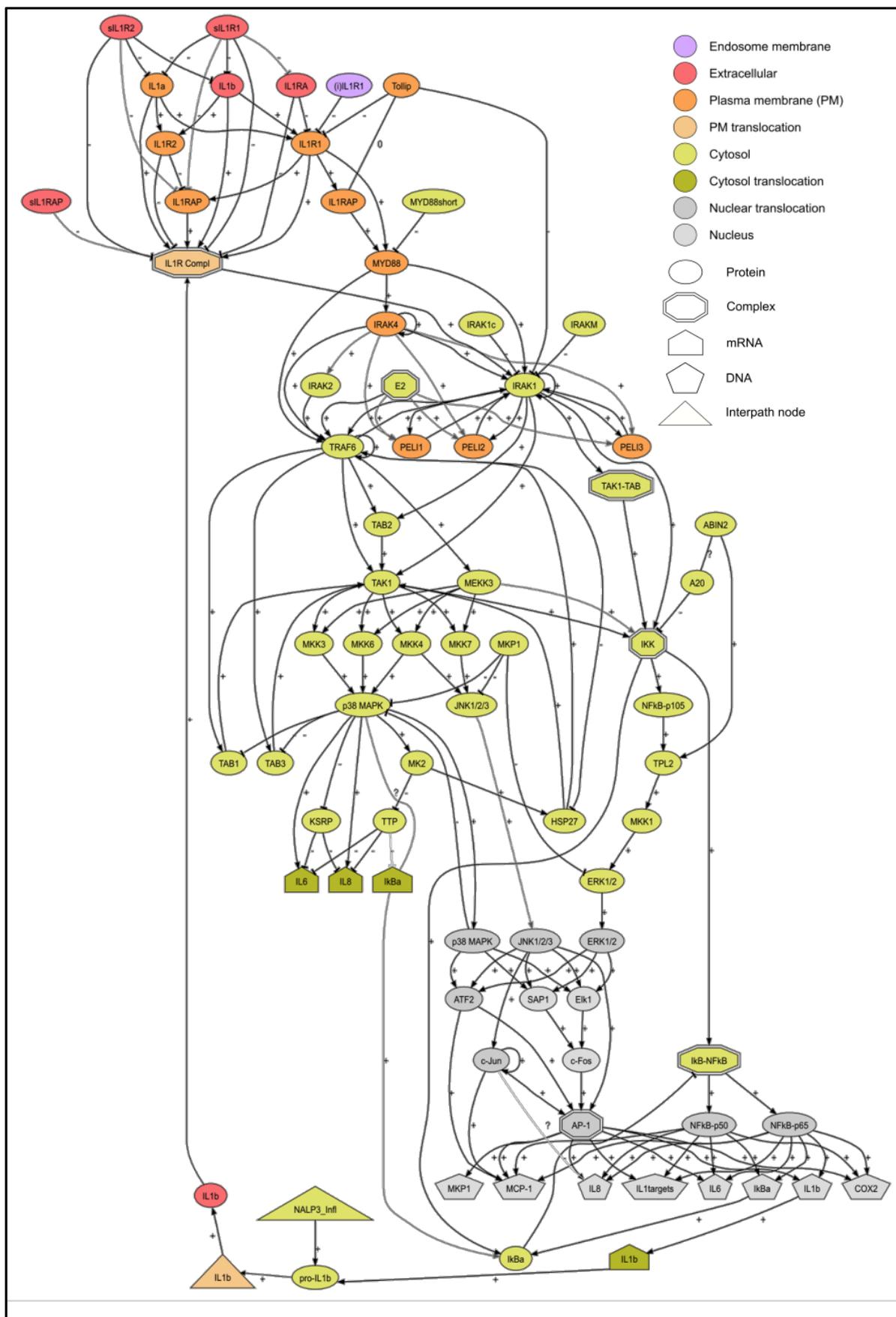


Abb. 2.1 (170): Übersicht über den IL-1 Signalweg

Das kanonische IL-1 Signal-Netzwerk unter Berücksichtigung von 86 Molekülen, 186 Reaktionen und 469 Publikationen (http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/stkecm;CMP_21286). Der in grau kolorierte Teil zeigt IL-1 regulierte Transkriptionsfaktoren und wichtige Zielgene.

Zu den möglichen posttranslationalen Modifikationen an NF- κ B p65 gehören Phosphorylierung, Monomethylierung, Ubiquitinierung, aber auch Acetylierung (127, 175). Am Beispiel der Acetylierung lässt sich sehr gut die Komplexität der Regulationsebene der posttranslationalen Modifikationen von NF- κ B p65 verdeutlichen. Diese kann an verschiedenen Lysinen von p65 auftreten und völlig unterschiedliche Auswirkungen haben. So konnte zum Beispiel für eine Acetylierung der Lysine 122 und 123 eine inhibitorische Wirkung gezeigt werden (85), während diese an Lysin 310 zum gegenteiligen Effekt führt (29, 30). Die Acetylierung von p65 erfolgt durch Histonacetyltransferasen (HATs) wie CBP/p300 („CREB-binding protein“), also Enzymen, die man typischerweise mit der Beeinflussung des Histonstatus der DNA in Verbindung bringt (56, 189). Dies gilt auch für die an der Deacetylierung beteiligten Histondeacetylasen (HDACs), die in diesem Zusammenhang dann als Aktivatoren auftreten können, obwohl sie typischerweise als Transkriptionsrepressoren bekannt sind (5, 190). NF- κ B p65 ist also nicht nur ein wichtiges Protein im IL-1 Signalweg bei der Übertragung des Signals vom Cytosol in den Kern, sondern ein extrem vielfältiger und komplex regulierter Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle bei den Mechanismen der nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort spielen kann.

2.2.2 Die MAPK Kinase Kinase TAK1

Ursprünglich wurde TAK1 als eine MAP3K („mitogen-activated kinase kinase kinase“) identifiziert, die durch TGF- β („transforming growth factor- β “) aktiviert wird (183). Mittlerweile ist klar, dass TAK1 eine Schlüsselrolle im IL-1 Signalweg, aber auch in Signalwegen von LPS, TNF und anderen Botenstoffen, einnimmt (148).

Für die Aktivität von TAK1 ist die Assoziation mit den Koaktivator-Proteinen TAB1 („TAK1-binding protein 1“) und TAB2 oder TAB3 erforderlich, die über die N-terminale Kinase Domäne sowie die C-terminale Region von TAK1 erfolgt (154, 163). Der TAK1/TAB Komplex ist in der Lage, mit dem Adapter-Protein TRAF6 des IL-1 Rezeptor-Komplexes IL-1 abhängig zu assoziieren (117) und gilt als aktivierende Kinase für den IKK-Komplex (147), womit TAK1 den NF- κ B Weg im IL-1 Signalweg beeinflusst.

In der starken IL-1 abhängigen Genregulation spielen aber auch der JNK- und der p38 MAPK-Weg eine Rolle und es konnte gezeigt werden, dass der TAK1/TAB Komplex auch wichtig ist um diese beiden Wege zu aktivieren. Hierbei wird nicht nur Einfluss auf die Transkription eines Zielgens ausgeübt, sondern auch die mRNA-Stabilisierung reguliert. Die MAP3K TAK1 koppelt also alle drei Signalkaskaden an den IL-1 Rezeptor und kann so auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene wirken (71). Aufgrund dieser wichtigen Funktion apikal im IL-1 Signalweg ist TAK1 selbst vielfältig reguliert, zum Beispiel durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Ubiquitinierung und Interaktion mit anderen Proteinen. Dies trifft auch auf TAB1, die regulatorische Untereinheit des

TAK1/TAB Komplexes, zu, die ebenfalls posttranslational modifiziert werden kann (176). Durch diese zentrale und koordinierende Funktion im IL-1 Signalweg ist TAK1 natürlich auch ein interessantes Ziel bei der Behandlung von inflammatorischen Erkrankungen. So konnte gezeigt werden, dass zellpermeable TAK1-Inhibitoren wie die Substanz 5(Z)-7-Oxozeaenol, welche kovalent an C174 der ATP-Bindungsstelle von TAK1 bindet und so vermutlich irreversibel die katalytische Aktivität von TAK1 hemmt, Entzündungsvorgänge supprimieren kann (Abb. 2.2, 118, 178). Solche Substanzen erlauben somit auch die Untersuchung der TAK1 Abhängigkeit anderer Vorgänge im IL-1 Signalweg, zum Beispiel auf der Ebene des Chromatins und der Genregulation.

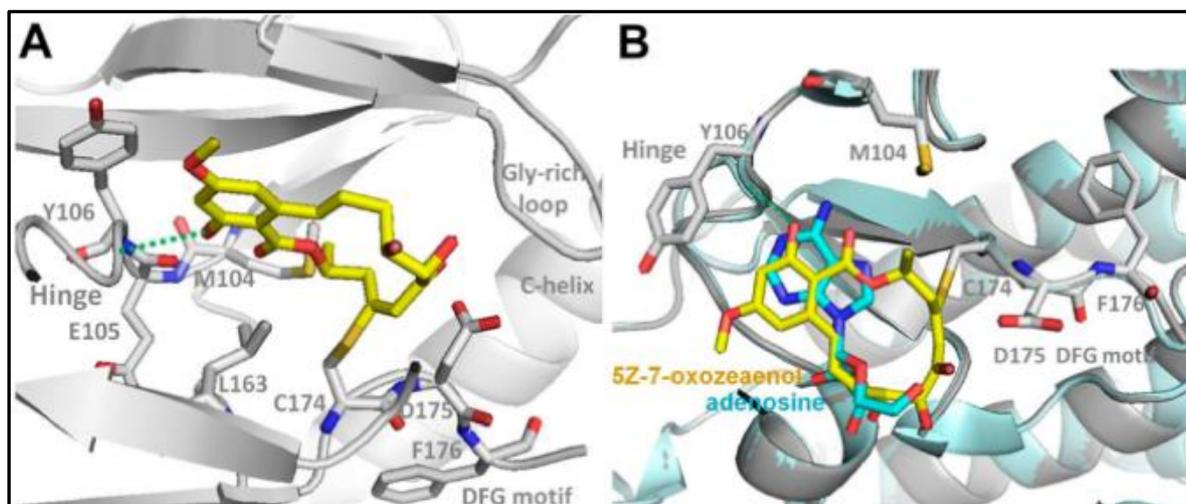


Abb. 2.2: Kristallstruktur von 5(Z)-7-Oxozeaenol gebunden an die ATP-Bindungsstelle von TAK1-TAB1

Die dargestellte Kristallstruktur wurde mittels eines TAK1-TAB1 Fusionsproteins gewonnen, welches hochaktiv ist.

(A) Die Reaktion von *cis*-Enon mit Thiolat von Cys174 führt zu einer kovalenten, irreversiblen Bindung. Die Wasserstoffbrückenbindung für die bindungsrelevante Aminosäure aus der ATP-Bindungsstelle von TAK1 ist als grüne, unterbrochene Linie, 5(Z)-7-Oxozeaenol in gelb und TAK1 in grau dargestellt.

(B) Vergleich der Struktur bei Bindung von Adenosin (cyan und hellblau) und 5(Z)-7-Oxozeaenol (gelb und grau) mit TAK1-TAB1. Beide Strukturen überlappen deutlich und zeigen nur minimale Konformationsänderungen (Abbildung aus 178, freie Lizenz „ACS Publications“).

2.2.3 Chemokine: Typische Zielgene

Der IL-1 Signalweg führt letztlich zu einer massiven, aber transienten Regulation von 50-250 Genen in der Zelle, bei der die meisten Zielgene aktiviert und wenige auch in ihrer Expression gehemmt werden (81, 64, 190). Zu den stark induzierten Genen gehören unter anderem auch verschiedene Chemokin-Gene (81, 64, 190). Chemokine sind kleine, kompakte Cytokine mit einer Größe von 8-10kDa, die sehr unterschiedliche Rollen im Immunsystem, aber auch in homöostatischen Prozessen spielen können (6, 98, 160). Sie werden von verschiedenen Zelltypen sezerniert und fungieren dann als wichtige Botenstoffe

im Körper, indem sie an Chemokin-Rezeptoren (Sieben-Transmembran-Domäne G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) an der Oberfläche von beispielsweise Leukozyten oder Endothelzellen binden. Auf diese Weise steuern sie insbesondere die Chemotaxis (Beeinflussung der Fortbewegungsrichtung durch einen Stoffkonzentrationsgradienten) von Immunzellen, um diese an Infektions- und Entzündungsorte im Körper zu lenken (111, 136, 191).

Chemokine werden anhand ihres Cystein-Motivs am Aminoende klassifiziert und in vier verschiedene Unterfamilien eingeteilt, die als CXC-, CC-, CX3C- und C-Familie bezeichnet werden (192). Gene, die für strukturell nah verwandte Chemokine codieren, finden sich häufig im Genom in räumlicher Nähe zueinander, was unter anderem auch auf die Entstehung der Genvarianten durch Genduplikationen und Mutationen hindeutet (Abb.2.3). Solche Gruppen von Genen mit ähnlichen Genprodukten und Regulation nennt man Gencluster, wobei die größten Chemokingen-Cluster anhand ihrer Lage auf dem Chromosom 4 als centromerischer und telomerischer Subcluster bezeichnet werden (34). Im centromerischen Subcluster findet man vor allem die ELR (Glutamin-Leucin-Arginin-Motiv)-positiven CXC Chemokine wie *CXCL1* oder *CXCL8 (IL8)*, die zu typischen Zielgenen des IL-1 Signalwegs gehören und eine wichtige Rolle bei der Chemotaxis von Neutrophilen im Immunsystem spielen (18, 34). Neben ihrer biologischen Bedeutung für den fundamentalen Prozess der Leukozyteninfiltration in ein entzündetes Gewebe (Abb. 2.4, 46, 123) sind die großen, synchron und stark regulierten Chemokingen-Cluster zur exemplarischen Untersuchung genomweiter Regulationsvorgänge auf nukleärer Ebene im IL-1 Signalweg besonders interessant.

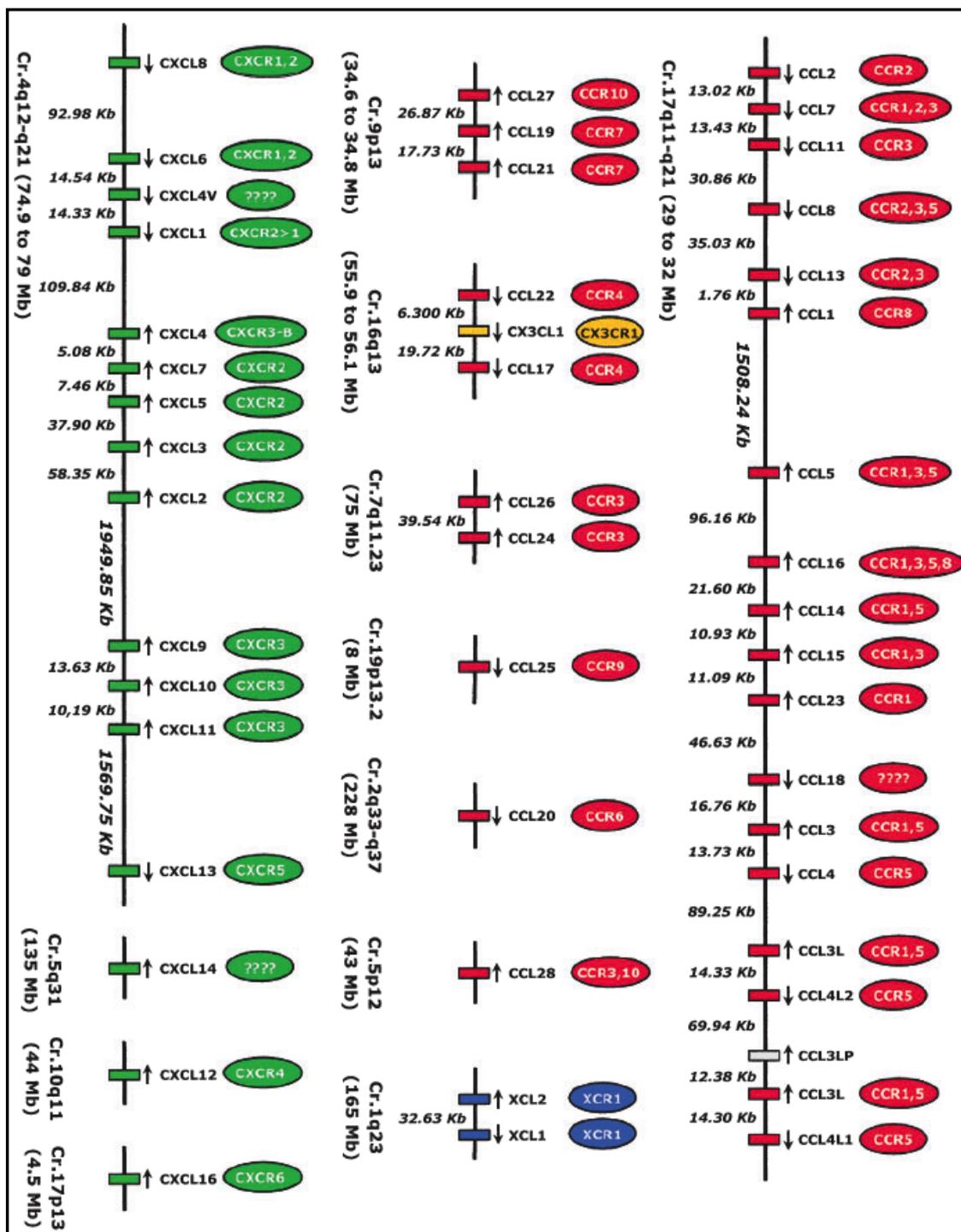


Abb. 2.3: Anordnung der Chemokingene im menschlichen Genom

Die verschiedenen Chemokin-Unterfamilien, wie die CX-C (grün), CC- (rot), CX3C- (gelb) und C- (blau) Familie, liegen im Genom häufig in verschiedenen Genclustern vor. Der Abstand der Gene untereinander ist in Kilobasen angegeben, die chromosomale Lokalisation als Abstand vom Beginn des Chromosoms in Megabasen. Die Pfeile weisen auf die Orientierung des jeweiligen Gens hin, auch der zugehörige Rezeptor des Genprodukts ist angegeben (Abbildung aus 34, Lizenznummer 3541301264319).

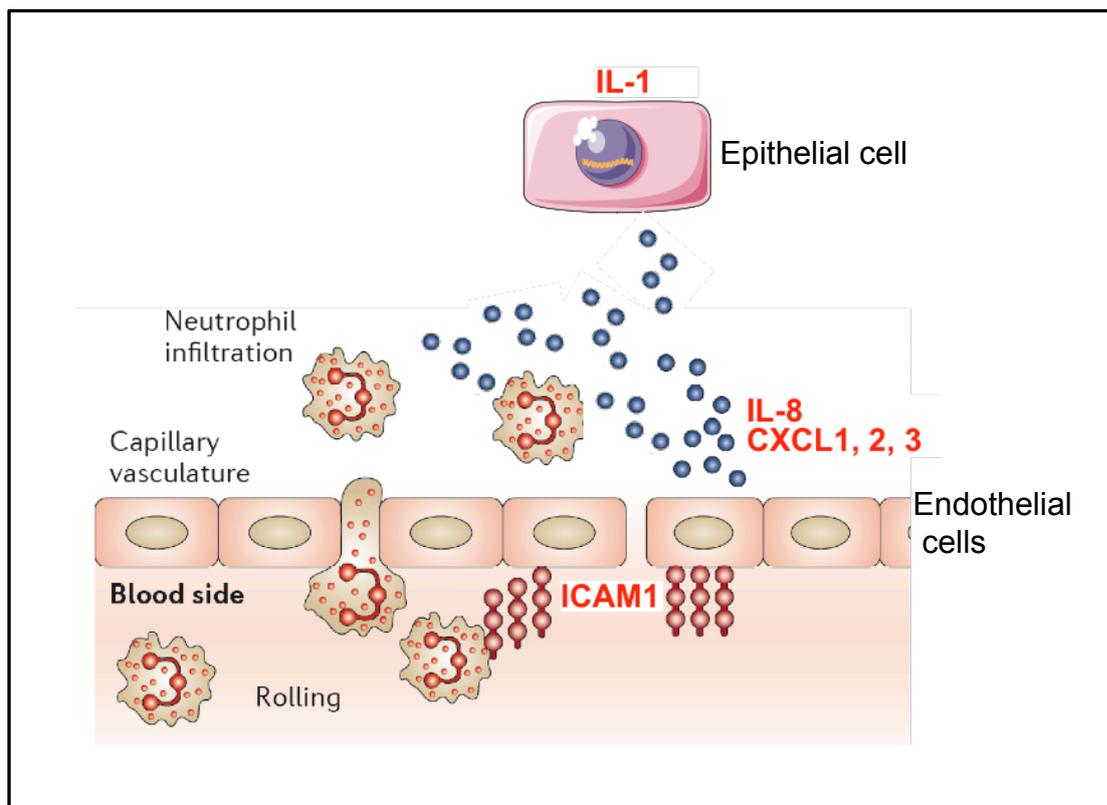


Abb.2.4 (46, modifiziert): Übersicht zum IL-1/IL-8 regulierten Leukozyten-Infiltrationsweges

Epithelzellen an einem Entzündungsherd/einer Schädigung reagieren auf einen entsprechenden Stimulus (hier: IL-1) mit der Ausschüttung weiterer Chemokine wie IL-8, CXCL1, 2 und 3, die sowohl auf die Zellen der Gefäßwand als auch auf die Leukozyten selbst einwirken. Die in Blutgefäßen zirkulierenden Leukozyten werden durch Vasodilatation, Expression von Adhäsionsmolekülen und Öffnung der interendothelialen Verbindungen zur Infiltration in das Gewebe angeregt. Der wichtigste Adhäsionsweg benötigt dabei die Expression des Membran-Glykoproteins ICAM1, das mit den Leukozyten interagiert (48). Die lokal sezernierte Menge an Chemokinen determiniert danach das Ausmaß der Leukozyteninfiltration.

2.3 Chromatinstruktur und Histonmodifikationen sind entscheidende Komponenten der Genregulation

Unter Chromatin versteht man die DNA und die Gesamtheit der mit ihr assoziierten Proteine. Innerhalb der durch die Kernmembran festgelegten maximalen Begrenzung kann die Struktur des Chromatins stark variieren und nimmt dabei entscheidenden Einfluss auf Regulationsmechanismen wie Genexpression oder Reparaturvorgänge. Die Grundeinheit des Chromatins ist das Nukleosom, das aus einem Oktamer aus den vier Kern-Histonen (H3, H4, H2A, H2B) und 147 Basenpaaren an DNA besteht, die ca. 1.5-mal um die Histone herum gewickelt sind (103, Abb. 2.5). Sowohl die DNA selbst kann modifiziert werden, zum Beispiel durch DNA-Methylierung, als auch die Histon-Proteine, bei denen vor allem die

basischen N-terminalen Enden Ziel von ca. 50 verschiedenen posttranslationalen Modifikationen sein können (90, 9). Solche Modifikationen können stabil, aber auch sehr dynamisch sein. Potentiell stabile, vererbare Veränderungen der Genexpression oder des zellulären Phänotyps, die ohne Veränderungen der Watson-Crick-Basenpaarungen der DNA auftreten, bezeichnet man auch als Epigenetik (60).

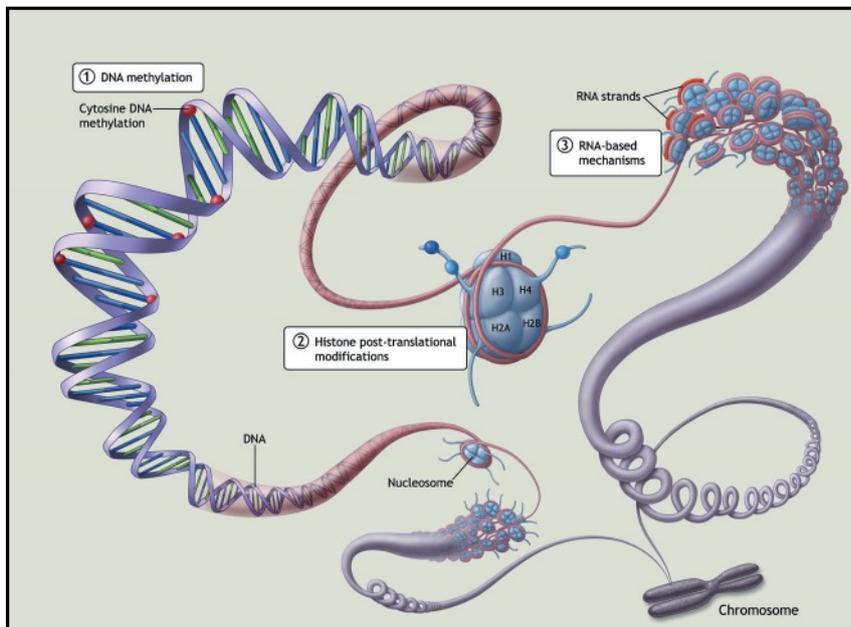


Abb. 2.5: Aufbau, Strukturen und Regulation des Chromatins

Die Abbildung zeigt eine Übersicht zur Struktur des Chromatins mit Nucleosomen, Histonen sowie DNA-Aufbau. Zu den epigenetischen Mechanismen der Genregulation gehören DNA-Methylierung, posttranslationalen Modifikationen an Histonen (die auch zur Nucleosomenstruktur beitragen) und RNA-basierte Mechanismen, bei denen sich RNA-Stränge an das Chromatin anlagern können (Abbildung aus 103, Lizenznummer 3541310042277).

Histonmodifikationen beeinflussen inter-nucleosomale Interaktionen und können so die Gesamtstruktur des Chromatins verändern, d.h. insbesondere die Nucleosomendichte variieren. Doch die Modifikationen haben nicht nur Auswirkungen aufgrund ihrer bloßen chemischen Eigenschaften und Wechselwirkungen, sondern führen auch zur Rekrutierung von Proteinen und Komplexen mit bestimmten enzymatischen Fähigkeiten (9). Hierbei unterscheidet man „Writer“, „Reader“ und „Eraser“ (76). „Writer“ sind in der Lage selbst Histone zu modifizieren (z.B. HATs), während „Eraser“ solche Modifikationen wieder entfernen können (z.B. HDACs). Ein „Reader“-Protein wird in seinem Verhalten und seiner Bindungsaffinität durch einen bestimmten Histonstatus beeinflusst, kann diesen also „registrieren“ (76). Letztendlich können an Histonen acht verschiedene mögliche Modifikationsklassen beobachtet werden (90, Tabelle 2), wobei nicht alle Modifikationen an dem selben Histon und zur gleichen Zeit auftreten, sondern eine komplexe Kombinatorik beobachtet wird.

Modifikation	Modifizierter Rest	Regulierte Funktionen
Acetylierung	K-ac	Transkription, Reparatur, Replikation, Kondensation
Methylierung (Lysine)	K-me1 K-me2 K-me3	Transkription, Reparatur
Methylierung (Arginine)	R-me1 R-me2a R-me2s	Transkription
Phosphorylierung	S-ph T-ph	Transkription, Reparatur, Kondensation
Ubiquitilierung	K-ub	Transkription, Reparatur
Sumoylierung	K-su	Transkription
ADP Ribosylierung	E-ar	Transkription
Deiminierung	R > Cit	Transkription
Prolin Isomerisierung	P-cis > P-trans	Transkription

Tabelle 2: Verschiedene Klassen von Histonmodifikationen

Es konnten acht verschiedene posttranslationale Modifikationsklassen an Histon-Proteinen beobachtet werden, wobei diese Zahl je nach Aufschlüsselung variieren kann (ac: Acetylierung, me: Methylierung, ph: Phosphorylierung, ub: Ubiquitilierung, su: Sumoylierung, ar: Arylrest, Cit: Citrullinierung). Tabelle aus 90, Lizenznummer 3541310336940.

Zu den frühesten beschriebenen Histonmodifikationen gehört die Acetylierung, die als hochdynamisch gilt und von den entgegengesetzt wirkenden Enzymgruppen

Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) reguliert wird (67, 182).

HATs nutzen Acetyl-CoA als Kofaktor und katalysieren so den Transfer einer Acetylgruppe, wobei sie dadurch die positive Ladung des Lysins am Histon neutralisieren und die Interaktion von DNA und Histonen abschwächen können (67). Die damit verbundene

Öffnung der Chromatinstruktur erklärt die häufige Rolle von HATs, wie zum Beispiel von

Proteinen der CBP/p300 Familie, als Koaktivatoren der Genexpression, während HDACs häufig die Funktion von Korepressoren einnehmen (182). Die posttranslationale Modifikation

der Histonacetylierung tritt also meist an aktiven Chromatinregionen auf, unter anderem im

Promotorbereich von transkribierten Genen. Die Histon-Phosphorylierung spielt zum Beispiel bei der Mitose eine wichtige Rolle und wird durch Kinasen und Phosphatasen kontrolliert

(123). Der Transfer der Phosphatgruppe erfolgt durch Proteinkinasen, indem ATP gespalten und ein Phosphatrest übertragen wird. Die negativ geladene Hydroxylgruppe verändert so ebenfalls die Ladungseigenschaften des Histons (123).

Eine solche Ladungsveränderung wird durch die ebenso zu den wichtigsten

Histonmodifikationen gehörende Methylierung, welche an den Seitenketten von Lysinen und

Argininen auftritt, dagegen nicht hervorgerufen. Histonmethylierung kann in verschiedenen

Varianten auftreten: Lysine können mono-, di- oder trimethyliert werden, Arginine können

symmetrisch oder asymmetrisch mono- oder dimethyliert werden (11, 92, 114). Nach ihrem

Substrat werden auch die Histonmethyltransferasen, die diese posttranslationale Modifikation katalysieren, in Lysin- (HKMT) und Arginin- (PRMT) Methyltransferasen unterschieden. Der enzymatischen Aktivität fast aller Lysin-Methyltransferasen liegt eine sogenannte SET-Domäne zugrunde und diese Enzyme sind in ihrer Aktivität äußerst spezifisch und methylieren nur bestimmte Lysine zu einem bestimmten Grad (142, 179, 186). Arginin-Methyltransferasen lassen sich in zwei Gruppen (Typ I- und Typ II-Enzyme) einteilen, wobei alle PRMTs eine Methylgruppe von SAM (S-Adenosylmethionin) zur ω -Guanidingruppe von Arginin transferieren (11, 177). Wie auch bei allen anderen Histonmodifikationen wird der Grad der Methylierung durch das Gleichgewicht entgegengesetzt wirkender Enzyme bestimmt. So sind heute viele verschiedene Histon-Demethylasen bekannt, die, wie auch die Histon-Methyltransferasen, eine hohe Substrat-Spezifität aufweisen, eine Sensitivität gegenüber dem Methylierungsgrad besitzen und außerdem auf Proteinebene reguliert werden können (107). Neben den hier genauer beschriebenen Histonmodifikationen gibt es viele weitere (Tabelle 2) und die Liste nachgewiesener posttranslatinaler Modifikationen an Histonen wächst beständig weiter. Die Komplexität ihrer Auswirkungen ist erst in Anfängen untersucht und verstanden. Fest steht allerdings bereits, dass Histonmodifikationen einen entscheidenden Beitrag zur Chromatin-Struktur leisten und über unterschiedlichste Wechselwirkungen direkten und indirekten Einfluss auf die Regulation der Genexpression nehmen können (9).

Doch solche Modifikationen treten nicht nur an Histonen auf, auch die DNA selbst kann modifiziert werden. Die DNA-Methylierung gehört zu den wichtigsten epigenetischen Modifikationen im Genom höherer Eukaryoten, etwa 60-90% der „CpG Dinukleotide“ (CpG steht für „-Cytosin-Phosphat-Guanin-,“) sind modifiziert (15). Eine Ausnahme dazu bilden besonders „CpG“-reiche Regionen, die auch „CpG islands“ genannt werden und vor allem im Bereich von Genpromotoren auftreten. Die DNA-Methylierung ist meist mit einem repressiven Chromatin-Zustand assoziiert und spielt eine wichtige Rolle in Entwicklungsprozessen, allgemeiner Genregulation, X-Chromosom-Inaktivierung, Supprimierung von repetitiven Genom-Bereichen oder auch in der Karzinogenese (16). Die Etablierung dieser Modifikation erfolgt durch sogenannte DNA-Methyltransferasen, wobei nur DNMT3a und DNMT3b zu den „de novo“-Methyltransferasen gehören und zuvor unmethylierte „CpG Dinukleotide“ modifizieren können, während DNMT1 vor allem das bereits bestehende DNA-Methylierungsmuster bei der Replikation auf den neu synthetisierten Strang überträgt (77). DNA-Methylierung gilt als stabile epigenetische Modifikation und obwohl für einige Enzyme eine Demethylierungsaktivität gezeigt werden konnte, bleibt deren globale Bedeutung noch offen (21). Der Entstehung der hypomethylierten „CpG islands“ könnte aber nicht nur aktive Demethylierung, sondern auch direkte oder indirekte DNMT-Inhibierung, zum Beispiel durch sterische Blockierung,

zugrunde liegen (74, Abb. 2.6). Diese hypomethylierten Bereiche fungieren vermutlich als Markierungen für Transkription im Genom, als „Landelichter“ für Transkriptionsfaktoren in der „Dunkelheit des Nukleus“ (74). Damit sind auch sie wichtige Faktoren der Genregulation, wenn auch deutlich weniger dynamisch als Histonmodifikationen, und so ist die DNA-Methylierung maßgeblich am Expressionsmuster in verschiedenen Zellen beteiligt. Die Chromatin-Struktur, bestimmt durch Histonmodifikationen, Nukleosomen-Dichte, DNA-Methylierung und mit diesen epigenetischen Markierungen assoziierten Proteinen, ist untrennbar mit jeder Form von Genregulation verbunden und steht deshalb auch bei den Untersuchungen zu entzündungsabhängigen Regulationsvorgängen im Fokus.

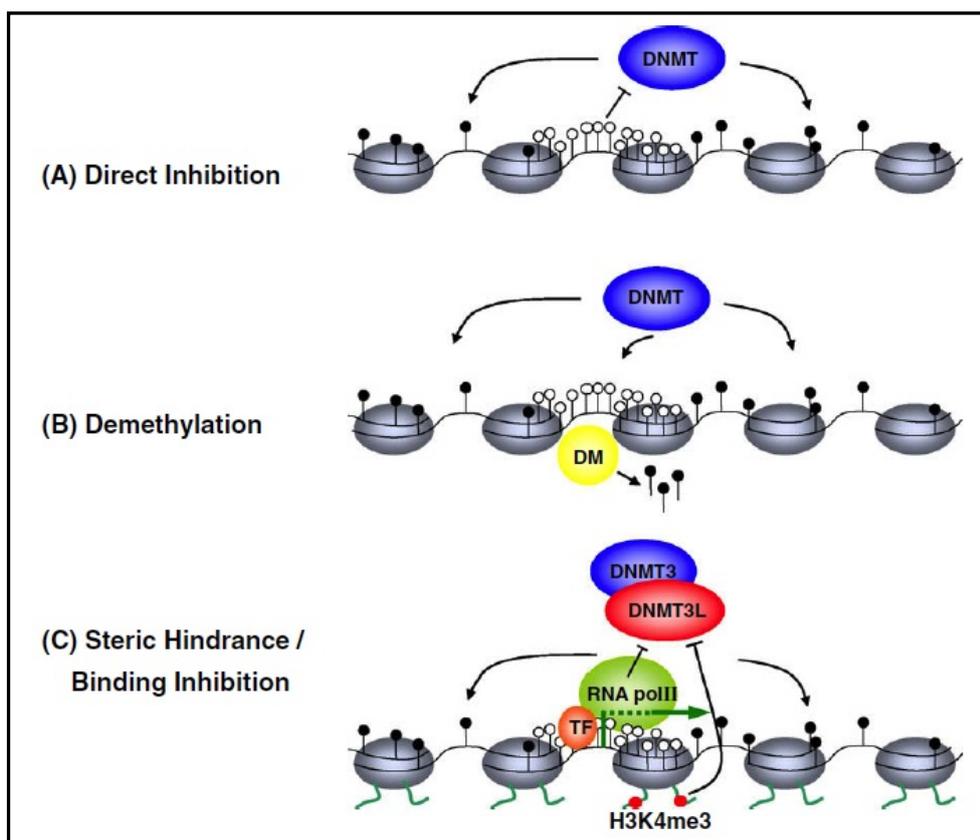


Abb. 2.6: Mögliche Ursachen der „CpG island“ Hypomethylierung

A) Sequenzspezifische direkte Inhibierung der Bindung von DNA-Methyltransferasen. **B)** Aktive Demethylierung von bereits methylierten „CpG islands“. **C)** Die Transkriptionsmaschinerie und die vorliegende Histonmodifikation verhindern die Bindung von DNA-Methyltransferasen. Abbildung aus 74, Lizenznummer 3541310807337.

2.4 Regulatorische Elemente im Genom

Im menschlichen Genom wurden bislang etwa 20.000-25.000 proteincodierende Gene identifiziert, deren Expression je nach Zelldifferenzierung und Entwicklungsvorgängen, aber auch präzise signalabhängig, reguliert sein kann (35, 102). Dieses genaue Zusammenspiel unterliegt verschiedensten Regulationsvorgängen auf unterschiedlichen Ebenen, von denen viele nicht nur an den Promotoren der Gene selbst, sondern an regulatorischen Elementen

im Genom ihren Ursprung haben.

Ein wichtiger Schritt in der Genregulation besteht in der Transkriptionsinitiation, die vor allem durch zwei Familien von regulatorischen DNA-Elementen beeinflusst wird, zu denen der Promotor, bestehend aus Kernpromotor und proximalen regulatorischen Elementen, sowie distale regulatorische Elemente wie Enhancer, Silencer, Insulatoren oder Locus-Kontrollregionen gehören (102, Abb. 2.7). Dieser komplexe und genspezifische Aufbau an Regulationselementen ist notwendig, um die extrem große Zahl an verschiedensten Expressionsmustern im Zusammenspiel mit etwa 1850 bekannten DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren ermöglichen zu können (166). Die Kombination multipler Regulationselemente mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren, die wiederum selbst in Expression und Bindungsverhalten, sowie auf epigenetischer Ebene, reguliert sein können, eröffnet ein noch nicht annähernd komplett kartiertes Repertoire an möglichen Expressionssituationen im menschlichen Genom.

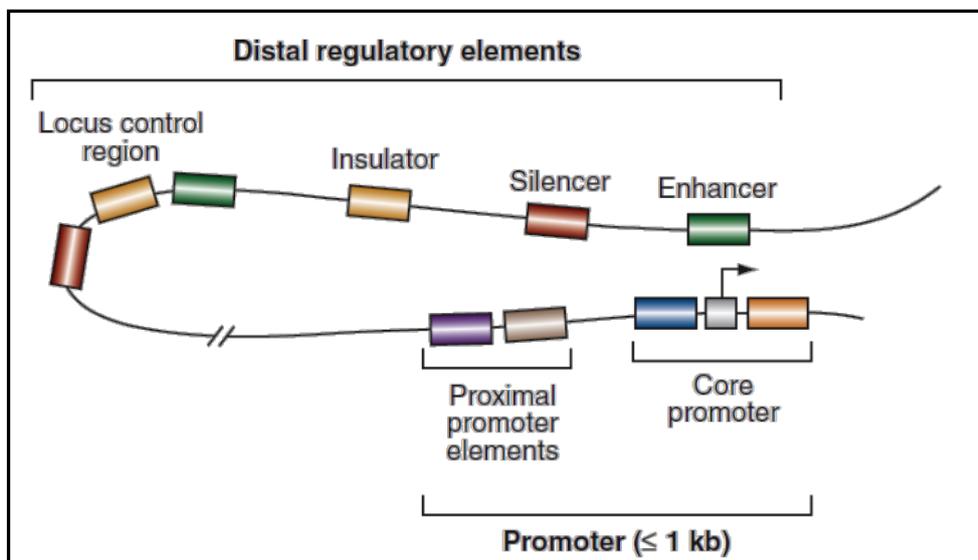


Abb. 2.7: Möglicher Aufbau einer genregulatorischen Region

Der eigentliche Genpromotor mit Kernpromotor und proximalen Elementen umfasst meist etwa 1kb, während die distalen regulatorischen Elemente deutlich weiter entfernt liegen und zum Beispiel durch den Aufbau dreidimensionaler DNA-Strukturen („DNA-Looping“) Kontakt zum Promotor aufbauen können. Dazu gehören die transkriptionsverstärkenden Enhancer, die umgekehrt wirkenden Silencer (setzen die Transkriptionsaktivität herab) und Insulatoren, die Gene von Regulationselementen abschirmen können. In einer Locuskontrollregion (LCR) können mehrere Regulationselemente, die eine Gengruppe beeinflussen, weit von dieser entfernt zusammengefasst liegen. Abbildung aus 102, freie Lizenz „Annual Reviews“.

Der Kernpromotor eines Gens enthält die Bindestelle für den Präinitiationskomplex und nachfolgend für die gesamte Transkriptionsmaschinerie, legt also sowohl den Transkriptionsstart als auch die –richtung fest (157). Die Transkription selbst erfolgt durch die RNA-Polymerase II, die bei der Anlagerung an den Transkriptionsstart zunächst an Serin 5 phosphoryliert wird. Gegen Ende der Transkription erhöht sich zusätzlich die

Phosphorylierung an Serin 2, bevor es zum Transkriptionsstopp und dem Ablösen der Polymerase kommt (95). Weitere Transkriptionsfaktoren, häufig Aktivatoren, können im proximalen Promotorbereich binden, der sich in direkter Nähe des Kernpromotors befindet und oft auch die bereits beschriebenen „CpG-islands“ beheimatet (102, 75).

Zu den wichtigsten distalen regulatorischen Elementen im Genom gehören die sogenannten Enhancer, die unabhängig von ihrer Entfernung und Orientierung zum Promotor die Transkription eines Gens verstärken können (19). Sie ähneln in ihrer Funktion und auch in der Zusammensetzung der bindenden Faktoren proximalen Promotorelementen und lassen sich nicht immer klar von diesen abgrenzen (102). Bei den Versuchen Enhancer in einem Genom vorherzusagen, wurde zunächst allein auf die evolutionäre Konservierung nicht-codierender DNA-Sequenzen zurückgegriffen (130, 167). Diese Vorgehensweise stellte sich als stark limitierend heraus. Besonders Enhancer, die an Reaktionen auf Umwelteinflüsse wie auch bei der Immunantwort beteiligt sind, entwickelten sich häufig parallel mit den zugehörigen Genen und sind zwischen verschiedenen Spezies nicht zwangsläufig hoch konserviert (115, 17). Zudem kann mit dieser Methodik keine Aussage über die tatsächliche Aktivität eines Enhancers getroffen werden (168). In den letzten Jahren rückte bei der Vorhersage von Enhancern der Chromatinstatus in den Fokus und es konnten verschiedene Enhancer Klassen definiert werden. „Latent Enhancer“ weisen zunächst kaum Histonmodifikationen und keine Transkriptionsfaktor-Bindung auf, aber die entsprechenden Bindemotive (128). Durch einen Stimulus kann ein solcher Enhancer über einen „pioneer factor“ (bereitet inaktives Chromatin für die Bindung anderer Faktoren vor) und den „master regulator“ (wichtigster Transkriptionsfaktor im Reaktionsprozess) aktiviert werden (33). Nun spricht man von einem „active Enhancer“, der sich durch eine hohe H3K4 Methylierung und H3K27 Acetylierung sowie der Bindung der Histonacetyltransferase p300/CBP auszeichnet (38, 140). Ist der Einfluss des Stimulus beendet, kann der Enhancer in den Zustand eines „poised Enhancers“ übergehen. Dabei bleibt die erhöhte H3K4 Methylierung erhalten, während die H3K27 Acetylierung abnimmt und sich die Transkriptionsfaktoren lösen. Bei einem erneuten Stimulus fällt die sekundäre Antwort nun deutlich stärker und schneller aus, ein molekulares „Enhancer-Gedächtnis“ entsteht (38, 128, 140). Während also stabile Enhancer eine wichtige Rolle in der Zelltypspezifität spielen, erlaubt der dynamische Anteil der Enhancer im Genom die individuelle Reaktion auf externe Stimuli und auch eine längerfristige Anpassung an Umweltbedingungen.

Viele der beschriebenen Eigenschaften von Enhancern treffen auch auf sogenannte Silencer zu, wobei diese den gegenteiligen Effekt auf die Transkription ihres Zielgens ausüben, indem sie Bindestellen für Repressoren aufweisen und so zur Hemmung der Expression führen (121). Im Genom finden sich jedoch noch weitere interessante regulatorische Elemente, die sowohl für die Enhancer- als auch für die Silencer-Wirkung eine Rolle spielen können. So

können die 0,5 bis 3kb langen Insulatoren nicht nur Gene von der transkriptionellen Aktivität benachbarter Gene abschirmen, sondern auch Enhancer/Silencer-Kommunikation mit dem Promotor blockieren (102). Zusätzlich nehmen sie auch Einfluss auf die Chromatin-Struktur, indem sie die Ausbreitung von repressivem Heterochromatin und damit verbundenen typischen Histonmodifikationen unterbinden können (105, 182). Für die Wirkung von Insulatoren ist die Bindung von Insulatorproteinen an die entsprechende DNA-Sequenz entscheidend, von denen in *Drosophila* mehrere Vertreter identifiziert werden konnten (173). In Vertebraten konnte jedoch bislang nur ein Protein mit Insulator-Aktivität festgestellt werden, das analog zu seiner DNA-Bindedomäne als CTCF („CCCTC binding factor“) bezeichnet wird (12, 13) und selbst Ziel verschiedener posttranslationaler Modifikationen ist. Dies und die Interaktion mit unterschiedlichen Kofaktoren, zu denen auch Komponenten des Kohesin-Komplexes gehören, kann seine Aktivität beeinflussen (174). Die genaue Funktionsweise von Insulatoren ist nicht abschließend geklärt und könnte sowohl auf der Interaktion und somit Abschirmung von transkriptionsaktivierenden Faktoren beruhen (39, 102), als auch auf der Organisation des Chromatins selbst in strukturelle Domänen (102, 122). So geht man davon aus, dass Insulatorbereiche selbst miteinander interagieren können und so aktivierende oder reprimierende „Chromatin Loops“ ausbilden (82, 139, Abb.2.8). Für eine solche Loop-Formierung ist nicht nur CTCF, sondern auch der bereits erwähnte Kohesin-Komplex von Bedeutung. Dieser bildet eine ringförmige Struktur aus, die so mehrere Chromatinstränge in räumliche Nähe zueinander bringen und fixieren kann (143). Es konnte gezeigt werden, dass die Anlagerung des Kohesin-Komplexes ans Chromatin mit einer CTCF-abhängigen Rekrutierung in Verbindung stehen kann (129, 144, 161, 171), Kohesin und CTCF also gemeinsam an der Ausbildung von Chromatin-Loops beteiligt sind und somit auch eine Rolle bei Vorgängen wie „Enhancer blocking“ oder „Enhancer action“ spielen (122).

Aus diesen Ausführungen folgt, dass zum Verständnis der Regulationsvorgänge von Genen neben der Identifizierung der Faktoren des Kernpromotors und des proximalen Promotorbereichs die Charakterisierung der gesamten Chromatin-Umgebung, deren Strukturierung und epigenetische Organisation von entscheidender Bedeutung ist. Dieses trifft auch auf die nukleäre Genregulation und komplexe Koregulation von Genen in Antwort auf inflammatorische Stimuli zu.

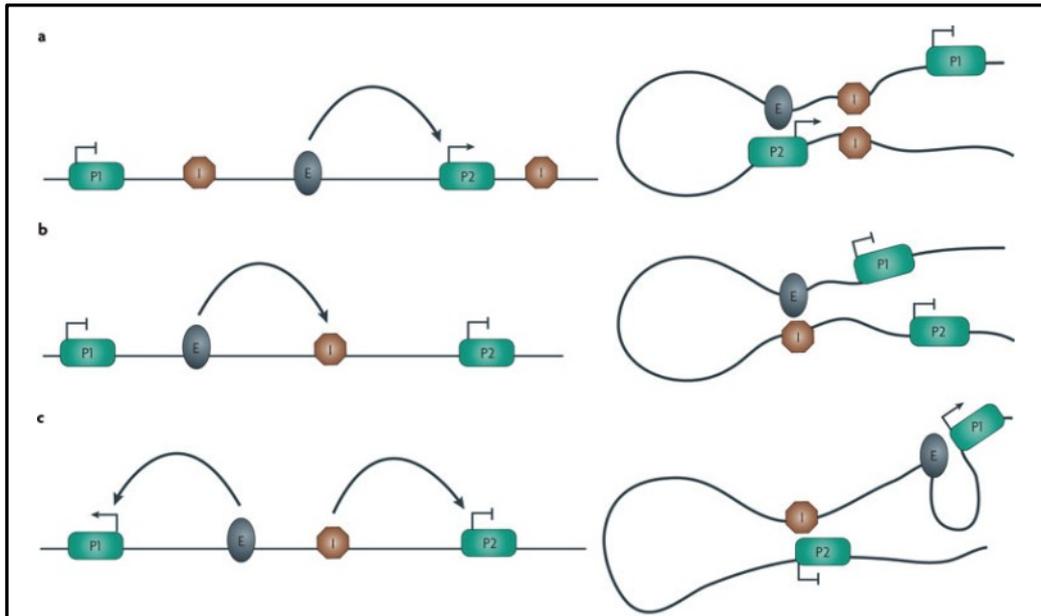


Abb. 2.8: Potentielle Interaktionen zwischen verschiedenen regulatorischen Elementen und Genpromotoren

A) Die Interaktion zwischen einem Enhancer (E) mit einem Genpromotor (P2) führt an diesem Gen zur Transkriptionsaktivierung. Dies kommt durch die Zusammenlagerung zweier Insulatoren (I) zustande, die neben diesem Aktivierungsloop den Genpromotor (P1) vom Enhancer abschirmen. B) Der Insulator (I) lagert sich an einen Enhancer (E) an und schirmt diesen so von beiden Genpromotoren (P1 und P2) ab. C) Der Insulator (I) bindet selbst an einen Genpromotor (P2) und erlaubt so nur den Kontakt des Enhancers (E) zu dem anderen Genpromotor (P1). Abbildung aus 139, Lizenznummer 3541311425823.

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Verständnis der regulatorischen Vorgänge bei der Entzündungsantwort der Zelle ist aufgrund der Vielzahl entzündlicher Erkrankungen und Folgeerscheinungen von großer Bedeutung und bisher nur in Anfängen auf Ebene des Nukleus untersucht (40, 152). In dieser Arbeit sollte daher die nukleäre Genregulation in Epithelzellen unter einem IL-1 Stimulus analysiert werden, mit dem Fokus auf Chromatin-basierenden Mechanismen. Studien dieser Art lagen bislang vor allem unter den Stimuli LPS oder TNF und in erster Linie in verschiedenen murinen Immunzelllinien, insbesondere Makrophagen, vor (59, 65, 156, 158, 79). An der humanen KB-Epithelzelllinie sollten daher Fragen nach der Bedeutung des Chromatinstatus, beteiligten Transkriptionsfaktoren und regulatorischen Elementen in der IL-1 abhängigen Genantwort beantwortet werden. Auch die Koregulation und Organisation von größeren Zielgen-Clustern sollte in die Fragestellung miteingebunden werden. Durch Manipulation von IL-1 Signalweg-Komponenten sollten Aussagen zur Verknüpfung der zytosolischen mit der nukleären Signaltransduktion ermöglicht und so das Bild der Genregulation in der Entzündungsantwort weiter vervollständigt werden.

3 Material

3.1 Verbrauchsmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Plastikwaren und Einwegmaterialien stammten von den Firmen Brand, Eppendorf, Greiner, IBIDI, Neolab, Nunc, Omnilab, Roth oder Sarstedt.

3.2 Geräte

3.2.1 Allgemeine Geräte

Gerät	Hersteller
Waage AT 250	Mettler
Bioruptor™ NextGen	Diagenode
Brutschrank	Thermo Scientific
Filmentwicklermaschine	Curix 60, AGFA
Eismaschine	Ziegra
Electronic Balance MP-3000	Chyo
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf
Multitron Standard	Infors HT
Pipetboy	Integra
Pipetten	Eppendorf
Sonifier 250	Branson
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Thermocycler T Professional	Biometra
Thermomixer compact	Eppendorf
7500 Fast Real time PCR System	Applied Biosystems
Waage FI310	Fischer
Varishaker Inkubator	Dynatech
Multipette	Eppendorf
Schüttler	Heidolph
Kühlschränke	Heraeus, Bosch
Gefrierschränke	Heraeus, Bosch
Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold	Promega
Mupid-EXu submarine electrophoresis system (Agarosegelelektrophorese)	Advance

3.2.2 Systeme für Elektrophorese, Western Blot und Fotografie

Gerät	Hersteller
Gel iX Imager UV-Transilluminator	Intas
Semi-Dry-Blotter	Peqlab Biotechnologie
Elektrophorese Power Supply EPS 600, 601 und 3500 Spectrophotometer	Pharmacia Biotech
Elektrophoresekammer	Thermo Scientific

3.2.3 Zentrifugen

Gerät	Hersteller
Kühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf
Optima™ TLX Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
Sorvall RC5S Plus	Thermo Scientific
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf
TJ-25 Centrifuge	Beckman Coulter

3.2.4 Mikroskope und Photometer

Gerät	Hersteller
DM IL	Leica
DMIRE2 Fluoreszenzmikroskop	Leica
ND-1000 Spectrophotometer	Nano Drop
384 plus Microplate Spectrophotometer	Spectramax
Qubit Fluorometer	Invitrogen
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies

3.2.5 Zellkultur

Gerät	Hersteller
Brutschrank CO2 Autozero	Thermo Scientific
Sterilwerkbank Lamin Air HB 2472	Thermo Scientific
Wasserbad	GFL

3.3 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Baker, Biomol, Fluka, Invitrogen, Merck, Pharmacia, Promega, Roth, Roche, Serva und Sigma bezogen (Qualitätsstufe "p.a.", "Für die Molekularbiologie" oder "cell culture grade").

3.4 Puffer und Lösungen

3.4.1 Puffer für Chromatinimmunopräzipitation (ChIP)

Puffer	Zusammensetzung
PBS mit PMSF	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ PBS mit 1 mM PMSF
Zell-Lysepuffer	1 % SDS 10 mM EDTA 50 mM Tris/HCl pH 8,1 1 mM PMSF 1,5x Roche Protease Inhibitor Mix
Dilutionspuffer	0,01 % SDS 1,1 % Triton X-100 1,2 mM EDTA 167 mM NaCl 16,7 mM Tris/HCl pH 8,1
Niedrigsalzpuffer	0,1% SDS 1 % Triton-X-100 2 mM EDTA 20 mM Tris/HCl pH 8,1 150 mM NaCl
Hochsalzpuffer	0,1 % SDS 1 % Triton-X-100 2 mM EDTA

	20 mM Tris/HCl pH 8,1 500 mM NaCl
Lithiumchloridpuffer	0,25 M LiCl 1 % NP40 1 % Deoxycholat 1 mM EDTA 10 mM Tris/HCl pH 8,1
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA
ReChIP-Puffer	20mM Tris/HCl pH 8,1 2mM EDTA 150mM NaCl 0,1% Triton X-100

3.4.2 Puffer für Agarose-Gelelektrophorese

Puffer	Zusammensetzung
DNA-Auftragspuffer 6x (Fermentas)	10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 0,03 % Bromphenol Blau 0,03 % Xylene cyanol FF 60 % Glycerol 60 mM EDTA
TAE-Puffer 1x	9,68 g/l Tris 0,23 % (v/v) Essigsäure 2 mM EDTA

3.4.3 Puffer für SDS PAGE und Western Blot

Puffer	Zusammensetzung
Laemmli Laufpuffer 10x	0,5 M Tris 1,92 M Glycin 0,5 % (w/v) SDS
Spezial-Lysepuffer	10 mM Tris

	30 mM $\text{Na}_4\text{O}_7\text{P}_2 \times 10\text{H}_2\text{O}$
	50 mM NaCl
	1 % Triton x-100
	2 mM Na_3VO_3
	50 mM NaF
	20 mM β -Glycerophosphat
	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin
	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin
	1 mM PMSF
	1 μM Microcystin
Fraktionierte Lyse Puffer I	20 mM HEPES (pH 8,0)
	10 mM KCl
	1 mM MgCl_2
	0,1% (v/v) Triton x-100
	20% (w/v) Glycerol
	50 mM NaF
	1 μM Microcystin
	1 mM Na_3VO_4
	1 x Proteaseinhibitormix
Fraktionierte Lyse Puffer II	20 mM HEPES
	2 mM EDTA
	400 mM NaCl
	0,1% (v/v) Triton x-100
	20% (w/v) Glycerol
	50 mM NaF
	1 μM Microcystin
	1 mM Na_3VO_4
	1 x Proteaseinhibitormix
Fraktionierte Lyse Puffer III	20 mM Tris (pH 7,5)
	2 mM EDTA
	150 mM NaCl
	1% (w/v) SDS
	1% (w/v) NP-40
	50 mM NaF

	1 μ M Microcystin 1 mM Na_3VO_4 1 x Proteaseinhibitormix
Ponceau-Rot-Lösung	0,1 % Ponceau 5 % Essigsäure
Sammelgelpuffer	1 M Tris (pH 6,8)
TBS-Puffer 10x	100 mM Tris (pH 7,4) 1,5 M NaCl
TBS-T-Puffer 1x	TBS-Puffer mit 0,05 % (v/v) Tween 20
Trenngelpuffer	1 M Tris (pH 8,8)
Westernblot-Puffer 1x	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol

3.4.4 Puffer für DNA-Methylierungsanalyse

Puffer	Zusammensetzung
Proteinase K-Puffer	50 mM Tris (pH 7,6) 25 mM EDTA 0,5% NP40 0,5% SDS
Bisulfit-Lösung	3,6 M Natrium-Bisulfit 0,6 M NaOH

3.4.5 Medien

Medium	Zusammensetzung
DMEM-Vollmedium (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)	10 % (v/v) FKS, 20 μ g/ml Streptomycin, 20 U/ml Penicillin, 2

(PAA-Laboratories)	mmol/l L-Glutamin
LB-Medium	10 g BactoTrypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen und autoklavieren
LB-Platten	18.5 g Standard I-Nähragar (Merck) ad. 0.5 l mit ddH ₂ O und autoklavieren
Einfriermedium	DMEM, 10 % FKS, 10 % DMSO

3.5 Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien

Material	Hersteller
Amersham™ ECL™ Western blotting detection reagent	GE Healthcare
dNTP Set	New England Biolab, Fermentas
Fast SYBR® Green Master Mix	Applied Biosystems
ECL-Filme (Fuji X-ray film SUPER RX)	Fujifilm
Filterpapier	Whatman
Hank's BSS	PAA
NucleoBond® PC500 Maxi Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up	Macherey-Nagel
NucleoSpin® RNA II Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel
Protein G-Sepharose	GE Healthcare
Protein A-Sepharose	GE Healthcare
Random Hexamer Primer 0,2 µg/µl	Thermo Scientific
Roti®-PVDF-Membran	Roth
Roti®-Quant Bradford-Kit	Protein Assay Dye Reagent, Roth
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
Zellkulturmaterial	Greiner Bio-One
4x Roti-Auftragspuffer	Roth
96-Well Fast Thermal Cycling Plates	Life Technologies
96-Well F96 MicroWell™ Platten	Thermo Scientific, Nunc

S-Adenosylmethionin (SAM)	New England Biolabs
NE Puffer	New England Biolabs
Wizard DNA Clean Up System	Promega
Glykogen	Fermentas
Green GoTaq® Flexi Puffer	Promega
Magnesiumchlorid 25 mM	Promega
TOPO® TA Cloning® Kit	Invitrogen
Protease Inhibitor Mix	Roche

3.6 Enzyme und Inhibitoren

Enzyme	Hersteller
GoTaq® Flexi DNA Polymerase (5 U/μl)	Promega (M8305)
MMLV-Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Fermentas (# EP0352)
Proteinase K (20 mg/ml)	Bioline GmbH
RNase A (10 mg/ml)	Fermentas (# EN0531)
CpG Methyltransferase (M.SssI)	New England Biolabs (M0226S)

Inhibitor	Hersteller
5(Z)-7-Oxozeaenol	Tocris (# 66018-38-0)
(+)-JQ1	Cayman Chemicals (11187)

3.7 Standards

Marker	Hersteller
GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas

3.8 Plasmide

In dieser Arbeit wurden die folgenden bereits vorhandenen Plasmide eingesetzt:

Plasmid	Herkunft
pSuper.Puro (pSP)	AG Kracht
pSP-shp65	AG Kracht (Johanna Sölch)

3.9 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
HeLa (humane, epitheloide Zervixkarzinomzellen)	AG Schmitz (Universität Gießen)
KB (humane, orale, epidermale Karzinomzellen, Ziesche et al. 2013)	ATCC
A549 (humane, alveolare, basal-epitheliale Adenokarzinomzellen)	ATCC
HeLa shCDK6 K06	AG Kracht (Handschick et al., 2014)

3.10 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E. coli</i> -Stamm TOP10 (Invitrogen)	F-mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697galU galk rpsL (Str ^R) endA1 nupG

3.11 Zusätze beim Bakterienwachstum

Zusatz	Konzentration
Kanamycin (Antibiotikum)	50 µg/ml
IPTG	0,1 mM
X-Gal	0,1 mg/ml

3.12 Synthetische Oligonukleotide

3.12.1 ChIP Primer – IL8 Scanning Primer Promotor

Primerkürzel	Zielgen		Sequenz (5`-3`)
IL8_up4	<i>IL8</i> Promotor (-899bp) (Negativkontrolle)	Forward	atcatgggtcctcagaggtcagac
		Reverse	ggtgggaggagggtgttatctaag
IL8_up3	<i>IL8</i> Promotor (-748bp)	Forward	ctcactccatcccctttgct
		Reverse	tccagtggaggcataagagc
IL8_up2	<i>IL8</i> Promotor (-421bp)	Forward	tgctttggaagattctgct
		Reverse	ggtgaagataagccagccaat

IL8_up1	<i>IL8</i> Promotor (-111bp)	Forward	gccccctaagagcagtaaca
		Reverse	ggcaaacctgagtcatacaca
IL8_TSS	<i>IL8</i> TSS (0bp)	Forward	aagaaaactttcgtcatactccg
		Reverse	tggcttttatatcatcacacctac
IL8_do1	<i>IL8</i> Promotor (-97bp)	Forward	catcagttgcaaactcgtgga
		Reverse	gttcctccggtgggttctt
IL8_do2	<i>IL8</i> Promotor (-47bp)	Forward	tgcataagttctctagtaggggatg
		Reverse	tgttgttaccaaagcatcaaga
IL8_do3	<i>IL8</i> Promotor (+239bp)	Forward	tgctttggaacaaacatccttt
		Reverse	caaatctgaggcttgcaatg

3.12.2 ChIP Primer – *IL8* Scanning Primer Gen

Primerkürzel	Zielgen		Sequenz (5`-3`)
IL8_TSS	<i>IL8</i> TSS (0bp)	Forward	aagaaaactttcgtcatactccg
		Reverse	tggcttttatatcatcacacctac
IL8_Sc1	<i>IL8</i> (+417bp)	Forward	tgctttggaacaaacatccttt
		Reverse	ccgtggttctcaataggaca
IL8_Sc2	<i>IL8</i> (+753bp)	Forward	cctgattatagaccaggcatgt
		Reverse	ctgacaacattgaacgacttcc
IL8_Sc3	<i>IL8</i> (+1094bp)	Forward	aaggaagtagctggcagagc
		Reverse	aatttctgtttggcgcagt
IL8_Sc4	<i>IL8</i> (+1377bp)	Forward	ccagggttaggattacagtagtaaa
		Reverse	agtttcttgggggtccaga
IL8_Sc5	<i>IL8</i> (+1827bp)	Forward	accatacatagttgccagga
		Reverse	gaaggaaagtagggttcttgaaaa
IL8_Sc7	<i>IL8</i> (+2531bp)	Forward	ttttctgttaaactcggcaacc
		Reverse	gtgctccacatgtcctcac
IL8_Sc8	<i>IL8</i> (+2872bp)	Forward	ttagataaattcaatcagggtttt
		Reverse	tcaacacagcactaccaacaca
IL8_Sc9	<i>IL8</i> (+3365bp)	Forward	gcttattgggattctcttgttt
		Reverse	tggaggacactactgtttgtaacc
IL8_Sc10	<i>IL8</i> (+3740bp)	Forward	aagcatattgcaacaaatcaaa
		Reverse	cctctacgcctttcgacttc

3.12.3 Weitere ChIP Primer

Primerkürzel	Zielgen		Sequenz (5`-3`)
CXCL1_p65	CXCL1 (p65 Bindemotiv)	Forward	atcagtggaacccccacac
		Reverse	atccggaaccccctttat
CXCL2_p65	CXCL2 (p65 Bindemotiv)	Forward	gtcagaccggacgtcact
		Reverse	accctttatgcatgggtg
CXCL3_p65	CXCL3 (p65 Bindemotiv)	Forward	ggcgtaggcgtcaccag
		Reverse	gatcggaaccccctttat
CXCL5_p65	CXCL5 (p65 Bindemotiv)	Forward	aaggaagtagctggcagagc
		Reverse	aatttctgtgtggcgcagt
CXCL6_p65	CXCL6 (p65 Bindemotiv)	Forward	ctccaccaaccccctcttc
		Reverse	gcgagactggaggatacag
CXCL4	CXCL4 (TSS)	Forward	cagttcctcggtgccact
		Reverse	atgctgaggcagagcttc
CXCL4V	CXCL4V (TSS)	Forward	cagtgacggggataaaaga
		Reverse	aacccaagaacagcatctc
CXCL7	CXCL7 (TSS)	Forward	ccttctgaacggagtctt
		Reverse	ggaagtgagggtatgtggga
IL8_Enhancer	IL8 (-14.406bp)	Forward	tggctcctaatggcaaagt
		Reverse	tatgagcccctgaccatgt
CXCL2_Enhancer	CXCL2 (-17.865bp)	Forward	aggcctctgtgatggaaatg
		Reverse	tccttctgttgctccattc
Negativkontrolle	Genfreie Region (IL8, -899bp)	Forward	atcatgggtcctcagaggcagac
		Reverse	ggtgggaggagggttatctaag
CTCF_1	CTCF Bindestelle zwischen IL8 Enhancer und Promotor	Forward	ttctgtgatgggagtgtga
		Reverse	tftggaatcttgagcttgg
CTCF_3	CTCF Bindestelle upstream von CXCL1	Forward	acatggcagcaacagagaaa
		Reverse	ccatttgcctggaatcact
CTCF_6	CTCF Bindestelle zwischen CXCL3 und CXCL2	Forward	tctctgtgaccctccactt
		Reverse	gactgttctgggttctcca
CTCF_7	CTCF Bindestelle upstream von CXCL2	Forward	caccaggagcaggagcag
		Reverse	aaccatgcataaaagggttc
CTCF_8	CTCF Bindestelle upstream vom CXCL2 Enhancer	Forward	aagcccctgggaacacac
		Reverse	ctgcctgttttcggctcta

3.12.4 Primer zur Analyse von lincRNAs

Primerkürzel	Lage im Genom		Sequenz (5`-3`)
LINCRNA1	Chr.6 (44.046.434-44.046.589)	Forward	agccctctgctgacagggta
		Reverse	acggaggggaacaggagaatc
LINCRNA2	Chr.13 (44.848.647- 44.848.802)	Forward	gtaggcaagctgccctgag
		Reverse	gcagctgaagctagcaggtc

3.12.5 Primer für methylierungsspezifische PCR (MS-PCR)

Primerkürzel	Zielgen		Sequenz (5`-3`)
CXCL1_meth	CXCL1 (methyliert)	Forward	ttaattatgtataaaaggggtcgc
		Reverse	taaaactcaacaaacgaatctaacg
CXCL1_unmeth	CXCL1 (unmethyliert)	Forward	ttaattatgtataaaaggggttg
		Reverse	aaactcaacaaacaaatctaacaac
CXCL6_meth	CXCL6 (methyliert)	Forward	tttatttagtttaggaattcgca
		Reverse	aataccaaaaactctcaccgct
CXCL6_unmeth	CXCL6 (unmethyliert)	Forward	tttatttagtttaggaattgtga
		Reverse	ccaataccaaaaactctcaccac

3.12.6 Primer für Bisulfit-Sequenzierung

Primerkürzel	Zielgen		Sequenz (5`-3`)
BS_CXCL1_1	CXCL1 (Promotor)	Forward	ttaattatgtataaaagggg
		Reverse	acaaaatctacaaacactaa
M13	LGC Genomics (Sequenzierprimer)	Forward	tgtaaacgacggccagt
		Reverse	cggataacaatttcacacagg

Alle aufgeführten Primer wurden bei eurofins mwg operon synthetisiert.

3.13 TaqMan-Assays on Demand, Applied Biosystems

Name	Accession Number	Assay ID
<i>hACTB</i>	NM_001101.3	Hs99999903_m1

<i>hIL8</i>	NM_000584.3	Hs00174103_m1
<i>hCXCL2</i>	NM_002089.3	Hs00236966_m1
<i>hCXCL1</i>	NM_001511.1	Hs00236937_m1
<i>hCXCL6</i>	NM_002993.2	Hs00237017_m1
<i>hNFkBIA</i>	NM_020529	Hs00153283_m1
<i>RELA (NFkB p65)</i>	NM_001145138.1	Hs00153294_m1

3.14 Antikörper

3.14.1 Antikörper für ChIP

Antigen	Hersteller	Eingesetzte Menge
Histon H3	Abcam (ab1791)	2 µg/IP
RELA (NFkB p65)	Santa Cruz (sc-372), auch p65X (Transcruz Reagent)	3 µg/IP
HDAC3	Abcam (ab7030)	2 µg/IP
H3K9ac	Millipore (07-352)	2 µg/IP
H3K9me3	Abcam (ab8898)	2 µg/IP
H3K27me3	Abcam (ab6002)	2 µg/IP
H3K4me1	Abcam (ab8895)	2 µg/IP
H3K27ac	Diagenode (pAb-174-050)	2,4 µg/IP
JunB	Santa Cruz (sc-46)	3 µg/IP
c-Jun	Santa Cruz (sc-1694)	3 µg/IP
JunD	Santa Cruz (sc-74)	3 µg/IP
c-Fos	Santa Cruz (sc-7202)	3 µg/IP
FRA1	Santa Cruz (sc-605)	3 µg/IP
ATF2	Santa Cruz (sc-6233)	3 µg/IP
CBP	Santa Cruz (sc-583)	3 µg/IP
Phospho-Pol II S5	Abcam (ab5131)	2 µg/IP
CDK6	Santa Cruz (sc-177)	3 µg/IP
Polymerase II	Millipore (17-620)	1 µg/IP
Phospho-Pol II S2	Abcam (ab5095)	2 µg/IP
CTCF	Millipore (07-729)	5 µg/IP
Rad21	Abcam (ab992)	2,5 µg/IP
Immunglobulin G (rabbit)	Cell signalling (#2729)	2 µl/IP

3.14.2 Antikörper für Immunfluoreszenz

Antigen	Hersteller	Eingesetzte Menge
RELA (NFκB p65)	Santa Cruz (sc-8008)	1:50 (Primärantikörper)
c-Fos	Santa Cruz (sc-7202)	1:50 (Primärantikörper)
α-Maus IgG (ganzes Molekül)- FITC-Antikörper	Sigma (aus Ziege)	1:100 (Sekundärantikörper)
α-Kaninchen IgG- Cy3-Antikörper	Chemicon International (aus Esel)	1:200 (Sekundärantikörper)

3.14.3 Antikörper für Western Blot

Antigen	Hersteller	Eingesetzte Menge
<i>Primärantikörper</i>		
anti-β-Aktin	Calbiochem (JLA 20)	1:10000 in TBS-T, 5% Milch
anti-Tubulin	Santa Cruz (sc-8035)	1:1000 in TBS-T, 5% Milch
anti-IκBa	Cell Signaling (9242)	1:1000 in TBS-T
anti-cFOS	Santa Cruz (sc-7202)	1:000 in TBS-T, 5% BSA
anti-NFκB p65	Santa Cruz (sc-372, sc-8008)	1:1000 in TBS-T, 5% Milch
anti-phospho-NFκB p65 Ser536	Cell Signaling (3033, 3031)	1:1000 in TBS-T, 5% BSA
anti-CDK6	Santa Cruz (sc-177, sc-56282)	1:10000 in TBS-T, 5% BSA
anti-p38	(SAK7) (Rzeczkowski et al. 2011)	1:000 in TBS-T, 5% BSA
anti-TAK1	Cell Signaling (4505)	1:000 in TBS-T, 5% BSA
anti-phospho-TAK1 T187	Cell Signaling (4536)	1:500 in TBS-T, 5% BSA
anti-cJun	Santa Cruz (sc-1694)	1:000 in TBS-T, 5% BSA
anti-phospho-cJun Ser63	Cell Signaling (9261)	1:000 in TBS-T, 5% BSA
anti-JunD	Santa Cruz (sc-74)	1:000 in TBS-T, 5% BSA
anti-JNK	Cell Signaling (9252)	1:000 in TBS-T, 5% BSA
anti-phospho-JNK T183/185	Cell Signaling (9251S)	1:500 in TBS-T, 5% BSA
anti-ATF2	Santa Cruz (sc-6233)	1:000 in TBS-T, 5% BSA
anti-JunB	Santa Cruz (sc-46)	1:000 in TBS-T, 5% BSA
anti-phospho- IκBa		

S32	Cell Signalling (2859)	1:500 in TBS-T, 5% BSA
anti-phospho-p38		
TY180/182	Zymed (36-8500)	1:500 in TBS-T, 5% BSA
anti-phospho Pol II	Abcam (ab5095)	1:1000 in TBS-T, 5% Milch
S2		

Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen IgG	Dako (aus Esel)
Anti-Maus IgG	Dako (aus Schaf)

4 Methoden

4.1 Isolierung von Nukleinsäuren

4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die mit der entsprechenden Plasmid-DNA transformierten Bakterien wurden für einen kleineren Maßstab in 4 ml und für einen größeren Maßstab in 150 ml LB-Medium über Nacht (oder für mindestens 6-8 h) bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Nach Pelletierung durch Zentrifugation wurde zur Isolierung der Plasmid-DNA die Bakterienkultur in Resuspensionspuffer aufgenommen und mit den Kits der Firma Macherey & Nagel (für Mini- bzw. Maxi-Präparation, je nach Maßstab) nach Herstellerangaben weiter verarbeitet. Je nach gewünschter Konzentration wurde die DNA abschließend bei der Mini-Präparation mit 30-50 µl ddH₂O und bei der Maxi-Präparation mit 200 µl ddH₂O eluiert. Die DNA-Konzentration wurde mittels „Nanodrop“ nach Herstellerangaben bestimmt und bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20 °C gelagert.

4.1.2 Isolierung von RNA

Für die Expressionsanalyse verschiedener Gene mittels RT-PCR und anschließender „Real time PCR“, sowie für Microarray Analysen, wurde die Gesamt-RNA der Zellen mit Hilfe des Kits *NucleoSpin® RNA II* von Macherey & Nagel nach Herstellerangaben isoliert, zu denen auch ein DNase-Verdau gehörte. Die Menge des Lysepuffers wurde an die jeweilige Zellmenge angepasst und die Homogenisierung erfolgte hierbei über eine Filtersäule. Im Rahmen des Kit-Protokolls kam es anschließend zur Bindung der RNA an eine Silikamembran und nach mehreren Waschschritten zur Elution der RNA in 30-60 µl RNase-freiem Wasser. Die Konzentration der RNA wurde mittels Nanodrop bestimmt und die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert oder direkt in die RT-PCR eingesetzt. Für die RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) wurde die Gesamt-RNA einschließlich kleiner RNAs unter Verwendung des Kits *mirVana™ miRNA* von Ambion nach Herstellerangaben isoliert. Dabei wurde zunächst eine organische Extraktion durchgeführt, gefolgt von verschiedenen Aufreinigungsschritten über GFF („glass fiber filter“) und abschließender Elution in 100 µl RNase freiem Wasser. Die Konzentration und Integrität der RNA wurde mittels Nanodrop und *Agilent Bioanalyzer (Pico Chip)* nach Herstellerangaben überprüft, bevor die RNA zur Sequenzierung eingeschickt wurde.

4.1.3 Isolierung von genomischer DNA

Für die Isolierung von genomischer DNA, zum Beispiel für die DNA-Methylierungsanalyse, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in PBS vom Kulturgefäßboden abgekratzt („Scraper“ mit Gummimembran) und in ein Falcon überführt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und in 1 ml frischem PBS

aufgenommen um sie in ein Eppendorf-Gefäß zu überführen. Hier wurde durch erneute Zentrifugation das PBS wieder entfernt und das Zellpellet in 400 µl Proteinase K-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 15 µl Proteinase K (Ausgangskonzentration: 20 mg/ml) und Durchmischen erfolgte eine Inkubation bei 56 °C für mindestens 3 h. Die DNA wurde dann über eine Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert, die wie folgt ablief: Zugabe von einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zur entsprechenden Probe, durchmischen und Zentrifugation bei 10 000 xg für 10 min. Nach Überführung der wässrigen, oberen Phase in ein neues Gefäß wurde dieser Schritt wiederholt, genauso nach der anschließenden Zugabe des doppelten Volumens an Chloroform zur wässrigen Phase. Diese wurde ebenfalls in ein neues Reaktionsgefäß überführt um die DNA mittels Natriumacetat-Fällung aufzureinigen. Dazu wurden zur jeweiligen Probe 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und das doppelte Volumen an 100% Ethanol, sowie 1 µl Glykogen gegeben. Nach Inkubation bei -20 °C für 30 min erfolgte eine Pelletierung der DNA durch Zentrifugation (15 min, 4 °C, maximale Drehzahl). Das DNA Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl TE gelöst. Die Konzentration der DNA wurde mittels *Nanodrop* nach Herstellerangaben bestimmt und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.2 Polymerasekettenreaktionen (PCR)

4.2.1 PCR im Standard-Thermocycler mit Analyse über Agarosegelelektrophorese

Die Annealingtemperatur wurde an das jeweilige Primerpaar angepasst. Die PCR-Reaktion wurde im Standardansatz mit Hilfe des Kits *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* von Promega nach Herstellerangaben wie folgt durchgeführt:

Substanz	Eingesetzte Menge
Wasser	9,5 µl
<i>GoTaq® Flexi Buffer Green</i>	4 µl
MgCl ₂ 25 mM	3,2 µl
dNTP Mix 10 mM	0,4 µl
Primer <i>sense</i> 10 µM	1 µl
Primer <i>antisense</i> 10 µM	1 µl
<i>GoTaq® Flexi DNA Polymerase</i>	0,1 µl
Template	1-2 µl (unverdünnt für CHIP DNA)

Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet:

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	30 sek	35

Anlagerung der Primer	54-65 °C	30 sek	
Elongation	72 °C	30 sek	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1

Das PCR-Produkt wurde anschließend direkt im *GoTaq® Flexi Buffer Green* mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Dazu wurden die Proben in ein 1,5%iges Agarosegel (0,1 µg/ml Ethidiumbromid) geladen und bei einer angelegten Spannung von 100 V für 30 min aufgetrennt und zum Vergleich ein DNA-Marker eingesetzt. Die Auswertung erfolgte dann optisch mit Hilfe des *Gel iX Imager UV-Transilluminator* von Intas.

4.2.2 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR wird verwendet um mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus einem RNA Template komplementäre DNA (cDNA) zu erzeugen. Für das Umschreiben der Gesamt-RNA und der Amplifikation der cDNA wurde ein Gemisch aus Random-Hexamer-Primern und der MMLV (Moloney-Maus-Leukämie-Virus) Reversen Transkriptase verwendet.

Ein 20 µl RT-PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Substanz	Eingesetzte Menge
1 µg RNA in RNase freiem Wasser	14,5 µl
5x RT Puffer	4 µl
Random Hexamer Primer	0,5 µl
dNTP Mix 10 mM	0,5 µl
MMLV Reverse Transkriptase	0,5 µl

Die Reverse Transkription wurde im „Thermocycler“ mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

Temperatur	Zeit
23 °C	10 min
37 °C	60 min
95 °C	5 min
4 °C	∞

Die cDNA-Proben wurden direkt mittels Real Time PCR analysiert oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.2.3 Real time PCR

Die Real Time PCR ermöglicht eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR durch Messung von Fluoreszenzsignalen. In dieser Arbeit wurde die Real time PCR zur Analyse von ChIP DNA und cDNA verwendet, wobei bei der Untersuchung von cDNA aus RT-PCR sowohl mit dem *SYBR Green* System als auch mit den *TaqMan-Assays on Demand* gearbeitet wurde. Für die *TaqMan-Assays* stellt die Firma Applied Biosystems Kits zur Verfügung, die die herkömmlichen PCR-Reagenzien sowie eine sogenannte *TaqMan-Sonde* enthalten. Diese ermöglicht die exakte Detektion und Quantifizierung eines DNA *Templates*, hier cDNA, und besteht aus einem Reporterfarbstoff FAM (Carboxyfluorescein) am 5'-Ende und einem Quencher TAMRA (Tetramethylrhodamin) am 3'-Ende. Die Sonde bindet im Verlauf der PCR an die komplementäre Sequenz des Matrizenstrangs, wodurch Reporter und Quencher in räumliche Nähe zueinander kommen und der Reporter durch einen Fluoreszenzenergietransfer (FRET) seine lichtinduzierte Fluoreszenz auf den Quencher überträgt. Dadurch kann diese nicht gemessen werden bis die DNA Polymerase während der Synthese des komplementären DNA-Stranges auf die Sonde trifft und diese verdaut. Das Quenching wird nun aufgehoben und die Fluoreszenz des Reporters kann detektiert werden, wobei die gemessene Fluoreszenz dabei direkt von der Menge an amplifizierter DNA abhängig ist und deshalb zur Ermittlung der Ausgangsmenge verwendet werden kann.

Zur Anwendung kam das *ABI PRISM 7500 Sequence Detection System* und ein 20 µl Real time PCR Ansatz mit *Taqman-Assay* hatte folgende Zusammensetzung:

Substanz	Eingesetzte Menge
<i>TaqMan FAST 2x Universal PCR Master</i>	
<i>Mix</i>	10 µl
Nuklease-freies Wasser	7,5 µl
<i>TaqMan Assays on Demand</i>	0,5 µl
cDNA	2 µl

Die Real time PCR wurde mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2	1
Denaturierung	95 °C	3 sek	
Annealing/Elongation	60 °C	30 sek	40

Die eingesetzten cDNA-Proben wurden im 96-well-Format als Doppelwerte pipettiert. Die Auswertung der Daten erfolgte als relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode, bei der

die Expression des zu untersuchenden Gens auf ein nicht reguliertes Haushaltsgen (*housekeeping gene*, β -actin) normalisiert wird. Anschließend wurden die behandelten Proben auf eine unbehandelte Probe bezogen ($\text{fold} = 2^{-(\Delta \text{Ct Sample} - \Delta \text{Ct Control})}$).

Zur Analyse von CHIP DNA und einzelner cDNA Proben wurde die Real time PCR mit dem *SYBR Green* System verwendet. Dabei bindet der Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* an die in der PCR entstehende doppelsträngige DNA, was zur Zunahme der Fluoreszenz in jedem Zyklus führt und Rückschlüsse auf die Menge an entstehendem PCR Produkt zulässt. Da *SYBR Green* an jede doppelsträngige DNA bindet, wird am Ende der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Amplifikation unspezifischer DNA-Fragmente auszuschließen. Alle hier verwendeten PCR-Reaktionen führten zu einem spezifischen Peak bei der Schmelzkurvenanalyse und die Daten konnten daher direkt für Quantifizierungen verwendet werden.

Ein 20 μl Real time PCR Ansatz mit *SYBR Green* setzte sich wie folgt zusammen:

Substanz	Eingesetzte Menge
<i>FAST SYBR Green PCR Master Mix</i>	10 μl
Nuklease-freies Wasser	7 μl
Primer <i>sense</i> 10 μM	0,5 μl
Primer <i>antisense</i> 10 μM	0,5 μl
<i>Template</i> DNA	2 μl

Das verwendete Real time PCR-Temperaturprofil entsprach dem Programm, das für die *TaqMan*-Assay Analyse verwendet wurde. Für CHIP DNA berechnete man mit folgender Formel wieviel DNA des eingesetzten Inputs die einzelnen Proben aufwiesen, wobei jeweils ein Prozent des Inputs als Referenz in der Real time PCR analysiert wurde: $\% \text{-Input} = 2^{-(\text{Ct}_{\text{Probe}} - \text{Ct}_{\text{Input}})}$. Wird ein anderer Prozentwert des Inputs verwendet, muss die Formel entsprechend umgestellt werden, um weiter Gültigkeit zu besitzen: $\% \text{-Input} = (2^{-\Delta \text{Ct}} \times 100) / \text{eingesetzte Input-Fraktion}$.

4.3 Arbeiten mit Bakterien

4.3.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Bakterienstamm angeimpft und anschließend über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde diese Kultur in 50-150 ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD600 von 0,3-0,5 weiter inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (4 °C, 3000 rpm, 10 min) und in 1/10 Volumen TSS („transformation and storage

solution“; 10% Polyethylenglykol 6000, 5% DMSO, 50 mM MgSO₄·7H₂O ad 25 ml LB-Medium) bei 4 °C resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension á 100 µl in 1,5 ml GefäÙe aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.3.2 Transformation

Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Bakterien (*E. coli*, unter 3.10 beschrieben oder wie unter 4.3.1 selbst hergestellt) auf Eis aufgetaut und mit 10-100 ng Plasmid vermischt. Danach folgte eine Inkubation für 30 min auf Eis mit anschließendem Hitzeschock bei 42 °C für 45 min. Die Bakterien wurden wieder für 5 min auf Eis gestellt, bevor sie in 700 µl LB-Medium für 1 h bei 37 °C wuchsen. Je 20 µl und 200 µl wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von diesen Platten konnten schließlich transformierte Bakterienklone gepickt und verwendet werden.

4.3.3 Dauerkulturen von Bakterien

Für die Langzeitaufbewahrung von Bakterienkulturen wurden diese bei -80 °C als Glycerin-Dauerkultur gelagert. Die Kulturen wurden mit 1 Volumen Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

4.4 RNA-Analyse

4.4.1 Microarray-basierende mRNA-Expressionsanalyse

Neben der Analyse einzelner RNAs durch Real time RT-PCR erfolgten auch genomweite Auswertungen wie die Microarray-basierende mRNA-Expressionsanalyse. Dazu wurde RNA aus Zellen isoliert (Abschnitt 4.1.1) und von Dr. Dittrich-Breiholz (Institut für Physiologische Chemie, MHH) unter Verwendung des „*Whole Human Genome Oligo Microarray*“ (G4112F, AMADID 014850, Agilent Technologies) analysiert. Dieser enthält 45015 Oligonukleotidsonden, die das gesamte menschliche Transkriptom abdecken. Die cRNA-Synthese erfolgte mit dem "*Quick Amp Labeling kit, one color*" (#5190-0442, Agilent Technologies). cRNA Fragmentierung, Hybridisierung und Waschschriffe wurden wie in: „*One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol V5.7*“ (Agilent Technologies, 2008) beschrieben durchgeführt. Die „Arrayslices“ wurden in einem "*Agilent Micro Array Scanner G2565 CA*“ mit der Pixelauflösung 5 µm, Bittiefe 20 gemessen. Die Fluoreszenzdaten wurden mit der „*Feature Extraction Software V10.7.3.1*“ und einem Standardextraktionsprotokoll verrechnet.

Informationen zur bioinformatischen Analyse der Daten sind in Abschnitt 4.10.1 aufgeführt.

4.4.2 RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)

Für die Hochdurchsatzsequenzierung von Gesamt-RNA aus Zellen wurde diese mit Hilfe des Kits *mirVana™ miRNA* von Ambion isoliert und kontrolliert (wie unter 4.1.1 beschrieben).

Anschließend erfolgte die weitere Verarbeitung und Sequenzierung der RNA am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig (AG Michael Jarek). Dazu wurden aus der aufgereinigten RNA mit Hilfe von *ScriptSeq™ v2* „Single-end sequencing libraries“ erstellt, die dann auf dem Sequenziergerät *Illumina HiSeq* sequenziert wurden.

Informationen zur bioinformatischen Analyse der Daten sind in Abschnitt 4.10.2 aufgeführt.

4.5 Analyse von Chromatin

4.5.1 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunopräzipitation dient der Analyse des Chromatinzustandes bezüglich gebundener Proteine und vorliegender Histonmodifikationen. Für diese Analyse wurde eine konfluente T175-Zellkulturflasche bei KB Zellen, bzw. zwei solcher Flaschen bei A549 oder HeLa Zellen, (entspricht etwa $2.5 - 5.0 \times 10^7$ Zellen) mit dem „Crosslinker“ Formaldehyd in einer Konzentration von 1% für 10 min direkt im Medium bei Raumtemperatur behandelt. Dieses Vernetzen („Crosslinking“) der Proteine an die DNA wurde durch Zugabe von 0,1 M Glycin ins Medium für 5 min bei Raumtemperatur abgestoppt. Die so behandelten Zellen wurden anschließend im Medium durch „Scrapen“ und Zentrifugation (1610 xg, 4 °C, 5 min) gesammelt und mit eiskaltem PBS mit PMSF gewaschen (gleiche Zentrifugationsbedingungen). Zur Lyse wurde das Zellpellet in 3 ml ChIP Lysepuffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert, bevor die Scherung durch Sonifikation im *Bioruptor* von Diagenode erfolgte (28 Zyklen, 30 sek an, 30 sek aus, Power high, 4 °C). Die Lysate wurden durch Zentrifugation bei 16100 xg für 15 min bei 4 °C geklärt und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt, in denen die so behandelten Lysate entweder direkt verwendet oder bei -80 °C gelagert wurden.

Zuvor wurden 20µl der Lysate zur Bestimmung der DNA-Konzentration entnommen, mit 100µl TE Puffer verdünnt und mit 10µg/ml RNase A bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 3,8 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 1% SDS erfolgte eine weitere Inkubation bei 37 °C für mindestens 2 h, gefolgt von einer Inkubation bei 65 °C über Nacht. Durch diese Schritte wurden in den Test-Proben RNA und Proteine verdaut und das „Crosslinking“ aufgehoben. Um nun die DNA zur Konzentrationsmessung vorzubereiten, wurden diese Test-Proben im zweifachen Volumen NTB Puffer (Macherey & Nagel) resuspendiert und mit dem Kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up* (Macherey & Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in je 50 µl Elutionspuffer (5 mM Tris pH 8.5) eluiert. Die DNA-Konzentration wurde anschließend mit Hilfe von *Nanodrop* gemessen und auf die Ausgangslysate

umgerechnet.

Die eigentlichen Lysate wurden auf Eis aufgetaut, ein Äquivalent von 25 µg Chromatin mit 900 µl Dilutionspuffer verdünnt und mit 30 µl in Dilutionspuffer präequilibriertem Protein A/G-Sepharose Mix und 2 µl IgG (10 mg/ml) versetzt. Das sogenannte „Preclearing“ erfolgte dann bei 4 °C auf dem Rotierer für mindestens 2 h. Durch Zentrifugation wurden die Sepharose „Beads“ pelletiert und das vorgereinigte Chromatin in neue Reaktionsgefäße überführt. Je nach Antikörper wurden 1-5 µg (Abschnitt 3.14.1) in eine IP eingesetzt und die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte bei 4 °C auf dem Rotierer über Nacht, was zur Bindung des Antikörpers an das Antigen im Chromatin führen sollte. Danach wurden die ChIP-Proben erneut mit 30 µl in Dilutionspuffer präequilibrierten Protein A/G-Sepharose Mix versetzt und die Anlagerung an die „Beads“ fand bei 4 °C auf dem Rotierer für mindestens 2 h statt. Um unspezifische Bindungen an die „Beads“ zu reduzieren, wurden die ChIP-Proben anschließend mehrmals gewaschen. Dazu wurden die „Beads“ durch Zentrifugation am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt und der jeweilige Überstand mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt. Als Waschpuffer kamen Niedrigsalzpuffer, gefolgt von Hochsalz- und Lithiumchloridpuffer mit anschließendem zweimaligem Waschen in TE Puffer zum Einsatz. Die so gewaschenen „Beads“ wurden dann in 100 µl TE Puffer versetzt und RNA, Proteine und „Crosslinking“ genauso entfernt, wie es bereits für die Test-Proben beschrieben wurde. Auch die Aufreinigung und Elution der ChIP-DNA erfolgte erneut unter Verwendung des NTB Puffers und des Kits *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up* von Macherey & Nagel. Die in 50 µl Elutionspuffer eluierte ChIP DNA wurde schließlich bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.5.2 ChIP-DNA Sequenzierung (ChIP-Seq)

Die Hochdurchsatz-Sequenzierung von ChIP-DNA ermöglicht die genaue, quantifizierte Übertragung der gesamten ChIP-DNA-Sequenzen auf das menschliche Genom und erlaubt damit genomweite Aussagen und Analysen zu Bindungsereignissen am Chromatin. Die ChIP-DNA wurde dabei genauso wie unter 4.5.1 beschrieben generiert, nur die Elution in der DNA-Aufreinigung mit dem Kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up* (Macherey & Nagel) erfolgte nicht in Elutionspuffer, sondern in Wasser. Wenn nötig, wurden mit dem selben Antikörper mehrere Proben generiert, zusammengeführt und durch Evaporation auf ein Gesamtvolumen von 30 µl reduziert, sodass in diesem Volumen mindestens 10 ng ChIP-DNA enthalten waren. Diese Menge ist für eine erfolgreiche Sequenzierung notwendig und die so hergestellten Proben wurden zur weiteren Verarbeitung und Sequenzierung an das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig (AG Michael Jarek) übergeben. Hier wurden mit der immunopräzipitierte DNA „Sequencing Libraries“ mit dem *Illumina ChIP-Seq DNA Sample Prep Kit* nach Herstellerangaben erstellt. Die „Cluster“ wurden mit der *Cluster station* von Illumina generiert und die Sequenzierung erfolgte mit dem *Genome*

Analyzer I/x nach Standardprotokoll. Die Fluoreszenzbilder wurden anschließend unter Verwendung des Programms *Genome Analyzer Pipeline Analysis software 1.8* (Illumina) zu Sequenzen prozessiert.

Informationen zur bioinformatischen Analyse der Daten sind in Abschnitt 4.10.3 aufgeführt.

4.5.3 Chromatin-Reimmunopräzipitation (ReChIP)

Der sogenannte ReChIP ist eine Erweiterung des normalen ChIP-Experiments um nachzuweisen, dass zwei verschiedene Faktoren an dieselbe Sequenz im Genom, auf demselben Allel und zur selben Zeit binden. Hierüber soll eine falsch-positive Interpretation von ChIP-Ergebnissen hinsichtlich der Interaktion von Proteinen am Chromatin ausgeschlossen werden.

Für den ReChIP wurde zunächst das bereits beschriebene ChIP-Protokoll (Abschnitt 4.5.1) mit einem Antikörper gegen den ersten Faktor von Interesse verwendet. Bei den Waschpuffern dagegen wurde nur der Niedrigsalzpuffer wie erläutert benutzt, gefolgt von einem zweimaligen Waschen mit Hochsalzpuffer. Nachdem dieser durch Absaugen von den „Beads“ entfernt wurde, erfolgte eine Zugabe von 25 µl 10 mM DTT und eine Inkubation der selbigen bei 37 °C für 20 min, wobei alle 5 min durch Vortexen durchmischt wurde. Die „Beads“ wurden durch Zentrifugation gesammelt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der eben beschriebene Schritt aus DTT-Zugabe zu den „Beads“ und Inkubation wurde wiederholt und der daraus entstandene Überstand zum ersten gegeben. Durch die Zugabe von DTT werden die spezifisch an die „Beads“ gebundenen Komplexe eluiert. Die so vereinigten Überstände wurden mit 500 µl ReChIP-Puffer verdünnt und dienen als Ausgangsmaterial für eine weitere IP. Diese wurde wie im ChIP-Protokoll beschrieben mit der Zugabe des Antikörpers gegen den zweiten Faktor bzw. einer Kontrolle mit IgG fortgesetzt, bis schließlich nach Protokoll am Ende die Aufreinigung der ChIP-DNA erfolgte und diese ebenfalls bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert wurde.

4.6 Zellkultur

4.6.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Das Auftauen der in Stickstoff gelagerten Zellen erfolgte zügig bei 37 °C im Wasserbad und die Zellen wurden anschließend in 37 °C warmen Zellkulturmedium (DMEM) resuspendiert. Dann wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche mit entsprechendem Medium überführt, das nach 24 h durch frisches Medium ersetzt wurde.

Zum Einfrieren wurden die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet, die anschließend wieder entfernt wurde. Nach einer

Inkubation im Brutschrank bei 37 °C kam es zur Ablösung der Zellen, die schließlich in 3 ml kaltem Einfriermedium (DMEM, 20% FKS, 10% DMSO) resuspendiert und auf zwei vorgekühlte Kryoröhrchen verteilt wurden. Die Kryoröhrchen wurden anschließend bei -80 °C gelagert bzw. zur längeren Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

4.6.2 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 6% CO₂ und 96% Luftfeuchtigkeit im entsprechenden DMEM Medium (Abschnitt 3.4.5) kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 4-5 Tage oder bei Erreichen der Konfluenz in der Zellkulturflasche. Dabei wurde der Überstand der Zellen entfernt, diese zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und 1 bis 2 ml Trypsin/EDTA pro 175 cm² Flasche hinzugefügt. Dieses bewirkte bei einer Inkubation im Brutschrank für 2-4 min die Ablösung der Zellen, welche dann in frischem Medium resuspendiert und in einem definierten Verhältnis auf eine neue Zellkulturflasche mit DMEM-Vollmedium überführt wurden.

4.6.3 Stimulation und Ernten von Zellen

Bei einer Stimulation mit dem Zytokin IL1 α (f.c. 10 ng/ml) wurde dieses direkt in das auf exakt gleiche Volumina gebrachte Vollmedium zu den Zellen gegeben und auf diesen für die jeweils im Ergebnisteil angegebenen Zeiten belassen. Auch der in dieser Arbeit verwendete TAK1-Inhibitor 5(Z)-7-Oxozeaenol (f.c. 1 μ M) wurde direkt ins Vollmedium gegeben und zwar 30 min vor Beginn der Stimulation mit IL1 α .

Bei einem CHIP wurden die Zellen wie in Abschnitt 4.5.1 geerntet. Für andere Anwendungen erfolgten zunächst zwei Waschschriffe mit eisgekühltem PBS, bevor die Zellen in ebenfalls kaltem PBS abgekratzt und resuspendiert wurden. Nach einer Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation (5 min, 3000 rpm, 4 °C) wurden diese direkt lysiert oder bis zur weiteren Verarbeitung in Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

4.7 Indirekte Immunfluoreszenz mit Kernfärbung

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz können Proteine und deren Lokalisation in der Zelle unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Die Durchführung dieser Methode erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Katja Handschick (AG Kracht, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie).

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden 30 μ l einer definierten Zelldichte in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und nach 1 h im Brutschrank mit 100 μ l Medium pro Kammer aufgefüllt. Nach 24 h wurden 100 μ l Medium entfernt und die Zellen zweimal innerhalb von 5 min mit 150 μ l Hanks-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μ l 4%igem Paraformaldehyd in Hanks-Puffer für 5 min fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Zellen zweimal für 5 min mit 150 μ l Hanks-Puffer gespült und dann in 100 μ l 10%igem Serum

(verdünnt in Hanks-Puffer mit 0,1% Saponin) für 30 min bei RT geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit 100 µl Primärantikörper für 2 h bei RT. Die Antikörper wurde 1:50-1:200 in Hanks-Puffer mit 0,1% Saponin verdünnt. Die Zellen wurden dreimal für 10 min mit 150 µl Hanks/0,1%Saponin-Puffer gewaschen, bevor die Inkubation mit 100 µl Cy3- oder FITC-gekoppelten Sekundärantikörpern für weitere 2 h im Dunkeln erfolgte. Die Sekundärantikörper wurden auch in Hanks/0,1%Saponin-Puffer verdünnt (Cy3-gekoppelter Antikörper 1:200; FITC-gekoppelter Antikörper 1:100). Die Zellen wurden anschließend erneut dreimal für 10 min mit 150 µl Hanks-Puffer gewaschen. Für die Zellkernfärbung wurden die Zellen für 5 min in 100 µl einer 1 µM Hoechst-Lösung (verdünnt in Hanks-Puffer) inkubiert. Hoechst 33342 (Invitrogen) interkaliert zwischen benachbarten Basen der DNA und ermöglicht somit die Färbung der Zellkerne. Die Zellen wurden dann zweimal innerhalb von 5 min mit 150 µl Hanks-Puffer gewaschen und für die Dauerlagerung mit 50 µl einer 30%igen Glycerollösung (verdünnt in Hanks-Puffer) versetzt. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte an einem Leica *DM IRE2* Mikroskop. Das Bearbeiten der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der *FW4000* und Leica *Deblur Software*.

4.8 DNA-Methylierungsanalyse

4.8.1 *In-vitro* Methylierung

Die *in-vitro* Methylierung spielt für alle DNA-Methylierungsanalysen eine wichtige Rolle, da die so behandelte genomische DNA als methylierte Kontrolle dient und so die Überprüfung der angewandten Methode ermöglicht. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte wie im Abschnitt 4.1.1 beschrieben. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration in einer Verdünnung am *Nanodrop* wurden 10µg DNA in die *in-vitro* Methylierung eingesetzt. Diese Probe wurde in 10 µl NE Puffer resuspendiert, mit 0,5 µl SAM und 3 µl DNA-Methyltransferase versetzt und mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Dann erfolgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht, wobei nach 2-3 h erneut 0,5 µl SAM zugegeben wurden. Nach abgeschlossener Inkubation wurde die Probe mit TE auf 150 µl aufgefüllt und durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (Abschnitt 4.1.1) die DNA extrahiert. Zur weiteren Aufreinigung wurde eine Natriumacetat-Fällung eingesetzt, wie sie ebenso unter Abschnitt 4.1.1 bereits beschrieben wurde, bei der die DNA am Ende in 20 µl TE Puffer gelöst wurde. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration mittels *Nanodrop* wurde die *in-vitro* methylierte DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.8.2 Bisulfit-Behandlung

Die Bisulfit-Reaktion stellt den entscheidenden Schritt in den hier verwendeten DNA-Methylierungsanalysen dar, denn in dieser Reaktion kommt es zur Unterscheidung von methylierter und unmethylierter DNA. Bei der sogenannten Bisulfit-Umwandlung werden

Cytosine der DNA in einem nukleophilen Angriff unter sauren Bedingungen deaminiert, falls die Aminogruppe der Cytosine nicht durch eine Methylgruppe geschützt ist. Diese Umwandlung von Cytosin in Uracil führt nach einer PCR zur Ersetzung eines „CG“s durch ein „TG“. Diese Veränderung lässt sich dann durch verschiedene Techniken wie MS-PCR oder Bisulfit-Sequenzierung auslesen.

In die Bisulfit-Behandlung wurde stets eine Probe genomische und eine Probe *in-vitro* methylierte DNA eingesetzt. Dazu wurden je 2 µg DNA mit TE auf 18 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurden die zu verwendenden Lösungen frisch angesetzt (Abschnitt 3.4.4). Zu jeder Probe wurden 2 µl 3 M NaOH-Lösung zugegeben und es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 15 min. Anschließend wurden die Proben mit je 208 µl Bisulfit-Lösung und 12 µl 0,1 M Hydrochinon-Lösung versetzt und bei 55 °C über Nacht inkubiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte dann mit Hilfe des Kits *Wizard DNA Clean-up System* von Promega nach Herstellerangaben, wobei die DNA in 50 µl Wasser eluiert wurde. Zu dieser eluierten DNA wurden schließlich je 5 µl 3M NaOH-Lösung gegeben und die Proben wurden für 15 min bei 37 °C inkubiert. Zur weiteren Aufreinigung der DNA erfolgte schließlich noch eine Natriumacetat-Fällung, wie unter Abschnitt 4.1.1 beschrieben, die DNA wurde in 50 µl TE Puffer gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.8.3 Methylierungsspezifische PCR (MS-PCR)

Bei dieser Methode zur Auswertung von DNA-Methylierungsanalysen wurde eine PCR, wie unter Abschnitt 4.2.1 beschrieben, mit methylierungssensitiven Primer-Paaren durchgeführt. Darunter versteht man Primer, die in ihrer Sequenz ein bis zwei „CG“s enthielten und in zwei Varianten entworfen wurden. Ein Primerpaar war spezifisch für unmethylierte DNA und enthielt anstelle des „CG“s ein „TG“. Das andere Primerpaar war spezifisch für methylierte DNA und beinhaltete die Ursprungssequenz, die bei methylierter DNA durch die Bisulfit-Behandlung unverändert sein sollte. Beide Primer sollten unter gleichen PCR-Bedingungen funktionieren und ähnlich effizient sein. Als Kontrolle diente *in-vitro* methylierte DNA. Da die Primer außerdem „CG“s innerhalb von „CpG-islands“ der zu analysierenden Genpromotoren enthalten sollten, ist das Design solcher Primer sehr komplex erfolgte für diese Arbeit unter Zuhilfenahme der Programme *BiSearch* (<http://bisearch.enzim.hu/>) und *MethPrimer* (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>). Nach der Durchführung der PCR mit den entsprechenden methylierungssensitiven Primern konnte anhand der Signalstärken der Methylierungsgrad des „DNA-templates“ an den enthaltenen Sequenzen bestimmt werden.

4.8.4 Bisulfit-Sequenzierung

Eine andere Möglichkeit den Methylierungsgrad von DNA zu bestimmen, besteht darin die durch Bisulfit-Behandlung (Abschnitt 4.8.2) modifizierten Proben in Vektoren zu klonieren

und diese anschließend sequenzieren zu lassen. Dazu wurden Primer verwendet, die in einer PCR zur Amplifikation eines DNA-Abschnitts innerhalb eines „CpG-islands“ des zu analysierenden Genpromotors führen, angepasst an die durch Bisulfit-Behandlung modifizierte Sequenz (Abschnitt 3.12.5). Dabei war zu beachten, dass die Bindung der Primer unabhängig von einer Methylierung war, also die Primer-Sequenz selbst im Gegensatz zum PCR-Produkt keine „CG“s enthielt. Das so amplifizierte PCR-Produkt (1 µl) wurde anschließend in den Vektor *TOPO TA* mit Hilfe des Kits *TOPO TA Cloning Kit* von Invitrogen kloniert und in kompetente *E.coli Top10* (Abschnitt 3.10) wie unter Abschnitt 4.3.2 beschrieben transformiert. Die so transformierten Bakterien wurden auf „IPTG/X-Gal/Kanamycin“ Agarplatten (Abschnitt 3.1.1) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Das *TOPO TA* System von Invitrogen erlaubt die Blau/Weiß-Selektion und so wurden am nächsten Tag weiße Bakterienklone von den Platten gepickt (erfolgreiche Transformation und Integration des „Inserts“) und für die Mini-Präparation in 4 ml LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft. Nach einer Inkubation bei 37 °C und 160 rpm über Nacht erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA in kleinem Maßstab, wie unter Abschnitt 4.1.1 beschrieben. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde anschließend zur Sequenzierung zu LGC Genomics geschickt und unter Verwendung des Primers M13 (Abschnitt 3.12.5) sequenziert. Durch Abgleich der enthaltenen „CG“s und Prüfung der Veränderung zu „TG“ konnten Rückschlüsse auf den Methylierungsgrad der DNA der jeweiligen Probe gezogen werden.

4.9 SDS-PAGE und Western Blot

4.9.1 Lysate zur Immunodetektion im Western Blot

Wenn nicht anders angegeben, wurde eine sogenannte Speziallyse durchgeführt. Bei dieser handelt es sich um ein Ganzzelllysate aus eukaryotischen Zellen. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt um eine Degradation von Proteinen zu vermeiden. Die Zellen wurden, wie unter Abschnitt 4.6.3 beschrieben, geerntet und die Zellpellets wurden in einem entsprechenden Volumen an Speziallysepuffer resuspendiert (für ein 6-Well wurden 50 µl verwendet). Die resuspendierten Zellen wurden 15 min inkubiert und anschließend 15 min bei 10600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt. Die so gewonnenen Lysate eigneten sich dann für Western Blot Analysen nach SDS-PAGE, zum Beispiel zum Test von Antikörpern.

Zur Trennung der zellulären Proteine in drei verschiedene Fraktionen (cytosolische Fraktion, lösliche Kernfraktion, Chromatinfraktion) wurde eine fraktionierte Lyse angewandt. Dabei wurde zunächst das Zellpellet in „fraktionierte Lysepuffer I“ resuspendiert (300 µl für eine 145 cm² Schale) und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde für 1 min bei 2300 xg (4 °C)

zentrifugiert, wobei anschließend der Überstand mit den cytosolischen Proteinen (C) in ein frisches 1,5 ml Gefäß überführt wurde. Das Pellet wurde in „fraktionierte Lysepuffer II“ resuspendiert (Volumen siehe Puffer I) und 20 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Zellsuspension zweimal kurz gevortext und nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 20400 xg (4 °C) wurde der Überstand (Kernfraktion 1, N1) in ein frisches 1,5 ml Gefäß pipettiert. Um die Chromatin-Kernfraktion zu erhalten, wurde das Pellet in „fraktionierte Lysepuffer III“ (Volumen siehe Puffer I) durch kräftiges Vortexen gelöst. Für den kompletten Zellaufschluss wurde die Suspension 10-30 sek sonifiziert (Branson Sonifier, Stufe 2) und anschließend 50 min auf Eis inkubiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt (5 min, 20400 xg, 4 °C) wurde der Überstand überführt, der die unlöslichen Kernproteine (Chromatin-Kernfraktion, N2) enthielt. Alle Fraktionen wurden direkt nach der Proteinbestimmung aufs Gel aufgetragen oder bei -80 °C gelagert.

4.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Um identische Proteinmengen unterschiedlicher Proben in SDS-PAGE und Western Blot einzusetzen, mussten die einzelnen Proteinkonzentrationen der Zelllysate bestimmt werden. Dazu wurde die Bradford-Methode angewandt, die auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung beruht. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm (Bradford 1976). Die Probe wurde zunächst in PBS verdünnt. Je 100 µl dieser Verdünnung und 100 µl einer BSA (bovine serum albumin)-Standardreihe (0-35 µg/ml in PBS) wurden getrennt voneinander in eine 96-Well-Platte vorgelegt. Zu den Proben und der Standardreihe wurden nun 100 µl Farbstofflösung, welche aus einer Mischung des Farbstoffkonzentrats Roti Quant 40% (v/v) und ddH₂O 60% (v/v) besteht, zugegeben. Nach etwa 5 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Extinktion bei 595 nm im *Microplate Spectrophotometer*, was dann die Berechnung der Konzentration der Probe anhand der Standardreihe ermöglichte.

4.9.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen abhängig von ihrer Ladung und ihrem Molekulargewicht und wurde für anschließende Western Blot Analysen verwendet. Dabei bewirkt das in den Polyacrylamid-Gelen eingesetzte SDS (Natriumdodecylsulfat), dass die Proteine denaturiert und negative Ladungen in die denaturierten Polypeptidketten eingebracht werden, indem es an die hydrophoben Proteinbereiche bindet. Durch die negativen Ladungen wandern die Proteine bei dieser Methode in der Elektrophorese in Richtung der Anode.

In Abhängigkeit der Größe der aufzutrennenden Proteine wurden 8-12,5%ige Trenngele

sowie 5%ige Sammelgele verwendet:

Lösung (ml)	8%iges Trenngel	10%iges Trenngel	12,5%iges Trenngel	5%iges Sammelgel
ddH ₂ O	5,41	3,65	1,45	5,61
Trenngelpuffer	10,12	10,12	10,12	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	1,26
50% (v/v) Glycerol	2,38	2,38	2,38	0,9
2% (w/v) SDS	1,32	1,32	1,32	0,5
30% (w/v) Acrylamid	7,04	8,80	11,00	1,68
40% (w/v) APS	0,040	0,040	0,040	0,03
TEMED	0,027	0,027	0,027	0,02
Gesamt	26,4	26,4	26,4	10

Zunächst wurden alle Lösungen für das Trenngel vermischt, dann mit APS und TEMED versetzt und gegossen. Diese Stoffe bewirken das Polymerisieren des Gels und wenn dieser Vorgang abgeschlossen war, wurde das Trenngel nach dem gleichen Prinzip mit dem Sammelgel überschichtet. Die Proben wurden im Verhältnis 4:1 mit Roti-Load Auftragspuffer versetzt, 10 min bei 95 °C denaturiert, abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit den aufgetrennten Proteinen für Western Blot Analysen verwendet.

4.9.4 Western Blot und Immunodetektion mittels ECL Reaktion

Im Western Blot, hier wurde das sogenannte *semi-dry*- Verfahren angewandt, werden die Proteine aus dem Elektropheresegel auf eine Membran transferiert.

Das aus der SDS-PAGE stammende Gel mit den aufgetrennten Proteinen (Abschnitt 4.9.3) wurde für den Western Blot auf eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran gelegt und von oben und unten in jeweils zwei Lagen Filterpapier (Dicke 1,2 mm) eingelegt, welche zuvor in Blotpuffer getränkt wurden. Die Elektrophorese erfolgte für 2 h bei 0,75 mA/cm². Im Anschluss wurde der Transfer der Proteine auf die Membran mit einer 0,1%igen Ponceau S-Lösung überprüft. Nach der Dokumentation der gefärbten Proteinbanden wurde die Membran mit TBST vollständig entfärbt.

Anschließend wurde die Membran in 5% Magermilch (angesetzt in TBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses Blocken diente der Absättigung unspezifischer Bindestellen auf der Membran, bevor die Antikörper für die Immunodetektion zum Einsatz kamen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte schwenkend über Nacht, in einer Verdünnung von 1:5000 bis 1:10 000 (abhängig vom verwendeten Antikörper) in 5% Magermilch oder BSA (in TBS-T). Zur Entfernung von überschüssigen, nicht gebundenen Antikörpern wurde die Membran nach der Inkubation viermal für je 5 min mit TBS-T gewaschen (schwenkend). Der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper ermöglicht die ECL Reaktion und wurde in einer Verdünnung von 1:2000 bis 1:5000 (abhängig vom verwendeten Antikörper) in 5% Magermilch (in TBS-T) eingesetzt. In dieser Lösung wurde die gewaschene Membran für 1-3 h schwenkend bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie, wie bereits beschrieben, erneut in TBS-T gewaschen wurde. Die Detektion erfolgte anhand der Enzym-Substrat-Reaktion der HRP mit dem ECL-Reagenz. Die bei dieser Reaktion frei werdende Energie in Form von Licht konnte auf einem Film (Fujifilm) sichtbar gemacht werden.

Für den Einsatz von anderen Antikörpern auf der selben Membran wurde diese kurz in Methanol gewaschen (zur Inaktivierung des noch gebundenen Sekundärantikörpers), in TBST äquilibriert und erneut in 5% Magermilch in TBST inkubiert.

4.10 Bioinformatische/statistische Analysen

4.10.1 Microarray Daten

Die Hybridisierungssignale der cDNA Gemische mit den Oligonukleotidsonden der Microarrays wurden mit *Excel* und *Genespring GX* Version 12.0 (Agilent Technologies) von Dr. Axel Weber, AG Kracht, und Dr. Oliver Dittrich-Breiholz (Institut für Physiologische Chemie, MHH) analysiert. Die Fluoreszenzsignale wurden als "Einkanaldaten" aus "Feature Extraction" im Programm *Genespring GX* normalisiert und analysiert. Die Daten wurden \log_2 -transformiert und auf das 75-te Perzentil jedes Arrays normalisiert. Die beiden experimentellen Replikate wurden getrennt analysiert, wobei alle experimentellen Varianten im Verhältnis zur jeweiligen basalen Kontrollvariante dargestellt wurden. Von den 45015 Sonden des Arrays konnten 30359 Sonden einer EntrezGeneID zugeordnet werden. Da mehrere Sonden pro Gen und für einige Gene mehrfach dieselben Sonden auf dem Array vorkommen, waren in den 30359 Sonden 19644 Transkripte (Gene aber auch weniger gut charakterisierte Transkripte z.B. Pseudogene) mit einer EntrezGeneID enthalten. Zur Filterung mussten die Transkripte in mindestens vier von acht Hybridisierungen messbar sein und niedrig exprimierte Gene wurden über eine Intensitätsschwelle aus der Analyse ausgeschlossen. Die Berechnung dieses Schwellenwertes erfolgte aus den statistischen

Werten der Arraymessungen und ergab 61,5 Fluoreszenzintensitäten (Maximum der mittleren Hintergrundintensität aus allen acht Microarrays plus 3 mal die maximale Standardabweichung der Hintergrundintensität). Bei der Berechnung Expressionsänderungen als Verhältnisse (fold changes) aus den Intensitäten wurden zur Filterung ebenfalls Schwellenwerte eingesetzt. Dabei musste die Intensität zweifach regulierter Transkripte mindestens zweimal größer als die Schwelle sein, zur Repression im Zähler, zur Induktion im Nenner. Als Konsistenzkriterium wurde außerdem festgelegt, dass die Regulation in beiden Experimenten in die gleiche Richtung erfolgt sein muss. Gezeigte Heatmaps wurden mit dem Programm „*MeV MultiExperimentViewer*“, Version 4.8.1, 2011, (www.tm4.org and Saeed et al. (145, 146) erstellt, Venn-Diagramme mit *Genespring GX*.

4.10.2 RNA-Seq Daten

Die Analyse der Daten erfolgte durch Dr. Marek Bartkuhn (AG Rainer Renkawitz, Institut für Genetik, Justus-Liebig-Universität Gießen). Die gefundenen Sequenzen („reads“) wurden auf das menschliche Genom übertragen („mapping“), wozu das Programm *Bowtie2* von *TopHat* (164) zur Anwendung kam. Zum Abgleich mit bekannten Transkripten dienten die *hg19 RefSeq* Annotationen aus „*Illuminas iGenome repository*“ als Referenz und die so zugeordneten „reads“ wurden mit dem Programm *Cufflinks* (164) hinsichtlich der Identifikation differentiell exprimierter Gene analysiert.

4.10.3 ChIP-Seq Daten

Die Analyse der Daten erfolgte durch Dr. Marek Bartkuhn (AG Rainer Renkawitz, Institut für Genetik, Justus-Liebig-Universität Gießen). Die generelle Qualität der Daten wurden dabei mit FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) überprüft und die Sequenzen („reads“) mit dem Programm *Bowtie* auf die Genom-Referenz *hg19 RefSeq* Annotationen aus „*Illuminas iGenome repository*“ übertragen, wobei die „-k Option“ auf eins gesetzt wurde (93, 94). In die weiteren Analysen gingen nur „reads“ ein, die eindeutig einer Stelle des Genoms zugeordnet werden konnten. Für die Generierung von Bindungsprofilen und die Definition von Bindungs-Höchstpunkten (Peaks) wurden die Programme *MACS v1.41* (187) und *PeakRanger* (52) mit den Voreinstellungen (187) verwendet. Alle weiterführenden Untersuchungen entstanden unter Zuhilfenahme des Programms *R/BioConductor* (<http://www.bioconductor.org>) (57).

Zur Identifikation von Bindungs-Höchstpunkten (Peaks) mit *MACS* oder *PeakRanger* wurde ein Poisson p-Wert von unter 10^{-5} und ein FDR von weniger als 5% angenommen und für diese Peaks wurden Überschneidungsanalysen zwischen verschiedenen ChIP-DNA Proben durchgeführt. Zwei Peaks galten nur dann als überlappend, wenn ihr minimales Überschneidungsintervall bei 1bp lag. Um Unterschiede in der Bindung eines Faktors

zwischen verschiedenen ChIP-Proben zu bestimmen wurden alle Bindestellen des Faktors unter verschiedenen Bedingungen zusammengeführt und die Anzahl der jeweiligen „reads“ für diese Intervalle verglichen, wobei Veränderungen in der Besetzung mit dem Programm *DESeq* (3) ausgewertet wurden. Bei der Untersuchung von Überschneidungen in den Bindungsprofilen verschiedener Faktoren kam dagegen das Programm *BedTools suite* (138) mit eingeschalteter „-cluster“-Option zum Einsatz. Zur Visualisierung von ChIP-Seq Bindungsprofilen wurden die regelmäßigen Abdeckungsvektoren („coverage vectors“) berechnet und als Millionen „reads“ normalisiert, um Unterschieden in den „library“ Größen Rechnung zu tragen. Mit Hilfe dieser Daten wurden für einen bestimmten Faktor interessante Regionen unterschiedlicher Größen bestimmt, zum Beispiel die Peaks von Transkriptionsfaktoren. Die sogenannte „Bin“-Größe (verwendete Fenster) lag dabei bei 50bp und die durchschnittliche „read“-Dichte wurde an jeder Position berechnet um daraus kumulative Bindungsprofile zu erstellen. Zur Darstellung in einem „Genome browser“ wurden diese Profile zusätzlich geglättet, wobei dazu die „Kernel Regressionsschätzung“ Anwendung fand. Zur Darstellung kam der *Integrative Genomics Viewer* (120) zum Einsatz. Bei der Auswertung der ChIP-Seq Daten (Abschnitt 4.5.2) wurden diese auch genutzt um Enhancer-Analysen und Motivsuchen durchzuführen, ebenfalls durch Dr. Marek Bartkuhn (AG Rainer Renkawitz, Institut für Genetik, Justus-Liebig-Universität Gießen). Die grundsätzliche Enhancer-Identifikation erfolgte über die definierten Peaks der Histonmodifikationen H3K4me1 (Monomethylierung an Lysin 4 von Histon H3) und H3K27ac (Acetylierung von Lysin 27 an Histon H3) unter allen experimentellen Bedingungen. Zur Enhancer der Klasse II wurden Enhancer mit einer Abhängigkeit von IL-1 und p65 zusammengefasst, was über die Bindung von p65 und die mindestens zweifache Induktion der H3K27ac unter IL-1 Behandlung festgelegt wurde. Enhancer der Klasse I dagegen zeigten zwar auch eine p65-Bindung, aber vor allem eine Induktion in der H3K4me1. Die Weite der jeweiligen Enhancer wurde wie schon unter Abschnitt 4.5.2 beschrieben bestimmt, wobei die beiden Modifikationen H3K4me1 und H3K27ac innerhalb von 10kb gemeinsam auftreten mussten. Um innerhalb der Bindungsdaten eines Faktors nach DNA-Bindemotiven zu suchen, wurden die Sequenzen in -/+50bp Fenstern um Peak-Maxima und eigenständigen „Sub-Peak“-Maxima (definiert über die Applikation *PeakSplitter*, <http://www.ebi.ac.uk/research/bertone/software>) herum extrahiert. Diese Sequenzen wurden dann mit der Anwendung *MEMEChIP* untersucht, um sie auf neue oder bekannte DNA-Bindemotive hin zu analysieren (99).

4.10.4 Fehlerberechnungen

Fehlerberechnungen wurden über den „Standard error of the mean“ (Programm Sigma Plot, Version 11.0), sowie durch die Standardabweichung (Excel, $\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$) vorgenommen (\bar{x} = Stichprobenmittelwert, n = Stichprobengröße).

5 Ergebnisse

5.1 Der Einfluss von IL-1 auf Epithelzellen

Im Verlauf dieser Arbeit sollte die nukleäre Genregulation in der Entzündungsantwort von Epithelzellen untersucht werden. Eine Voraussetzung für alle Chromatin-orientierten Analysen dieser Arbeit war zunächst die Untersuchung des Einflusses von IL-1 auf die verwendeten KB-Zellen und die Erfassung der resultierenden Veränderungen der genomweiten Genregulation.

5.1.1 Genomweite Erfassung der TAK1-abhängig regulierten IL-1 Zielgene

In der AG Kracht zum Zeitpunkt des Beginns der Promotion bereits vorhandene, umfangreiche Zeitverlaufsexperimente zeigten, dass in humanen KB Epithelzellen 241 Gene mindestens 2-fach durch IL-1 induziert werden (Abb. S1, 81). Hierbei waren 1 h nach IL-1 Behandlung viele IL-1 Zielgene bereits sehr stark exprimiert (Abb. S1, 81). Um die Relevanz der protootypischen Signalwege (NF- κ B, p38 MAPK) für die Genexpression zu diesem Zeitpunkt global zu erfassen, wurde das gesamte „upstream signaling“ durch den zuvor bereits beschriebenen Hemmstoff von TAK1, 5(Z)-7-Oxozeaenol, gehemmt und erneut zwei unabhängige Serien an Microarray Experimenten durchgeführt. Hierzu wurden KB-Zellen mit IL-1, mit dem TAK1-Hemmstoff oder mit einem Kombinationsansatz beider Stoffe behandelt. Für die beschriebenen Ansätze wurde RNA aus den KB-Zellen isoliert (Abschnitt 4.1.2), durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (Abschnitt 4.2.2) und diese auf Microarrays hybridisiert und ausgewertet (Abschnitt 4.4.1). Anschließend wurden die globalen Effekte von IL-1 und von 5(Z)-7-Oxozeaenol auf die Anzahl induzierter bzw. reprimierter Gene als Venn-Diagramm dargestellt (Abb. 5.1A). Basierend auf einem mindestens 2-fachen Unterschied in beiden unabhängigen Experimenten, induzierte IL-1 die Expression von 159 Genen in den KB-Zellen, während der mRNA-„Level“ von nur 12 Genen unter IL-1 Behandlung abnahm. Auffällig und auch typisch für IL-1 waren die starken, dynamischen Unterschiede in der Genexpression. So wurden die zehn am stärksten induzierten Gene zwischen 37- und 706-fach hochreguliert, während 149 Gene überwiegend zwischen zwei- und fünffach induziert wurden. Behandelte man die Zellen vor der IL-1 Gabe mit 5(Z)-7-Oxozeaenol, wurden nur noch 38 der 159 Gene weiterhin durch IL-1 in ihrer Expression verstärkt. Der Inhibitor beeinflusste aber auch den geringen hemmenden Einfluss von IL-1 auf 12 Gene in entgegengesetzter Richtung und dereprimierte mehr als die Hälfte der betroffenen Gene (sieben Gene). Unter Zuhilfenahme des Programms *GeneCoDis* (25, 162, 119) wurden die in KB-Zellen durch IL-1 induzierten Gene mit *GO Biological Processes* und *KEGG Pathways* klassifiziert (Abb.5.1, B). Statistisch signifikant überrepräsentiert waren erwartbar unter anderem die Kategorien „Transkriptions- und

Apoptose-Vorgänge“, „Entzündungsantwort“ und „Antwort auf einen Cytokin-Stimulus“. Die Analyse beteiligter Signalwege ergab vor allem die Begriffe „Cytokin-Cytokin-Rezeptor Interaktion“, aber auch „Krebs-“, und „MAPK Signalwege“. Wie in der Einleitung beschrieben, rekapitulierte also die KB-Zelllinie das (patho)physiologisch relevante IL-1 Genexpressionsprogramm. Damit zeigten diese Daten, dass sich KB-Zellen sehr gut als Modell zur molekularen Untersuchung der IL-1-regulierten, nukleären Mechanismen der inflammatorischen Genregulation eignen. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse, dass mit 5(Z)-7-Oxozeaenol eine Substanz zur Verfügung stand, mit deren Hilfe fast das gesamte Genexpressionspektrum blockiert werden konnte. Diese Substanz war daher im Folgenden sehr wertvoll, um die Koppelung von TAK1 und nachgeschalteten Signalwegen an Vorgänge am Chromatin besser zu verstehen.

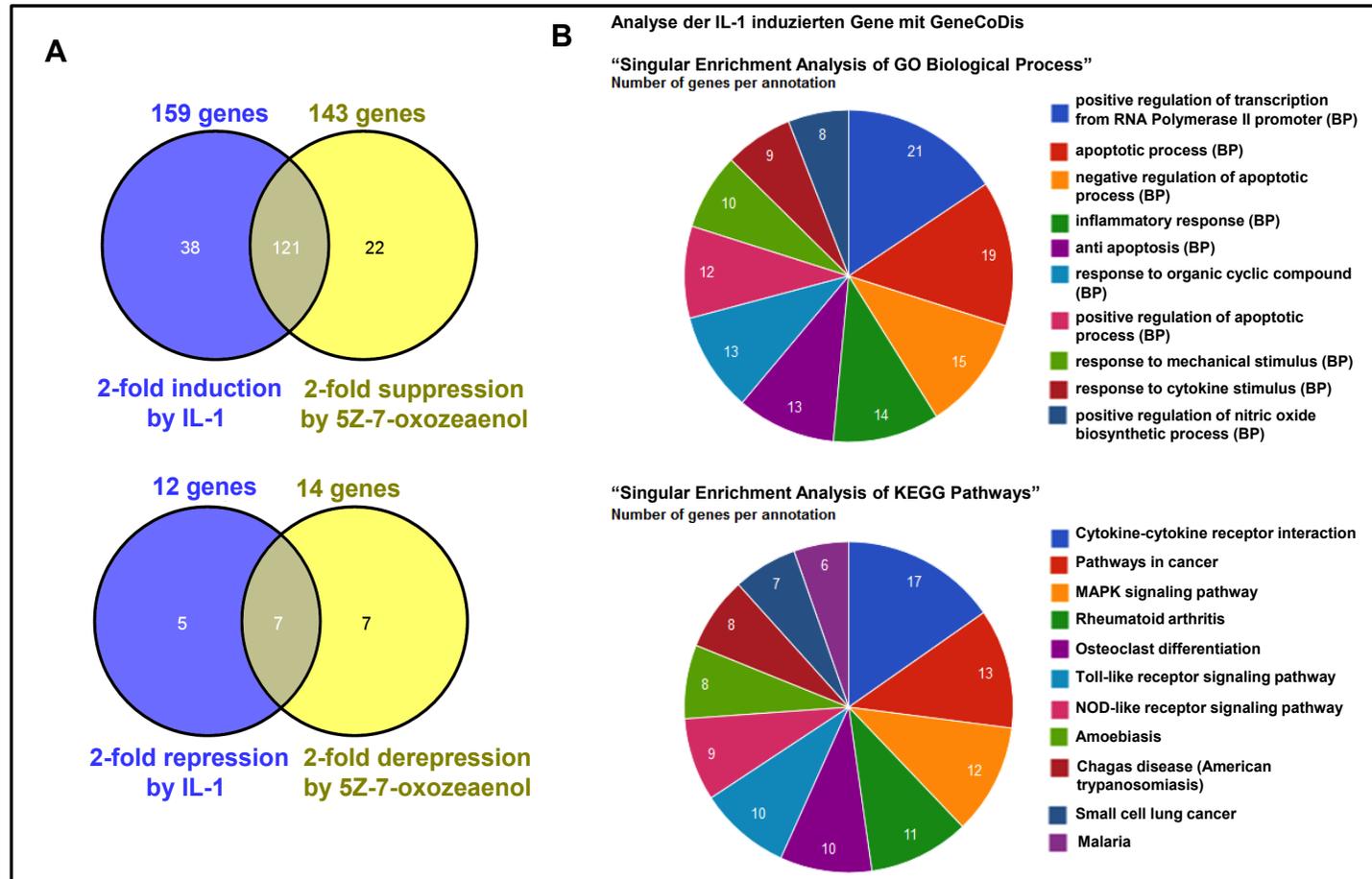


Abb. 5.1: Effekte von IL-1 und dem TAK1-Inhibitor 5(Z)-7-Oxozeaeenol auf die Genexpression in Epithelzellen

A) Die mRNA Expressionsmuster von KB-Zellen (n=2), behandelt mit IL-1 (10 ng/ml, 60 min), dem TAK1-Inhibitor 5(Z)-7-Oxozeaeenol (1 μ M, 30 min vor IL-1-Gabe) oder einer Kombinationsbehandlung, wurde mittels *Agilent Oligonukleotid Microarrays* analysiert. Im Venn-Diagramm wurden die IL-1 induzierten Gene (oben) und die IL-1 reprimierten Gene (unten) gemeinsam mit dem aufgetretenen Effekt der TAK1-Hemmung dargestellt, wobei jeweils eine mind. zweifache Regulation erfolgt sein musste (81). **B)** Die 159 IL-1 induzierten Gene wurden mit dem Programm *GeneCoDis* und den Analysen „Singular Enrichment Analysis of GO Biological Process“ (oben) und „Singular Enrichment Analysis of KEGG Pathways“ (unten) klassifiziert.

Die Darstellung der Ratio-Vergleiche der gemessenen Signalintensitäten als „Heatmap“ erlaubte die Visualisierung der mRNA Expressionsänderungen auf der Basis einzelner Gene (Abb.5.2). Diese Heatmaps wurden durch Dr. Axel Weber mit Hilfe des Programms *MeV* (*MultiExperimentViewer*) erstellt, wobei die angegebene Farbskalierung in Form einer log₂-Skala Auskunft über die gemessene Expressionsintensität gibt. Graue Felder stehen dabei für im Microarray nicht aus dem Hintergrund heraustretende Messwerte, die häufig dann auftraten, wenn die basale Expression des entsprechenden Gens in unbehandelten Zellen sehr niedrig war. Dieses ist z.B. für das Gen *IL8* der Fall. Dargestellt sind die Ratios der Fluoreszenzintensitäten der beiden Experimente im Vergleich zu den Werten aus den jeweiligen unbehandelten Kontrollzellen. Da die Ratio der Werte aus (Kontrollzellen/Kontrollzellen) den Wert eins ergibt, wird die entsprechende Spalte als einheitlicher weißer Farbton abgebildet.

Zur weiteren Beurteilung der Ähnlichkeit der Expressionsmuster bzw. der Konsistenz der IL-1 Regulation und des Hemmeffektes des TAK1-Inhibitors wurden die Ratio-Daten anhand des Mittelwertes sortiert und mit Farbcodes versehen, welche die Induktion und die Hemmung für jedes Gen anzeigen. Der hellere violette Farbcode steht dabei für IL-1 induzierte Gene und der hellblaue für die mindestens 50%-ige Hemmung dieses Effekts durch den TAK1-Inhibitor. Der dunklere Farbcode markiert dagegen durch IL-1 gehemmte Gene und erneut die Aufhebung des Effekts durch den Inhibitor. In der ersten Grafik sind die Gene dabei so sortiert worden, dass sich oben in der Liste das Gen mit der stärksten IL-1 Induktion befindet, unabhängig von einem möglichen Einfluss des TAK1-Inhibitors. In der zweiten Grafik dagegen erfolgte die Sortierung abhängig von der Hemmung des IL-1-Effektes durch 5(Z)-7-Oxozeaenol. Ganz oben findet man also die am stärksten von diesem Inhibitor in ihrer IL-1-Induktion gehemmten Gene. Dazu gehörten unter anderem Gene wie *EGR1*, *IL8* und *CCL20*. *IL8* findet sich als Gen mit der stärksten IL-1 Induktion in KB-Zellen in der ersten Grafik in der Sortierung ganz oben. Dieses Gen war also nicht nur sehr stark IL-1 induzierbar, sondern in diesem Effekt auch deutlich durch den TAK1-Inhibitor hemmbar. Es eignete sich also besonders als Modellgen bei der Untersuchung von IL-1- und TAK1-abhängigen Regulationsvorgängen in Epithelzellen. Analyisierte man die Daten hinsichtlich vorhandener Gencluster, rückte der CXC-Chemokinen-Cluster auf Chromosom 4 (Abschnitt 2.2.3) in den Fokus. Gene dieses Clusters, zu dem auch *IL8* selbst gehört, sind unter anderem die CXC-Chemokine *CXCL1*, *CXCL2* und *CXCL3*. Die Microarray-Experimente ergaben, dass die 4 Gene dieses Clusters in KB-Zellen zu den am stärksten IL-1 induzierten Genen gehörten und zudem alle durch den TAK1-Inhibitor gehemmt werden konnten (Abb.5.3). In unbehandelten Zellen waren die Gene des Clusters, wie die meisten hier dargestellten IL-1 Zielgene, nur sehr schwach oder nicht messbar exprimiert (Abb.5.2 und 5.3).

Um bei der Untersuchung der nukleären Genregulationsvorgänge in Epithelzellen auch die signalabhängige Koregulation ganzer Gencluster miteinzubeziehen, bietet sich dieses Cluster also als „Modellgencluster“ an.

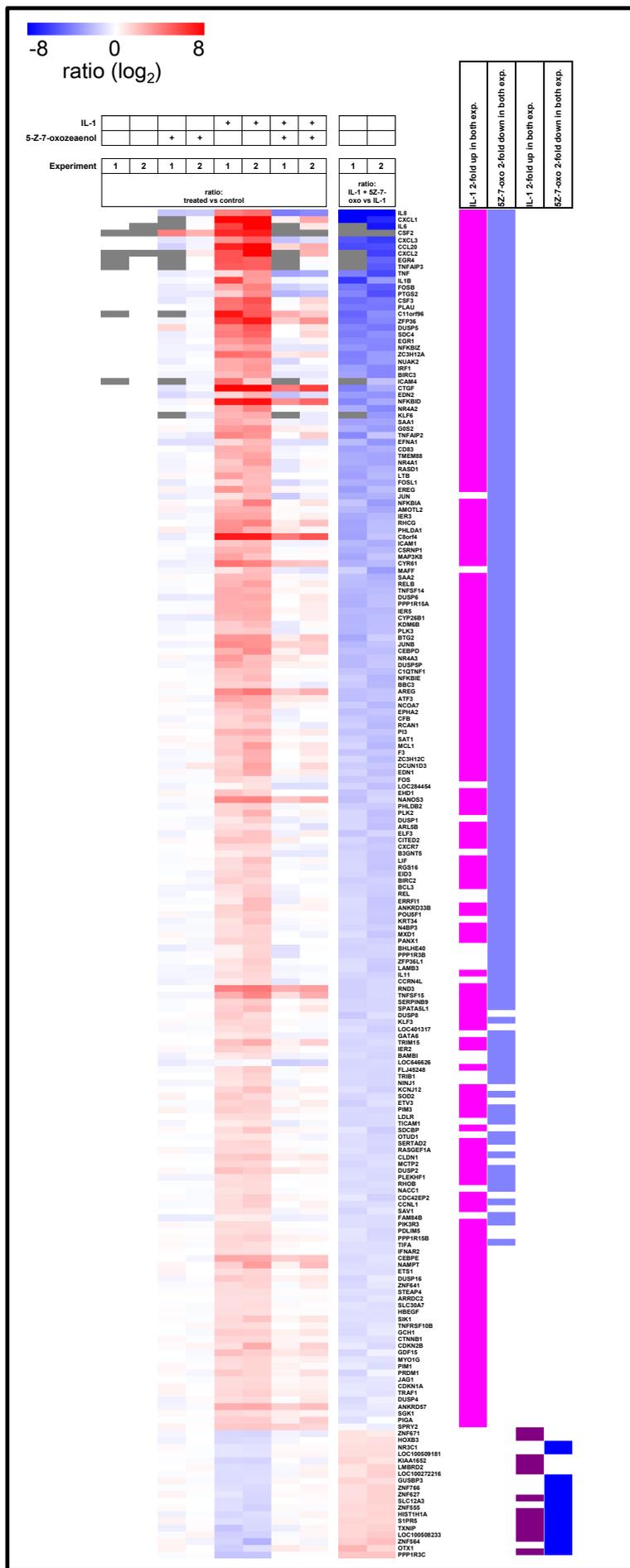


Abb. 5.2: „Heatmap“-Darstellung der veränderten Genexpression erlaubt die Auflistung aller unter IL-1 und dem TAK1-Inhibitor regulierten Gene

Die Microarray Daten zu den genomweiten Expressionsveränderungen in KB-Zellen wurden als Heatmap ausgewertet (\log_2 -Skala), um die Effekte von IL-1 und dem TAK1-Inhibitor den einzelnen Genen zuordnen zu können. Die beiden biologischen Replikate (Experiment 1 und 2) wurden in Spalten direkt nebeneinander aufgeführt. Die Ratio aus Behandlung gegen die unbehandelte Kontrolle findet sich jeweils in einem Block zusammengefasst, die Ratio aus IL-1 Behandlung gegen Kombinationsbehandlung im zweiten Block. In ersten Grafik findet man die Gene mit der stärksten IL-1 Induktion oben, während in der zweiten Grafik die Gene oben stehen, deren IL-1 Induktion am stärksten durch den TAK1-Inhibitor gehemmt wurden. Farbcodierung (Sortierung nach dem Mittelwert der normalisierten Ratios): hellviolett – IL1-induziert, hellblau – Hemmung der Induktion durch TAK1-Inhibitor, dunkelviolett – IL-1-gehemmt, dunkelblau – Derepression durch TAK1-Inhibitor). Alle aufgeführten Gene zeigten in beiden Experimenten mindestens einen zweifachen Effekt nach IL-1 oder 5(Z)-7-Oxozeaenol Behandlung. Graue Kästen markieren Werte, die über dem Hintergrund nicht messbar waren (Maximale Hintergrundintensität + 3 x maximale Standardabweichung der Hintergrundintensität entspricht 123 Fluoreszenzeinheiten). Zur besseren Lesbarkeit wurde ein Teil der Grafik in Abb. 5.3 vergrößert dargestellt.

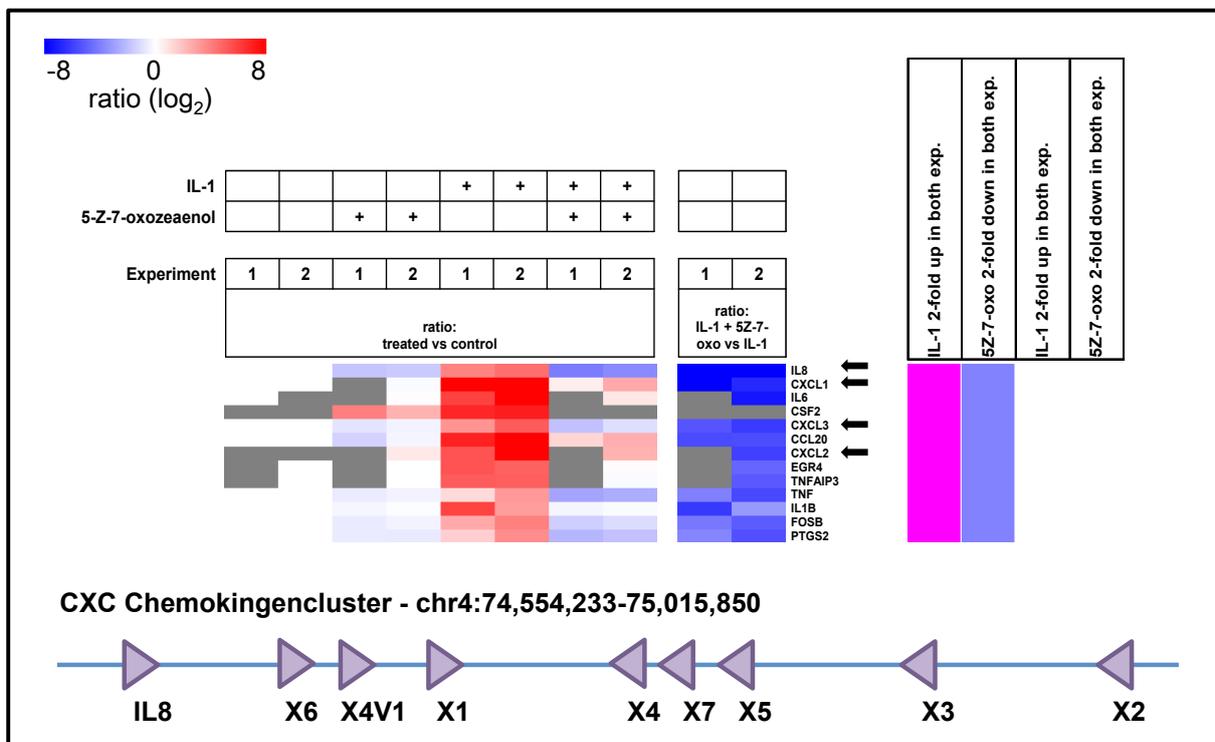


Abb. 5.3: Die in Epithelzellen am stärksten IL-1 induzierten Gene gehören zu einem gemeinsamen Gencluster

Dargestellt ist ein vergrößerter Ausschnitt der in Abb.5.2 gezeigten Heatmap mit den am stärksten IL-1 induzierten Genen. Die Pfeile markieren Zielgene, die einem gemeinsamen Gencluster auf Chromosom 4 angehören. Dieses ist in der unteren Grafik stark vereinfacht abgebildet und zeigt alle zugehörigen Gene, wobei der violette Pfeil die Transkriptionsrichtung reflektiert. IL8: Interleukin 8/CXCL8, X6: Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 6/CXCL6, X4V1: Platelet Factor 4 Variant 1/PF4V1/CXCL4V1, X1: Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1/CXCL1, X4: Platelet Factor 4/PF4/CXCL4, X7: Pro-Platelet Basic Protein/PPBP/CXCL7, X5: Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 5/CXCL5, X3: Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 3/CXCL3, X2: Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 2/CXCL2.

5.1.2 IL-1- und TAK1-abhängige Modulation wichtiger Signalproteine und Transkriptionsfaktoren in KB Zellen

Für das Verständnis und die Untersuchung von Chromatinfaktoren, welche die oben beschriebenen, drastischen Genexpressionsveränderungen bewirken könnten, wurde im Folgenden zunächst die Expression, die subzelluläre Verteilung und die Aktivierung wichtiger Proteine aus den NF- κ B und MAPK Signalwegen untersucht. Hierzu wurden Immunoblots von per SDS-PAGE separierten Proteinen aus Zellextrakten sowie Immunfluoreszenz-Mikroskopie Untersuchungen der KB Zellen durchgeführt. Letzteres Verfahren erlaubt unter anderem zusätzlich die Beurteilung der Uniformität der IL-1 Antwort innerhalb der KB-Zellpopulation, was eine wichtige Information für die Interpretation der später durchgeführten weitergehenden Experimente darstellte. Bei den Immunfluoreszenz-Analysen standen zwei Proteine im Fokus: Zum einen NF- κ B p65 selbst, zum anderen der Transkriptionsfaktor c-Fos.

In unbehandelten KB-Zellen konnte die NF- κ B-Untereinheit p65 nur sehr schwach im Kern detektiert werden (Abb.5.4, Abschnitt 4.7), deutlich stärkere Signale waren dagegen im Cytoplasma sichtbar. Die Signale zeigten innerhalb der Kompartimente eine eher gleichmäßige Verteilung. Nach einer IL-1 Behandlung kam es zur Translokation großer p65-Mengen in den Zellkern, das nukleäre Signal nahm deutlich zu und lag dann über der cytoplasmatischen Immunfluoreszenz von p65. Dieser Effekt konnte mit sehr wenigen Ausnahmen in praktisch allen Zellen der untersuchten Zellpopulation beobachtet werden und war deutlich vermindert, wenn die Zellen zuvor mit dem TAK1-Inhibitor 5(Z)-7-Oxozeaneol behandelt worden waren. In vielen Fällen ließ sich dann gar keine nukleäre Translokation mehr nachweisen, während der Inhibitor auf die basale p65-Verteilung keinen detektierbaren Einfluss zu haben schien.

c-Fos, ein gut charakterisierter, auf Protein-Ebene regulierter Transkriptionsfaktor (28, 68, 153) im IL-1 Signalweg, zeigte in der Immunfluoreszenz leicht schwächere Signale im Cytoplasma im Vergleich zum Nukleus in unbehandelten KB-Zellen (Abb.5.4). In vereinzelt Zellen waren im Bereich des Zellkerns stärkere „Spots“ sichtbar. Nach einer IL-1 Behandlung verstärkte sich das Kernsignal von c-Fos und die „Spots“ waren nur noch selten zu erkennen. Auch die Färbung im Cytoplasma erschien schwächer. Erneut wurden diese IL-1-abhängigen Effekte durch den TAK1-Inhibitor gehemmt, während der Basalzustand der Zellen unverändert wirkte. Die KB-Zellen zeigten in der IF insgesamt innerhalb der Zellpopulation eine sehr einheitliche Reaktion auf IL-1.

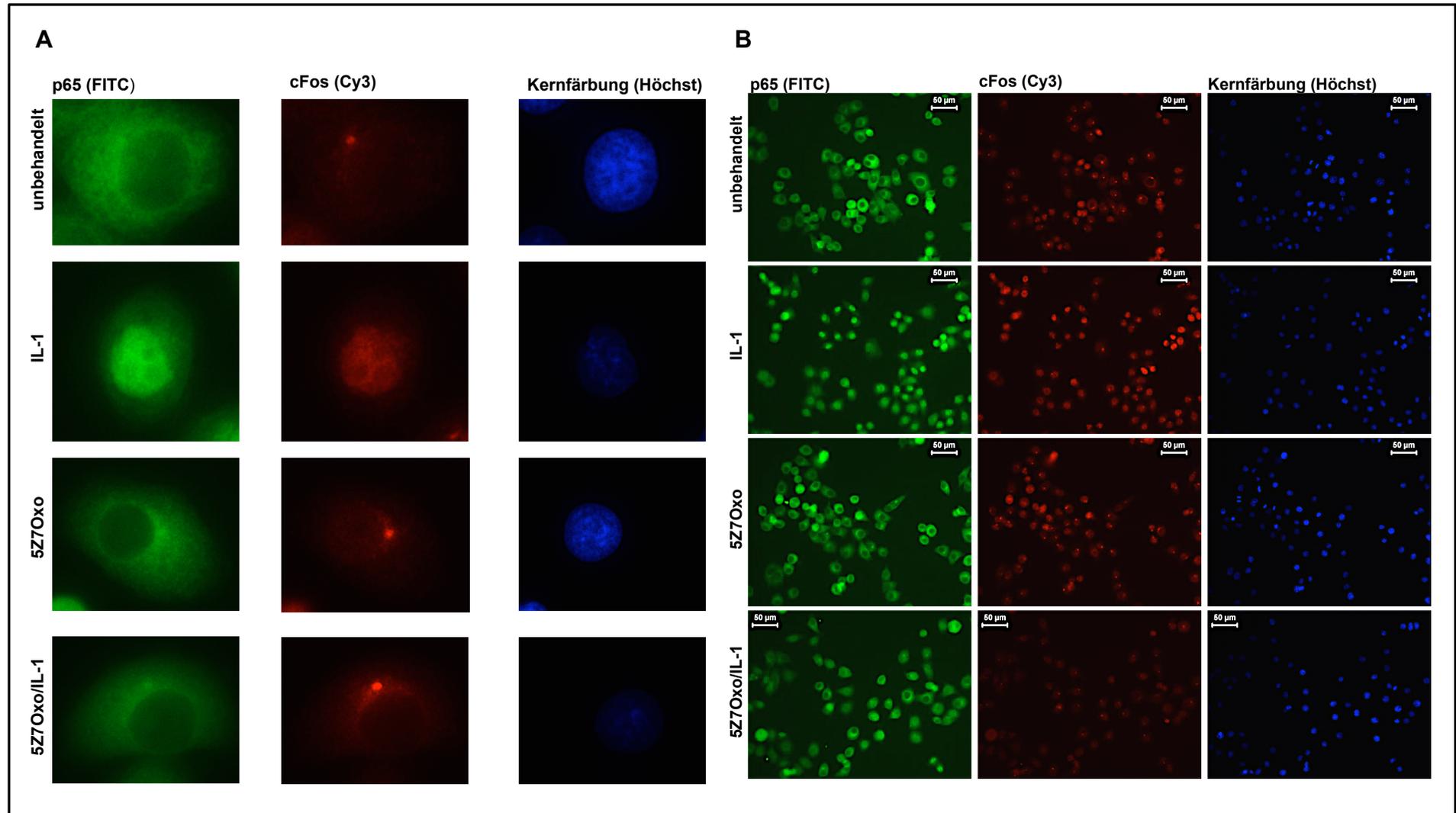


Abb. 5.4: Immunfluoreszenzanalysen in KB Zellen zeigen den IL-1 Effekt auf die Verteilung von NF- κ B p65 und c-Fos in der Zelle
 KB-Zellen wurden mit IL-1 (10 ng/ml, 60 min, IL-1), TAK1-Inhibitor (1 μ M, 30 min vor IL1-Gabe, 5ZOxo) oder einer Kombination (5ZOxo/IL-1) beider Stoffe behandelt. Die Immunfluoreszenzanalyse erfolgte wie unter Abschnitt 4.7 beschrieben, die verwendeten Antikörper sind in Klammern angegeben. **A)** Einzelzelle bei 40-facher Vergrößerung. **B)** Übersichtsaufnahme bei 20-facher Vergrößerung.

Während die Einheitlichkeit der IL-1 Reaktion innerhalb der Zellpopulation sehr gut über die IF-Analyse untersucht werden konnte, wurden zur tiefergehenden Beurteilung der subzellulären Verteilung und Aktivierung wichtiger Proteine aus den NF- κ B und MAPK Signalwegen Immunoblot-Experimente eingesetzt (Abb.5.5 und 5.6). Die fraktionierte Lyse (Abschnitt 4.9.1) erlaubte eine Trennung der Proteine nach cytosolischer Fraktion (C), löslicher Kernfraktion (N1) und Chromatinfraktion (N2) (Abb.5.5).

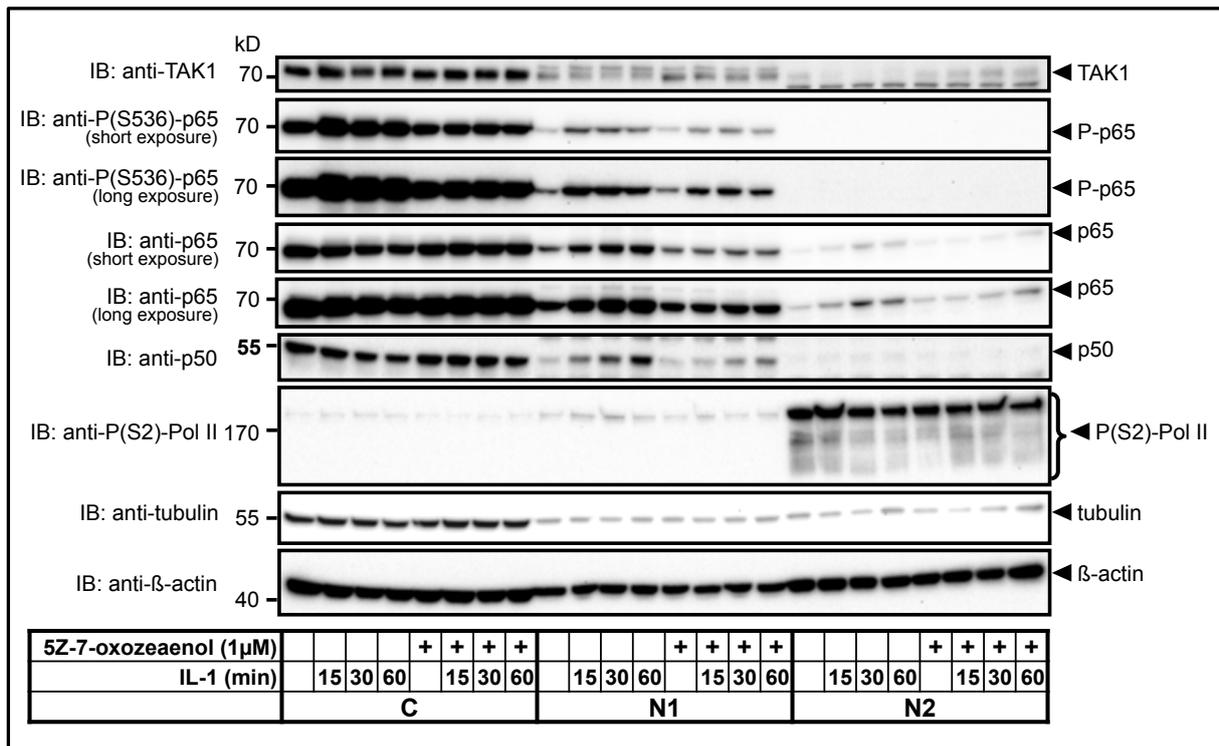


Abb. 5.5: Einfluss des TAK1-Inhibitors auf die subzelluläre Verteilung von NF- κ B
 KB-Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert, unbehandelt belassen oder zusätzlich mit dem TAK1-Inhibitor (1 μ M, 30 min vor IL-1 Gabe) behandelt. Anschließend erfolgte eine fraktionierte Lyse und Immunoblot-Analyse wie in Abschnitt 4.9 beschrieben. Aufgetrennt wurde die cytosolische Fraktion (C), die lösliche Kernfraktion (N1) und die Chromatin-Fraktion (N2). Es wurden die angegebenen Antikörper (links) eingesetzt, wobei β -Aktin, Tubulin und phosphorylierte RNA-Polymerase II als Kontrollen für gleichmäßige Beladung und Reinheit der Fraktionen verwendet wurden. Die Proteine und Isoformen mit der erwarteten Molekularmasse sind durch Pfeile markiert (rechts). Zusammenarbeit mit Helmut Müller (AG Kracht), 1 von 2 Experimenten, Abbildung aus 81, CC BY-NC-ND Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

Dabei konnte TAK1 selbst vor allem im Cytosol detektiert werden und 5(Z)-7-Oxozeaenol beeinflusste das Protein nicht in seiner Menge. Die NF- κ B Untereinheiten p65 und p50 befanden sich ebenfalls in erster Linie im Cytosol, konnten aber auch in unbehandelten Zellen bereits in der löslichen Kernfraktion festgestellt werden. Dieser Anteil stieg nach einem Stimulus erwartungsgemäß deutlich an und für p65 kam es auch zu einer Zunahme der Signale in der Chromatin-Fraktion. Diese Effekte konnten entsprechend auch an der phosphorylierten Form von p65 (S536) abgelesen werden (Abb.5.5). Unter dem Einsatz des

TAK1-Inhibitors war sowohl die nukleäre Translokation von p65 und p50 deutlich vermindert, als auch die Assoziation an das Chromatin (Abb.5.5). Das Experiment zeigte, dass p65 auch in unbehandelten Epithelzellen bereits löslich im Zellkern vorliegt. Die Rekrutierung an das Chromatin wurde aber erst nach einem entsprechenden Stimulus verstärkt, während parallel auch die Translokation größerer p65-Mengen in den Nukleus beobachtet werden konnte. Die Aktivierung von IL-1-Zielgenen durch p65-Bindung wurde folglich nicht durch die Abwesenheit von p65 im Zellkern in unbehandelten Zellen bis zum Stimulus blockiert, sondern muss vielfältiger reguliert sein. Der verwendete TAK1-Inhibitor blockierte umfangreich die Stimulus-abhängige subzelluläre Umverteilung von NF- κ B und ist daher für die folgenden Chromatin-orientierten Studien ideal.

Inwieweit dieser Inhibitor auch die Aktivierung anderer wichtiger Proteine der zugrunde liegenden Signalwege beeinflusst, wurde in einer weiteren Immunoblot-Analyse mit Gesamtzell-Extrakten untersucht (Abb. 5.6, 81). Dabei wurde sowohl eine IL-1 Zeitkinetik als auch eine Konzentrationsreihe des Inhibitors analysiert. Wie erwartet blockierte 5(Z)-7-Oxozeaenol die Autophosphorylierung von TAK1, aber auch die Phosphorylierung der Signalweg-Proteine JNK, p38, I κ B α und c-Jun downstream von TAK1. Ebenfalls zeit- und dosisabhängig reduzierte der Inhibitor die Expression der AP-1-Proteine c-Fos und c-Jun. Die Proteine ATF2, JunD, JunB und CDK6 zeigten dagegen nur schwache Effekte in Reaktion auf den TAK1-Inhibitor. Die Aufschlüsselung der genauen Folgen des eingesetzten Inhibitors auf die verschiedenen Signalweg-Proteine ermöglicht die bessere Interpretation späterer, am Chromatin gewonnener Ergebnisse.

Zusammenfassend definieren die Microarray-, Immunoblot und weiteren Analysen einen koregulierten Set an IL-1-regulierten Genen sowie eine Gruppe an TAK1-abhängig modulierten Signalproteinen, die für die TAK1-abhängige nukleäre Regulation der IL-1 Zielgene auf Ebene des Chromatins in Frage kommen könnten. Die Rekrutierung dieser Faktoren an IL-1 Zielgene wurde daher im Folgenden detailliert anhand einzelner Chemokin Gene, des gesamten CXC-Chemokingen-Clusters sowie genomweit untersucht.

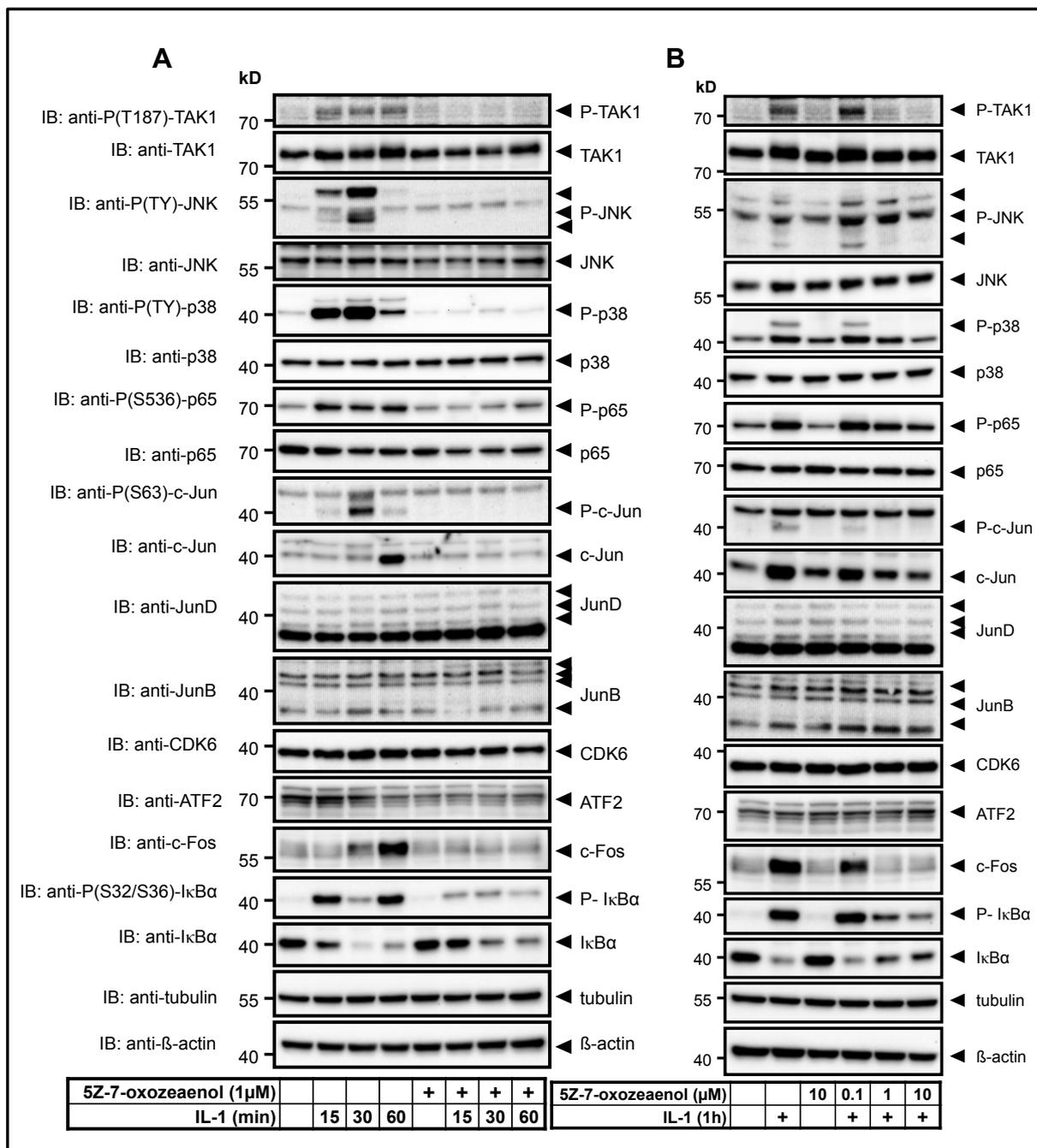


Abb.5.6: Einfluss des TAK1-Inhibitors auf wichtige Proteine der IL-1 und MAPK Signalwege

Die Immunoblot-Analyse erfolgte wie unter Abschnitt 4.9 beschrieben. Es wurden die angegebenen Antikörper (links) eingesetzt, wobei β -Aktin und Tubulin als Kontrollen für gleichmäßige Beladung verwendet wurden. Die Proteine und Isoformen mit der erwarteten Molekularmasse sind durch Pfeile markiert (rechts).

A) KB-Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert, unbehandelt belassen oder zusätzlich mit dem TAK1-Inhibitor (1 μ M, 30 min vor IL-1 Gabe) behandelt. **B)** KB-Zellen wurden wie tabellarisch angegeben behandelt, wobei entweder eine IL-1 Gabe (10 ng/ml, 60 min) alleine, in Kombination mit dem TAK1-Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, jeweils 30 min vor IL-1 Gabe) oder nur der Inhibitor (10 μ M, 30 min vor IL-1 Gabe) zum Einsatz kamen. Zusammenarbeit mit Helmut Müller (AG Kracht), 1 von 2 Experimenten, Abbildung aus 81, CC BY-NC-ND Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

5.2 Identifizierung und Charakterisierung von NF- κ B p65-Bindestellen in IL-1 induzierten Genen mittels Chromatinimmunopräzipitation (ChIP)

Im Folgenden wurde daher die Methode der ChIP in KB Zellen angewandt, um in humanen Epithelzellen die Bindestellen von NF- κ B p65 zu identifizieren sowie parallel erfolgende Histonmodifikationen zu charakterisieren. Hierzu wurde zunächst das *IL8* Gen als stärkstes IL-1-reguliertes Gen und in der Folge die weiteren Gene des Chemokin Clusters auf Chromosom 4 (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*) untersucht.

5.2.1 Die induzierbaren Gene des CXC-Chemokingen-Clusters auf Chromosom 4 besitzen eine regulierte p65- Bindestelle im Bereich des Transkriptionsstarts

Zunächst wurde der Promotorbereich von *IL8* mittels „Scanning“-ChIP auf mögliche regulierte p65-Bindestellen hin untersucht (Abb.5.8). Dieser wichtige Transkriptionsfaktor bei der IL-1-abhängigen Genaktivierung besitzt im Genom und auch im Promotor von *IL8* viele potentielle Bindestellen. So zeigte auch eine *Transfac* Analyse viele putative NF- κ B Motive in dem regulatorischen Bereich des *IL8* Promotors (Abb.5.7).

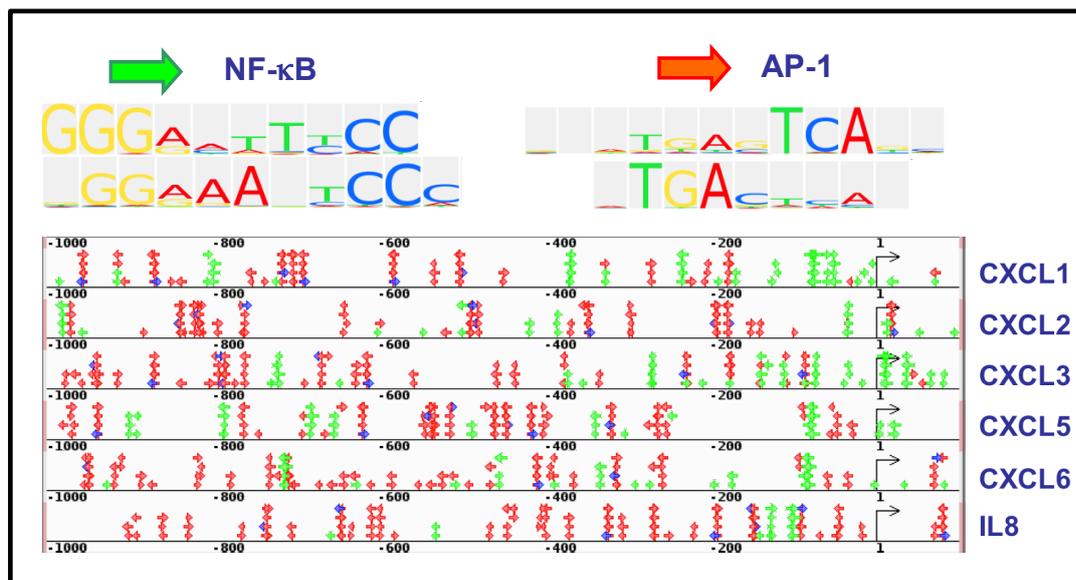


Abb. 5.7: Putative NF- κ B und AP-1 Bindungsstellen in den Promotorbereichen der Gene des CXC-Chemokingen-Clusters auf Chromosom 4

Unter Anwendung der oben dargestellten DNA-Motive von NF- κ B und AP-1 wurde in der AG Kracht eine *Transfac* Analyse für die Gene des CXC-Chemokingen-Clusters auf Chromosom 4 erstellt. NF- κ B Motive sind mit grünen, AP-1 Motive mit roten Pfeilen markiert, die Zahlen geben den Abstand vom Transkriptionsstart in Basenpaaren an (erstellt von Prof. M. Kracht).

Durch Chromatinimmunopräzipitation (Abschnitt 4.5.1) und anschließender Analyse mit Primern, die den Promotor von *IL8* überlappend abdecken („Scanning Primer“), wurde der gesamte Promotorbereich auf tatsächlich genutzte p65-Bindestellen hin überprüft. Die Auswertung der durchgeführten PCRs erfolgte initial mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 4.2.1). Zum semiquantitativen Vergleich der Signalstärken und auch der PCR-Effizienz für die verschiedenen Primerkombinationen wurden in der PCR drei verschiedene Verdünnungen des Inputs eingesetzt (1%, 0,5%, 0,1%). Der Antikörper gegen das Histon H3 erlaubte zum einen die Überprüfung der erfolgreichen Durchführung der gesamten ChIP-Prozedur und diente zum anderen auch der Bestimmung der Histondichte im untersuchten Chromatin-Abschnitt. Mit allen Primern waren Signale für Input und H3 messbar und im Abgleich dieser Signale ergaben sich zunächst keine gravierenden Unterschiede in der Histondichte (Abb. 5.8). Diese Aussage änderte sich mit den später durchgeführten, quantitativ genaueren Real time PCR Messungen. Zur Detektion von NF- κ B p65 wurden zwei verschiedenen Varianten des gleichen Antikörpers mit unterschiedlicher Konzentration verwendet (p65 und p65X, höher konzentriert). Unter diesen Bedingungen zeigten sich mit Proben aus unbehandelten KB-Zellen keine ChIP-Signale, die über dem Hintergrund lagen. Nach einer IL-1 Behandlung jedoch waren Signale im Bereich zwischen -506 bp und +82 bp messbar, wobei die stärkste Anreicherung von p65-bindenden DNA-Fragmenten im Bereich des Transkriptionsstarts (TSS) lag. Die Analyse der DNA-Sequenz ergab hier das p65 Bindemotiv „GGAATTTCC“. Dieser Befund stimmte mit der schon älteren Literatur überein, in der ebenfalls eine einzige NF- κ B Bindungsstelle mittels *IL8* Reportergenkonstrukten und Mutation bzw. progressiver Deletion bestimmt worden war (108, 109). Die Deacetylierung von p65 in der RHD („Rel homology domain“) an K122/123 ist essentiell für die Rekrutierung von p65 an das Chromatin und die Aktivierung von Genen (190). Die dafür zuständige Deacetylase HDAC3 bindet aber offenbar nicht stabil an Chromatin. Die Negativkontrollen „IgG“ (Immunglobulin G ohne Antikörper) und „H₂O“ (PCR ohne template DNA) zeigten keine Signale.

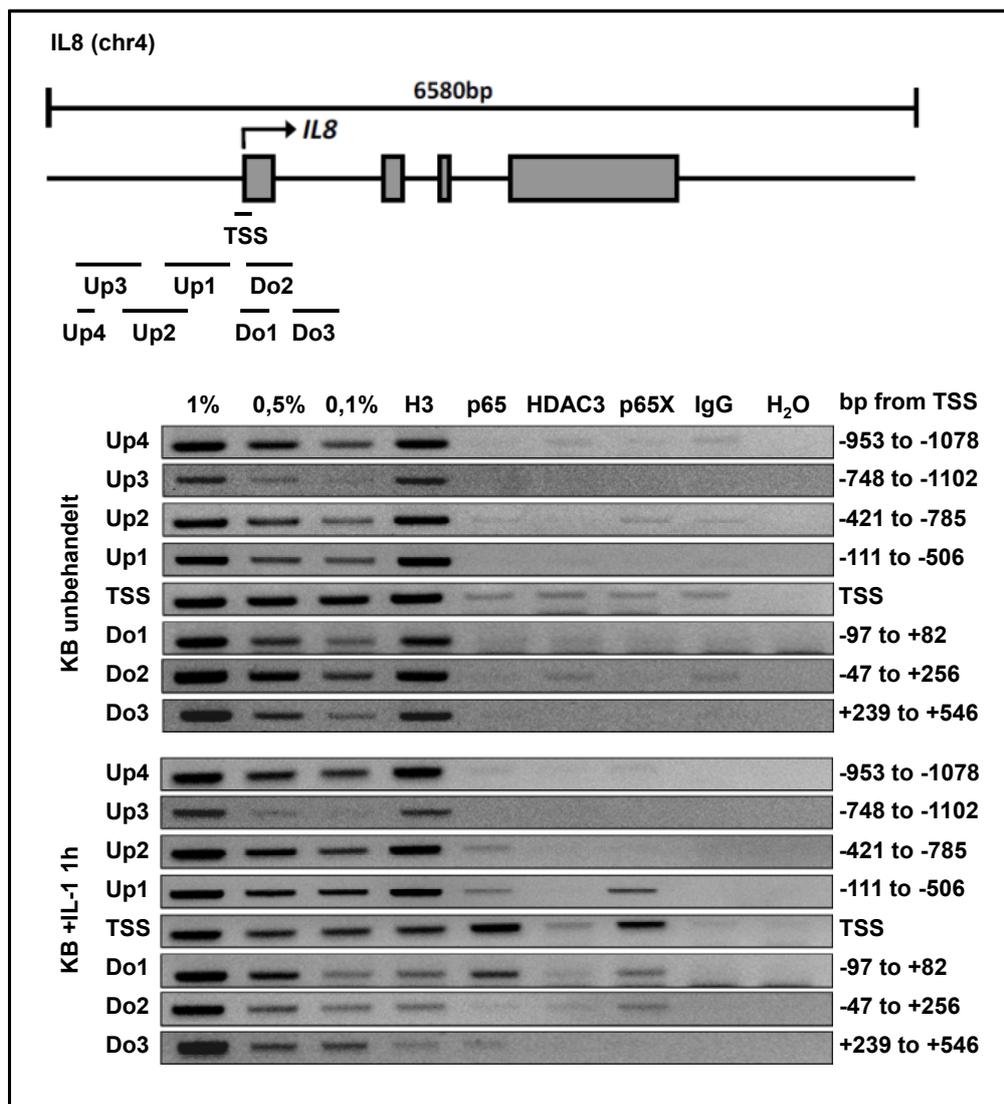


Abb. 5.8: Identifizierung der p65-Bindestelle am *IL8* Promotor durch „Scanning ChIP Primer“

Unbehandelte und mit IL-1 behandelte (10 ng/ml, 60 min) KB-Zellen wurden mittels Chromatin-Immunopräzipitation (Abschnitt 4.5) untersucht. Der Promotor des IL-1 Zielgens *IL8* wurde mit anschließender PCR (Abschnitt 4.2) unter Verwendung von überlappenden „Scanning Primern“ untersucht und in einer Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 4.2.1) aufgetrennt. Dabei wurden zwei verschiedene Varianten des p65-Antikörpers eingesetzt (p65 und p65X), außerdem Antikörper gegen das Histon H3 und HDAC3. Als Kontrollen dienten drei verschiedene Input-Konzentrationen, H₂O (Wasser als PCR template) und IgG (ChIP mit IgG statt spezifischem Antikörper).

In analoger Weise wurden anschließend auch die übrigen induzierbaren Gene des CXC-Chemokinen-Clusters auf mögliche p65-Bindestellen hin analysiert. Auch an diesen Genen wurden im Promotorbereich ähnliche p65 Bindemotive identifiziert und mittels entsprechender Primer in ChIP-Experimenten untersucht (Abb.5.9). Die Auswertung erfolgte ab diesem Zeitpunkt der Dissertation für alle Proben mit Hilfe der mittlerweile etablierten „Sybr green“-basierten Real time PCR, um noch genauere Aussagen treffen zu können. In die Analyse eingeschlossen wurden auch zwei nicht induzierte Chemokine (*CXCL6* und *CXCL5*), die anhand der vorhergehenden mRNA Analysen nicht exprimiert wurden, obwohl

sie ebenfalls vorhergesagte NF- κ B Bindungsstellen in ihren Promotoren aufweisen und im CXC-Chemokingen-Cluster liegen.

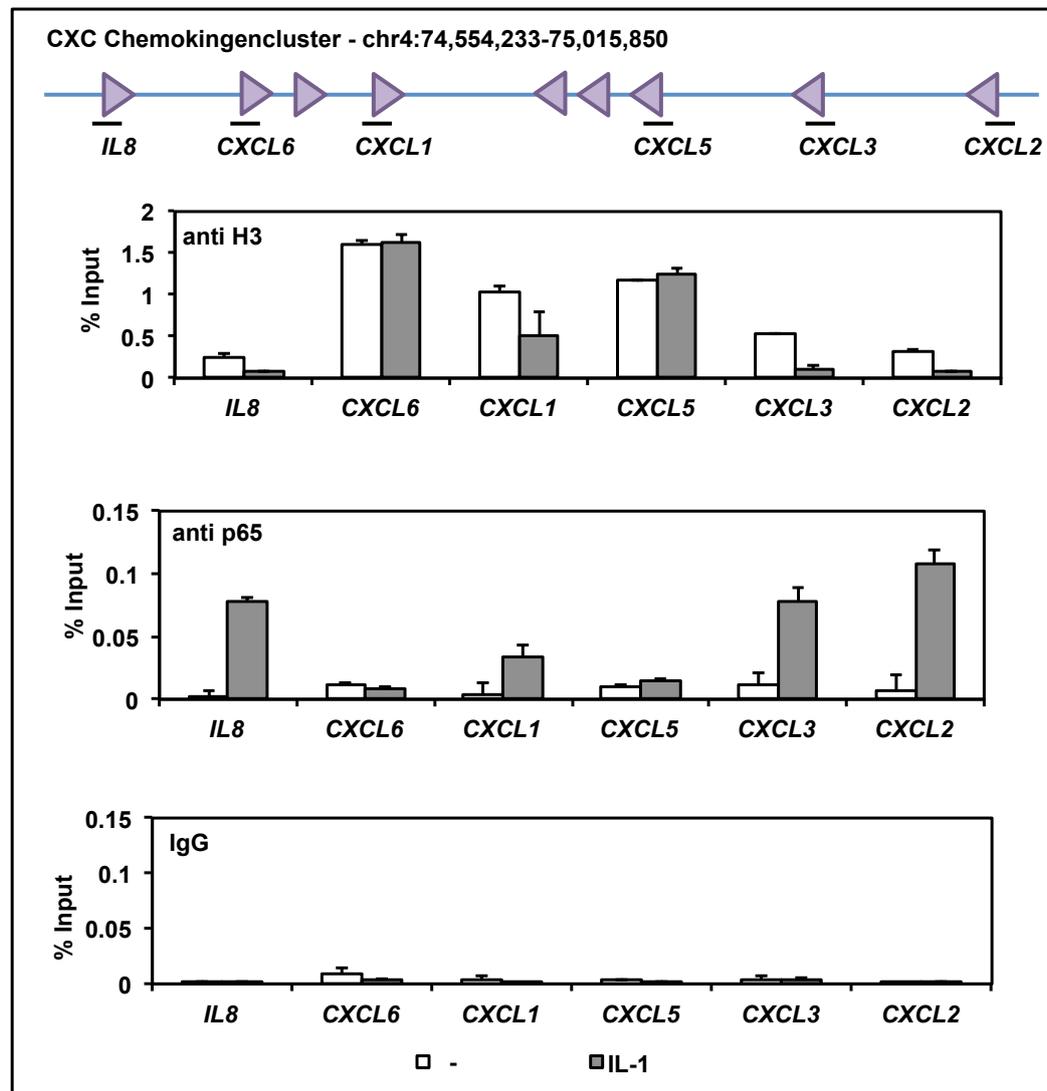


Abb. 5.9: Identifizierung der p50-Bindestellen im CXC-Chemokingen-Cluster auf Chromosom 4

Vorhergesagte, mögliche p50-Bindestellen an den Genen des Clusters wurden mittels ChIP-Experimenten ($n=3$) mit Real time PCR in unbehandelten (-) und mit IL-1 (10 ng/ml, 60 min) behandelten KB-Zellen überprüft. Neben der p50-Bindung wurde auch die Histondichte mit dem Antikörper H3 analysiert. Das Ergebnis ist in Prozent des Inputs angegeben und der Fehler entspricht der Standardabweichung (Abschnitt 4.10.4).

Die Cluster-Übersicht im oberen Teil der Abbildung 5.9 zeigt die ChIP-PCR Regionen relativ zur Lage der Gene. Anhand der Pfeile lässt sich erkennen, dass die Transkriptionsrichtung im Cluster wechselt und dass *IL8* und *CXCL2* als „flankierende“ Startgene des Clusters aufgefasst werden können. Mit allen verwendeten Primern konnte das Histon H3 nachgewiesen werden, wobei die Signale an *CXCL6* und *CXCL5* am stärksten waren. An diesen in KB-Zellen nicht IL-1 induzierten Genen blieb die Histondichte auch nach IL-1 Stimulus unverändert hoch. Alle induzierbaren Gene des Clusters dagegen zeigten im Vergleich ein niedrigeres H3-Signal und dieses nahm nach IL-1 Behandlung deutlich ab.

Neben dieser beobachteten Öffnung des Chromatins kam es an den Genen im gleichen DNA-Bereich zur IL-1 abhängigen Rekrutierung von p65. Die vorhergesagten p65-Bindestellen mit dem gleichen Motiv wie am *IL8* Promotor wurden in den Epithelzellen also tatsächlich genutzt und wiesen eine Cytokin-regulierte p65-Bindung auf. Die Signale für NF- κ B p65 lagen dagegen an den nicht induzierten Chemokinen im Bereich der Negativkontrolle „IgG“.

5.2.2 Charakterisierung des Histonstatus an p65-Bindestellen im CXC-Chemokingen-Cluster

Nach der Identifizierung IL-1 regulierter p65-Bindestellen an den induzierten Genen des CXC-Chemokingen-Clusters wurde der Histonstatus an diesen Chromatinbereichen mittels ChIP-Experimenten näher analysiert (Abb.5.8). Dabei kamen ChIP-Antikörper gegen verschiedene Modifikationen, sowohl Acetylierungen als auch Methylierungen, zum Einsatz. Diese Histonmodifikationen korrelieren mit bestimmten Chromatinzuständen bzw. mit unterschiedlicher transkriptioneller Aktivität.

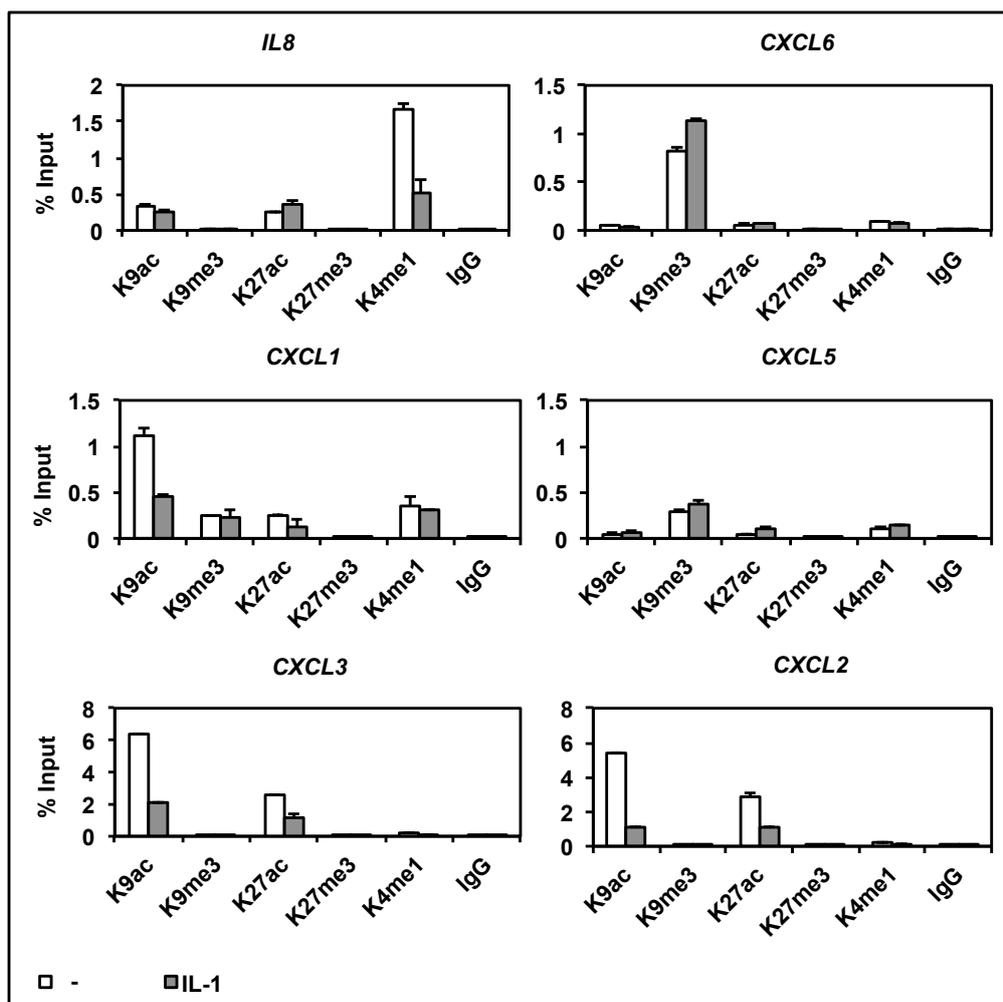


Abb. 5.10: Charakterisierung des Histonstatus an p65-Bindemotiven im CXC-Chemokingen-Cluster

Unbehandelte (-) und mit IL-1 behandelte (10 ng/ml, 60 min) KB-Zellen wurden in ChIP-Experimenten (n=3) untersucht. Dabei wurden Antikörper gegen verschiedene

Modifikationen des Histons H3 eingesetzt: K9ac: Acetylierung an Lysin 9, K9me3: Trimethylierung an Lysin 9, K27ac: Acetylierung an Lysin 27, K27me3: Trimethylierung an Lysin 27, K4me1: Monomethylierung an Lysin 4, IgG: Negativkontrolle. Die Auswertung erfolgte mittels Real time PCR. Das Ergebnis ist in Prozent des Inputs angegeben und der Fehler entspricht der Standardabweichung (Abschnitt 4.10.4).

Die Acetylierung des Lysins 9 ist eine für zugängliche Promotoren typische Histonmodifikation, die auch mit Histon-Verschiebungen in Zusammenhang gebracht wird (133). Diese Modifikation konnte an allen IL-1 induzierbaren Genen des Clusters (*IL8*, *CXCL1*, *CXCL3*, *CXCL2*) eindeutig nachgewiesen werden, aber nicht an den reprimierten Genen *CXCL5* und *CXCL6*. Das Signal für die H3K9ac nahm an den aktivierten Genen unter IL-1 Behandlung ab, wobei es an diesen Genen auch zu einer generellen Abnahme der Histondichte unter IL-1 kam (Abb.5.9). Das Lysin 9 an Histon H3 kann auch methyliert vorliegen, was mit einem Antikörper gegen diese Trimethylierung untersucht wurde. Eine solche Methylierung deutet auf transkriptionelle Repression und DNA-Methylierung hin (133) und konnte nur an den reprimierten Genen *CXCL6* und *CXCL5* mit einem leichten Anstieg des Signals unter IL-1 detektiert werden.

Neben Lysin 9 wurden in diesen Experimenten auch Modifikationen an Lysin 27 des Histons H3 analysiert. Liegt dieses Lysin acetyliert vor, weist es auf einen aktiven Enhancer/Promotor-Bereich hin (38) und kann dabei auch reguliert sein (128). Eine solche Acetylierung zeigte die stärksten Signale an den IL-1 induzierten Genen des Clusters und nahm an *IL8* sogar trotz Abnahme der Histondichte unter IL-1 Behandlung zu. Eine Methylierung dieses Lysins findet man häufig in heterochromatischen Genomabschnitten, sie gilt daher als eher stabiles „Mark“ (133) und war in keinem untersuchten Bereich des CXC-Chemokinen-Clusters detektierbar.

Zur weiteren Charakterisierung des Histonstatus an den p65-Bindestellen wurde außerdem die Monomethylierung des Lysins 4 an Histon H3 untersucht, die für transkriptionelle Aktivierung, zugängliches Euchromatin (133) oder auch potentielle Enhancer steht (38, 128). Diese vielfältigere Modifikation konnte im Cluster am stärksten am Promotor von *IL8* und *CXCL1* detektiert werden, schwächer auch an den übrigen Genen.

Anhand des Histonstatus konnte man also bereits deutlich induzierbare von nicht induzierbaren Genen des Chemokinen-Clusters unterscheiden, wobei sich alle Gene in der Umgebung von „permissiven Euchromatin“ befanden. Dieser Chromatinzustand liegt an für Transkriptionsfaktoren generell zugänglichen Genomregionen vor und weist gewöhnlich H3K4me1, aber keine H3K27me3 auf.

5.2.3 Analyse des DNA-Methylierungsstatus an den „CpG island“- Promotoren ausgewählter Chemokine

Wie bereits in Abschnitt 2.3 beschrieben, können nicht nur die Histone, sondern auch die DNA selbst, zum Beispiel durch Methylierung, modifiziert sein. Während 60-90% der CpG

Dinukleotide im Genom methyliert vorliegen, bilden „CpG-island“-Promotoren häufig eine Ausnahme (15, 74). Solche Promotoren findet man auch im CXC-Chemokinen-Cluster auf Chromosom 4. Alle Gene weisen hier ein „CpG-island“ am Promotor nahe dem Transkriptionsstart auf, mit Ausnahme von *IL8*, bei dem sich ein „offshore-CpG-island“ etwa 3000bp „upstream“ vom Transkriptionsstart befindet. Als „offshore CpG-island“ werden Genomregionen mit einer hohen „CpG“-Dichte bezeichnet, die außerhalb annotierter „CpG islands“ liegen (96).

Zur Analyse des Methylierungszustandes dieser CpG-reichen Abschnitte wurde in KB-Zellen für einige Bereiche eine Bisulfit-Sequenzierung durchgeführt (Abb.5.11 C und Abschnitt 4.8.4). In Abbildung 5.11 (C) ist das Ergebnis für den Promotor von *CXCL1* dargestellt, für welches drei Klone sequenziert wurden. Die Analyse von insgesamt 31 „CpG Dinukleotiden“ ergab einen unmethylierten Status in allen Fällen. Dieses Ergebnis diente als Kontrolle für die ebenfalls durchgeführte methylierungsspezifische PCR (MS-PCR, Abschnitt 4.8.3), mit der vergleichend der *CXCL1* und der *CXCL6* Promotor untersucht wurde (Abb.5.11, B). Das Ergebnis der MS-PCR stimmte mit dem Ergebnis der Bisulfit-Sequenzierung überein und zeigte ebenfalls einen unmethylierten DNA-Status (Primer U) an *CXCL1*. Als Kontrolle für die Methylierungsspezifität der verwendeten Primer diente eine Probe mit *in-vitro* methylierter, genomischer DNA (IV meth.), bei der nur Signale mit dem Primer für den methylierten Zustand (M) auftraten.

Als zweites Gen wurde der Promotor von *CXCL6* untersucht, als Beispiel für ein reprimiertes Gen im Cluster. Dieses war in KB-Zellen nicht IL-1 induzierbar und die MS-PCR ergab hier eine vorliegende DNA-Methylierung. Zur weitergehenden Überprüfung wurde neben der DNA aus KB-Zellen auch solche aus A549 Zellen untersucht, denn in diesen Zellen ist das Gen *CXCL6* IL-1 induzierbar. Dies geht auch aus der in Abbildung 5.11 dargestellten Heatmap (A) hervor, bei der die Ratios der mRNA-Level zwischen unbehandelten und für die jeweils angegebene Zeit mit IL-1 behandelten, verschiedenen epithelialen und fibroblastoiden Zellen in zunehmender Farbtintensität (rot) zu sehen sind. Die MS-PCR mit KB- und A549-Zellen zeigte deutlich, dass sich beide Zelltypen am *CXCL6* Promotor in ihrem DNA-Methylierungsstatus unterschieden. So war in A549 Zellen ein sehr viel größerer Anteil an Zellen mit einem unmethylierten CpG-Bereich an diesem Gen detektierbar. Die IL-1 Induzierbarkeit von Zielgenen im CXC-Chemokinen-Cluster scheint also in direktem Zusammenhang mit dem Methylierungsstatus der entsprechenden „CpG-island“-Promotoren zu stehen.

Um diese Fragestellung zu vertiefen, wurde ein Hemmstoff für DNA-Methylierung (5-aza-2'-deoxycytidin/Decitabin/DT) verwendet (31). Dieser muss über mehrere Zellteilungen hinweg auf den Zellen verbleiben, da er als „falsches“ Substratanalogon die DNA-Methyltransferasen hemmt und so während der Replikation ein Übertragen von DNA-Methylierungsmustern auf

den neu synthetisierten Strang verhindert. So reduziert sich die DNA-Methylierung im Verlauf mehrerer Zellteilungen erheblich und die Auswirkungen auf die IL-1 Induzierbarkeit der CXC-Chemokingene im Cluster konnte mittels mRNA-Analyse auf Real time PCR/Taqman-Basis untersucht werden (Abb.5.12).

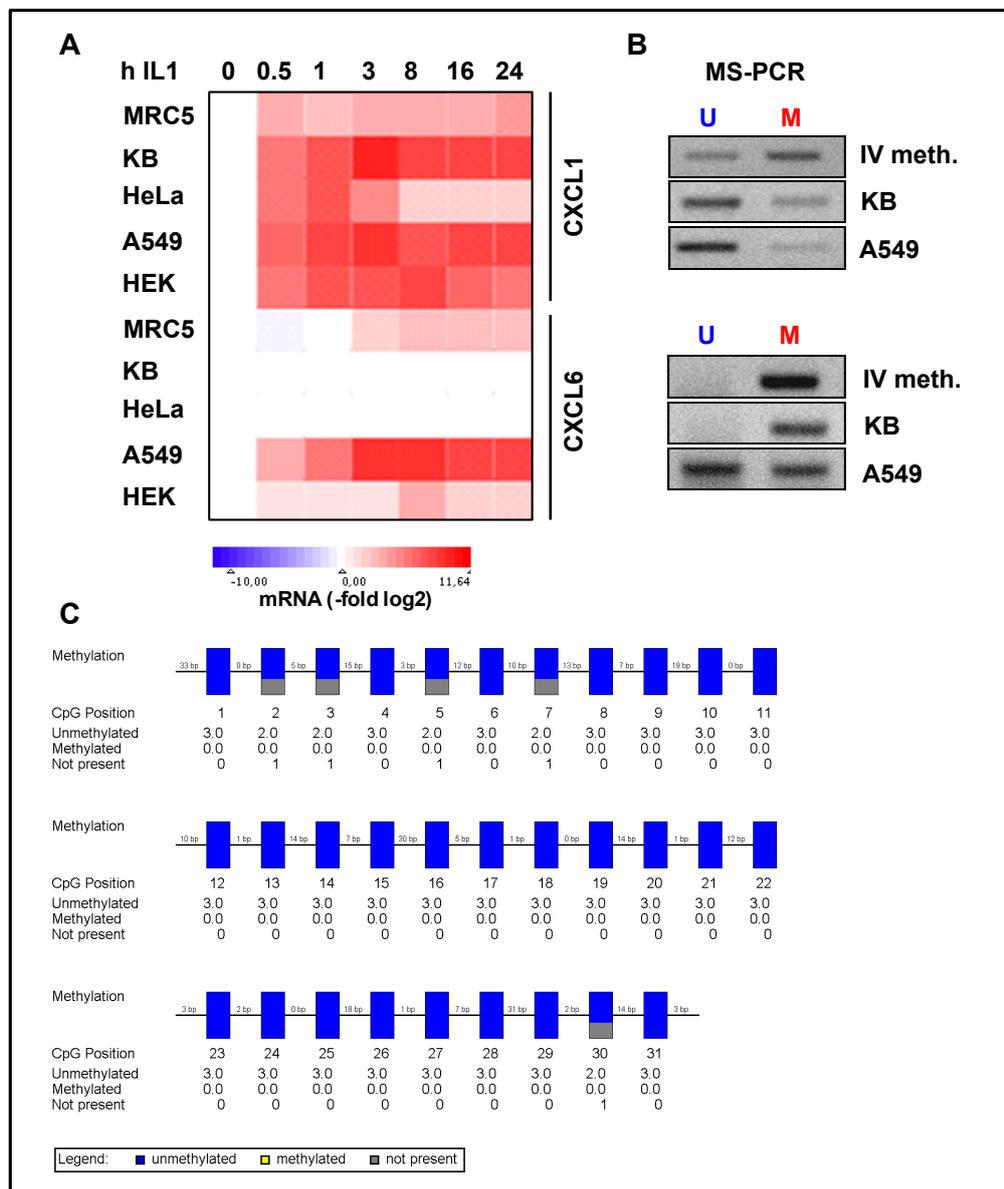


Abb. 5.11: Vergleich des DNA-Methylierungsstatus an CXCL1 und CXCL6

A) Eine Kinetik der IL-1 Induktion von CXCL1 und CXCL6 wurde auf mRNA-Level als Heatmap ausgewertet (Ergebnis Doris Newel, Dr. Daniela Kettner-Buhrow, AG Kracht, n=1). Dabei wurden verschiedene Zelllinien verwendet: MRC5 (humane, fötale Lungenfibroblasten), HeLa (humane Cervixkarzinom-Epithelzellen), A549 (humane, Adenokarzinom-Epithelzellen der Lunge). **B)** Zum Vergleich von CXCL1 und CXCL6 wurde eine MS-PCR durchgeführt, in-vitro methylierte DNA diente als Kontrolle (IV meth.). Es wurden methylierungsspezifische Primer (U: unmethylierter Zustand, M: methylierter Zustand) verwendet. **C)** Das in KB-Zellen induzierbare Gen CXCL1 wurde mittels Bisulfit-Sequenzierung auf seinen DNA-Methylierungsstatus hin analysiert. Die drei jeweils

übereinander liegenden Felder stehen für die untersuchten Klone, die Verteilung der Rechtecke auf der Linie ergibt sich aus der Lage der CpG Dinukleotide.

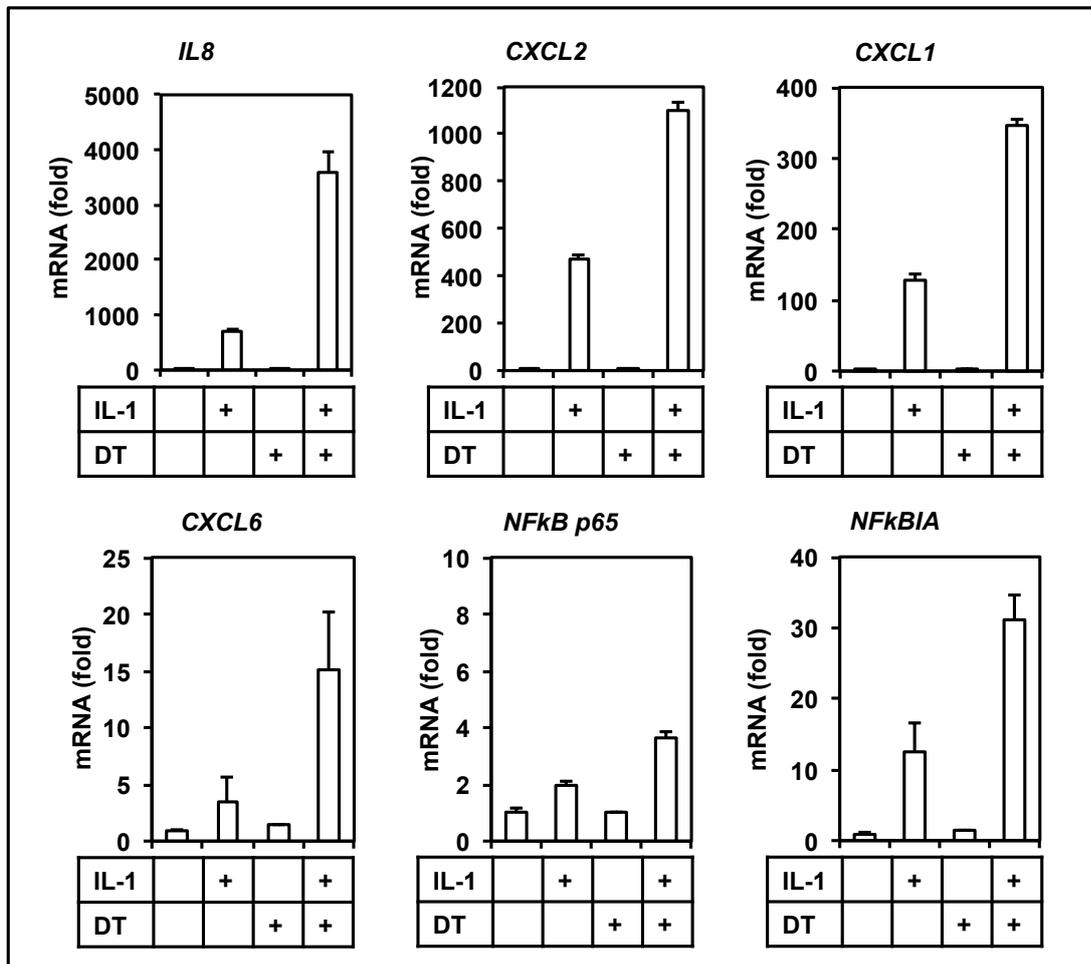


Abb. 5.12: Der Einfluss des DNA-Methyltransferase-Inhibitors Decitabin auf die IL-1 Induzierbarkeit verschiedener Zielgene

KB-Zellen wurden nur mit IL-1 (10 ng/ml, 60 min), nur mit Decitabin (DT, 10 μ M, 7 Tage mit zweimal Splitten und frischer DT Zugabe) oder mit einer Kombination (erst DT, dann IL-1) behandelt. Die mRNA wurde isoliert und nach RT-PCR mittels Taqman/Real time PCR-Analyse untersucht (n=2). Der Fehler entspricht der Standardabweichung (Abschnitt 4.10.4).

Decitabin steigerte dabei deutlich die IL-1 Induzierbarkeit des reprimierten Zielgens *CXCL6*, aber auch Gene, deren Induktion bereits ohne Decitabin messbar war, wie *CXCL1* oder *CXCL2*, wiesen zusätzlich erhöhte mRNA-Level unter vorheriger Decitabin-Behandlung auf. Beide Gene besitzen ebenfalls „CpG island“-Promotoren und betrachtet man das Ergebnis der MS-PCR für *CXCL1* (Abb.5.11) waren hier auch schwache Signale für einen methylierten Promotorstatus erkennbar. Das am stärksten in KB-Zellen induzierbare Gen ist *IL8* und auch an diesem Zielgen wurde der Decitabin-Effekt analysiert. Wie an den anderen Genen des Clusters kam es auch hier zu einer etwa dreifachen Erhöhung der IL-1 Induktion unter Decitabin-Behandlung. *IL8* besitzt zwar selbst keinen typischen „CpG island“-Promotor, aber

ein „upstream“ liegendes „offshore island“.

Im Rahmen dieser Experimente wurde auch die mRNA von NF- κ B p65 selbst untersucht. Diese war durch IL-1 allein etwa zweifach induziert, mit Decitabin-Behandlung drei- bis vierfach. Einen ähnlichen Effekt hatte Decitabin auch auf die mRNA von NF κ BIA, das eine inhibitorische Rolle im IL-1 Signalweg einnimmt. Decitabin beeinflusst also auch die Expression weiterer Signalweg-Komponenten, deren Gene wiederum selbst IL-1 Zielgene sind. Interessanterweise verstärkt Decitabin zwar die Induzierbarkeit von IL-1 Zielgenen, nicht aber deren basale Expression. Dies zeigt, dass die DNA-Methylierung zwar vermutlich an der Repression von IL-1 Zielgenen beteiligt ist, die Gene aber auch im unmethylierten Zustand der Aktivierung durch IL-1 bedürfen. DNA-Methylierung wird häufig dem längerfristigen „Shutdown“ eines Gens und zelltypspezifischen Expressionsmustern zugeschrieben (15, 16). Die weniger dynamische DNA-Methylierung steht eher im Zusammenhang mit genereller IL-1 Induzierbarkeit als mit dem schnellen Vorgang der IL-1 Induktion. Dabei spielen die schnellen, innerhalb von 1 h auftretenden Veränderungen der Histonmodifikationen, welche mit den sehr großen Unterschieden zwischen der basalen und der IL-1-induzierten mRNA Expression korrelieren, eine größere Rolle. Im Folgenden wurden daher die in diesem Zeitfenster auftretenden Chromatinveränderungen weiter untersucht.

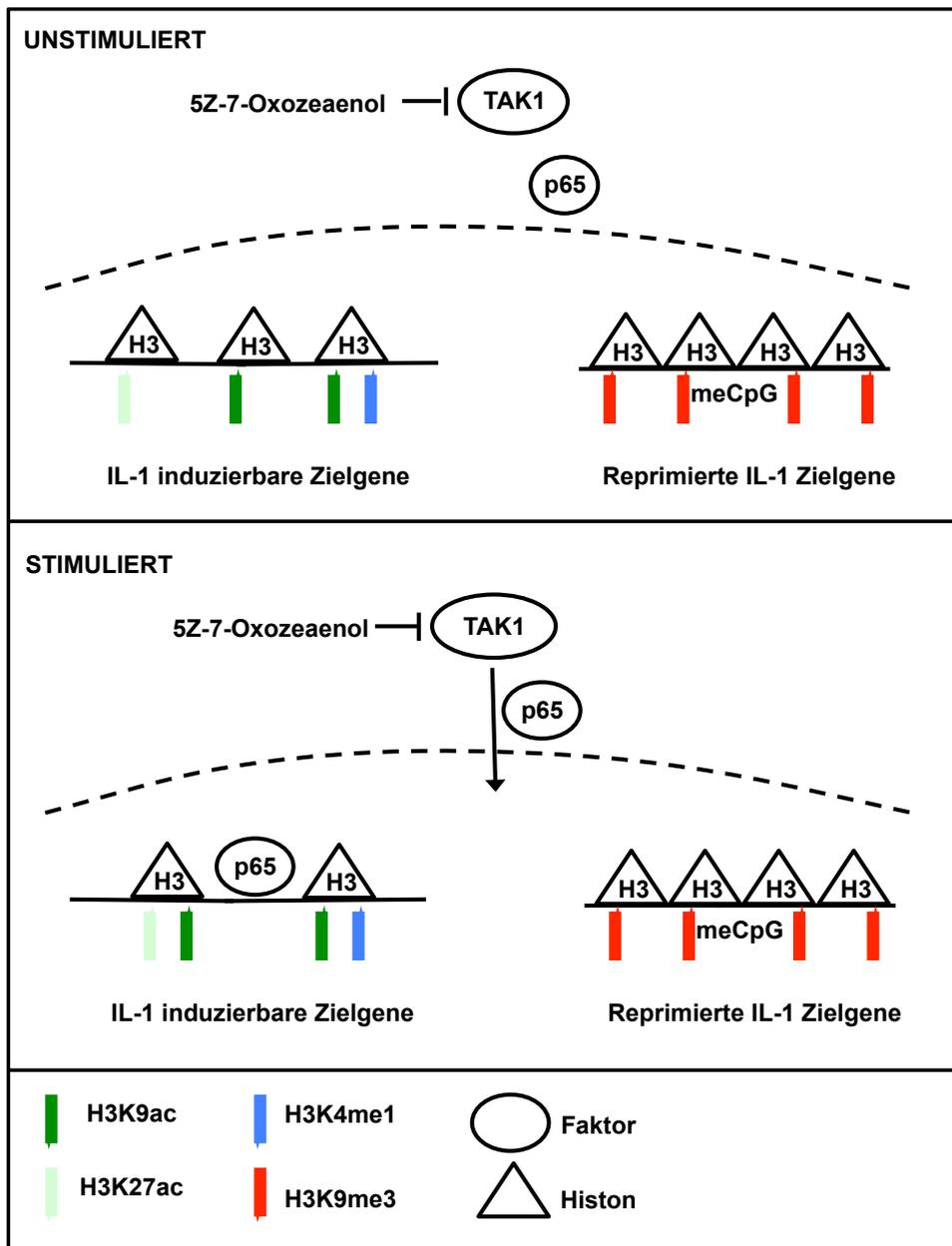


Abb. 5.13: Charakterisierung von NF- κ B p65-Bindestellen im CXC-Chemokingen-Cluster

Durch ChIP-Experimente gegen p65 und Histonmodifikationen, sowie DNA-Methylierungsanalysen, konnte der Status von IL-1 induzierbaren und reprimierten IL-1 Zielgenen im CXC-Chemokingen-Cluster charakterisiert werden. IL-1 induzierbare Zielgene wiesen eine Acetylierung des Lysins 27 (H3K27ac) und 9 (H3K9ac) an Histon H3 auf und eine Monomethylierung an Lysin 4 (H3K4me1). Die Histondichte war geringer als an reprimierten Zielgenen und der vorliegende Status erlaubte die Rekrutierung von p65. Reprimierte Zielgene zeigten kaum H3K27ac, H3K4me1 und H3K9ac und stattdessen eine starke Dreifachmethylierung an Lysin 9 des Histons H3 (H3K9me3). Das in KB-Zellen fast gänzlich reprimierte Gen *CXCL6* war außerdem durch eine deutliche DNA-Methylierung im Promotor charakterisiert.

5.3 ChIP-Seq basierte Analyse der Bindungsereignisse und Histonmodifikationen im CXC- Chemokingen-Cluster

Im Folgenden wurde die ChIP-Seq-Technik etabliert, um die Bindungsereignisse im gesamten CXC- Chemokingen-Cluster zu analysieren und den vorliegenden Histonstatus sowie IL-1 abhängige Veränderungen in hoher Auflösung zu ermitteln. Darüber hinaus erlauben ChIP-Seq-Experimente natürlich eine genomweite Erfassung und Kartierung aller Bindungsereignisse und Chromatinveränderungen.

5.3.1 Analyse der IL-1 abhängigen Rekrutierung von NF- κ B p65 und Polymerase II im gesamten CXC-Chemokingen-Cluster

In den durchgeführten ChIP-Seq Experimenten bestätigten sich die für p65 gewonnenen Erkenntnisse zu besetzten Bindestellen an den Genpromotoren der vier IL-1 Zielgene *IL8*, *CXCL1*, 2 und 3 (Abb.5.14, B). So konnte p65 innerhalb der Genpromotoren aller dieser Gene nach einer IL-1 Behandlung nachgewiesen werden, inter- oder intragenisch dagegen waren innerhalb des Clusters keine deutlichen p65-Signale sichtbar. Die detektierten Peaks lagen sehr distinkt nahe der Transkriptionsstartstelle des jeweiligen Gens. An diesen induzierbaren Genen (*IL8*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*) konnte im ChIP-Seq auch die IL-1 abhängige Rekrutierung der Polymerase II beobachtet werden, die aber ein anderes Muster als p65 aufwies und teilweise eine basale Verbindung erkennen ließ. Besonders auffällig dagegen waren zwei zusätzliche IL-1 induzierte p65-Peaks jeweils etwa 20kb „upstream“ der beiden „Startgene“ *IL8* und *CXCL2*, die in den vorangegangenen ChIP Experimenten nicht identifiziert werden konnten, da keine Informationen über diese genomischen Regionen als mögliche p65 Bindungsstellen verfügbar waren. In diesen Bereichen konnte die Polymerase II dagegen nicht nachgewiesen werden. Auch an den beiden in den mRNA-Analysen reprimierten Genen *CXCL5* und *CXCL6* waren weder am Promotor noch im intragenischen Bereich NF- κ B p65 oder Polymerase II detektierbar.

Betrachtet man das Gen *IL8* beispielhaft in vergrößerter Auflösung (Abb.5.14, A) kann man gut sowohl die IL-1 abhängige p65-Bindestelle im Bereich des Transkriptionsstarts bzw. des ersten Exons erkennen, als auch ein sehr starkes Signal für die Polymerase II im gleichen Bereich. Abgeschwächt trat dieses auch im übrigen Gen auf, mit Anstiegen innerhalb der drei Exone und einem über das letzte Exon hinaus auslaufenden Signal.

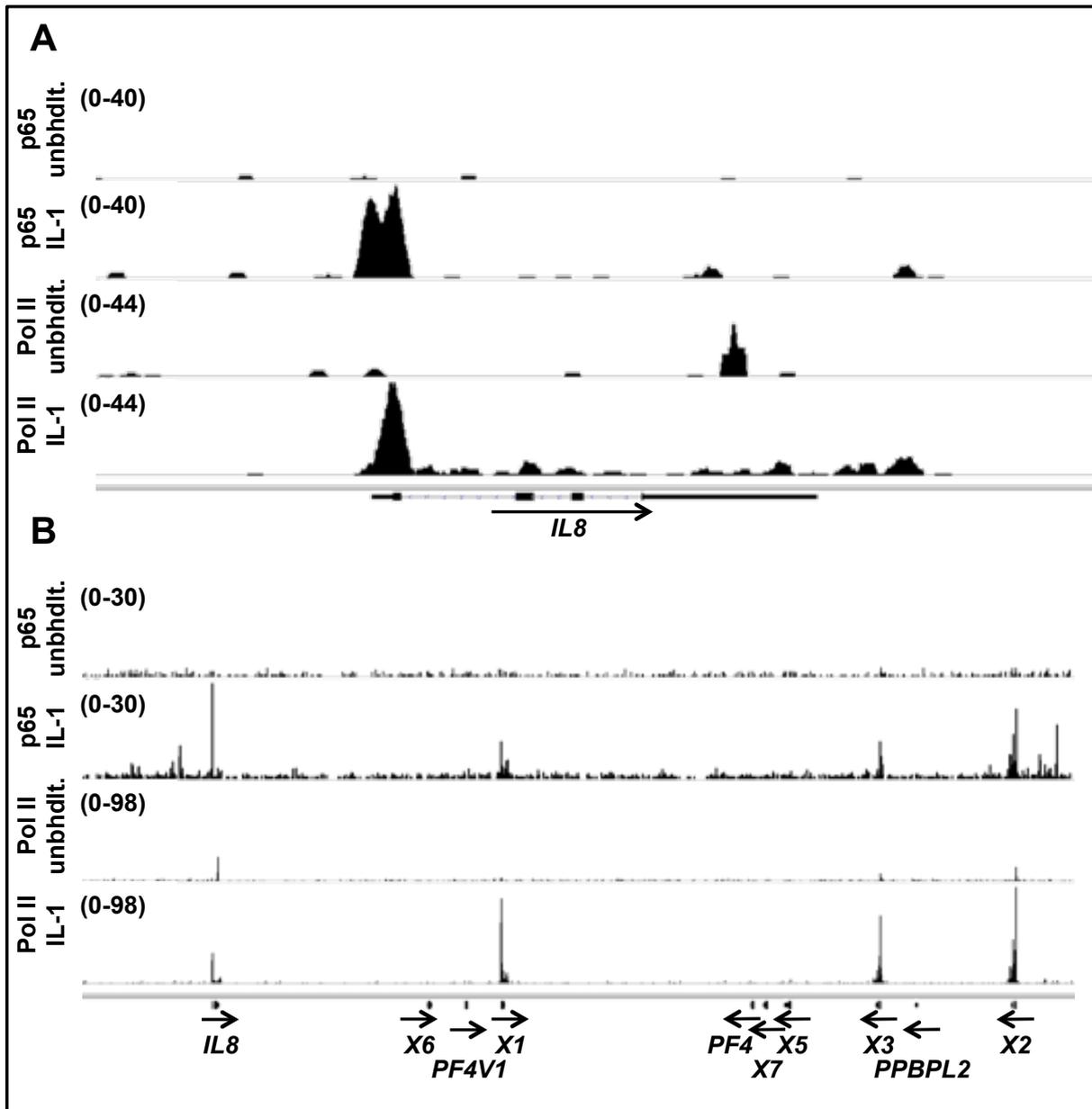


Abb. 5.14: ChIP-Seq Analyse von p65 und Polymerase II an *IL8* und im gesamten CXC-Chemokinen-Cluster

Chromatin aus unbehandelten und mit IL-1 behandelten (10 ng/ml, 60 min) KB-Zellen wurde nach der ChIP-Prozedur sequenziert. Für die Antikörper gegen p65 und Polymerase II wurden ChIP-Seq Profile erstellt, die die Beurteilung der Bindungsmuster an *IL8* (A) und über das gesamte Gencluster hinweg (B) erlauben. Die Darstellung erfolgte mit dem *IGV Genome Browser*, die Zahlen in den Klammern geben die Skalierung der „read“ Dichten an. Die Beschriftungen geben die Gennamen an (X als Abkürzung für *CXCL*), die Pfeile repräsentieren die Transkriptionsrichtung. Exone sind durch schwarze Balken gekennzeichnet, Introns durch schmale Linien.

Mit Hilfe von ChIP-Seq wurde aber nicht nur das Bindungsmuster von p65 und der Polymerase II innerhalb des Chemokinen-Clusters beurteilt, sondern auch eine Übersicht für die wichtigsten Histonmodifikationen an Histon H3 und deren Abhängigkeit von IL-1 geschaffen (Abb.5.15). Betrachtet man die Trimethylierung an Lysin 9 (K9me3) über das gesamte Cluster und mit der gleichen Skalierung wie die K9 Acetylierung (K9ac), waren diese Signale eher niedrig (Abb.5.15, A). Die K9ac wies Peaks an allen induzierbaren Genen

des Cluster auf und zeigte so eine gewisse Übereinstimmung mit dem p65-Profil nach IL-1. An den Genpromotoren selbst ergab die IL-1 Behandlung keine gravierenden Veränderungen in der K9ac, aber in den Bereichen „upstream“ der beiden „Startgene“ *IL8* und *CXCL2* waren IL-1 abhängige Anstiege zu verzeichnen. Diese interessanten Regionen jeweils zwischen den „upstream“ liegenden p65-Peaks und den Transkriptionsstartstellen waren zusätzlich durch ausgeprägte Monomethylierung an Lysin 4 (K4me1) und Acetylierung an Lysin 27 (K27ac) gekennzeichnet (Abb.5.15, B). Am auffälligsten war der deutliche Anstieg der K27ac nach IL-1 in diesen eben beschriebenen Bereichen, aber auch an manchen Genpromotoren. Während sich die K9ac auf die induzierbaren Gene *IL8*, *CXCL1*, *CXCL3* und *CXCL2* und die „upstream“ Bereiche beschränkte, zeigte die K27ac auch Signale an *CXCL5* und *PPBPL2* sowie an einigen intergenischen Loci. Solche intergenischen Signale konnten noch häufiger auch für die Modifikation K4me1 detektiert werden. Während die Signalhöhen der Peaks für die K27ac, K4me1 und K9ac innerhalb des Clusters relativ einheitlich waren, konnten für die flankierenden Bereiche des Clusters deutlich stärkere Signale gemessen werden.

Die Rekrutierung von p65 und der festgestellte Histonstatus mit K4me1 und IL-1 induzierter Acetylierung an den Lysinen 9 und 27 in den „upstream“ Regionen der Startgene deuteten auf die Identifikation von Enhancer-Bereichen dieser Gene oder des gesamten CXC-Chemokinen-Clusters hin. Solche Enhancer waren von besonderem Interesse und wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit (Abschnitt 5.6) tiefergehend analysiert.

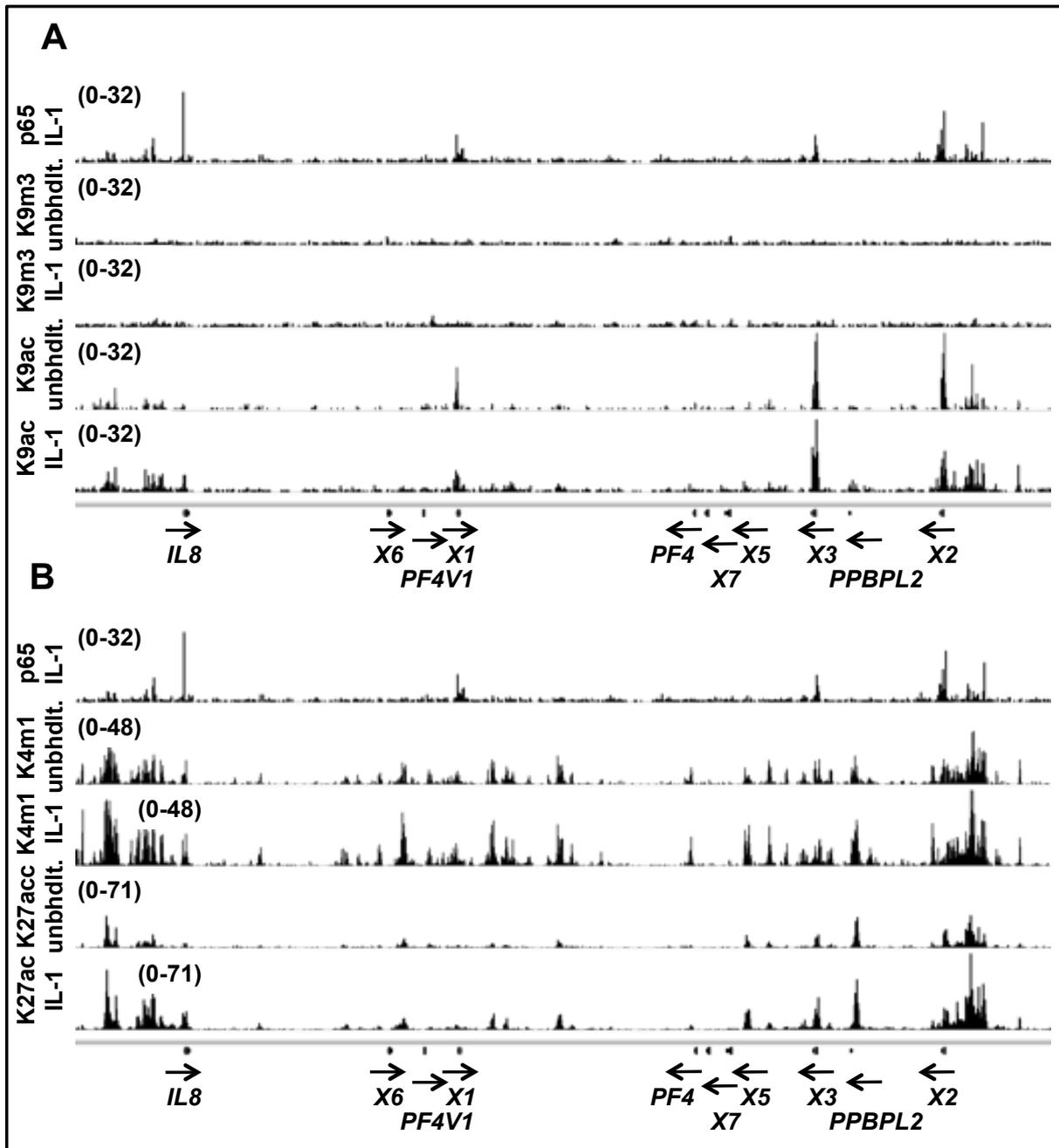


Abb. 5.15: ChIP-Seq Profile verschiedener Histonmodifikationen im CXC-Chemokingen-Cluster

Mittels ChIP-Seq wurden die zuvor im Cluster detektierten Histonmodifikationen des Hists H3 in unbehandelten und IL-1 behandelten (10 ng/ml, 60 min) KB-Zellen untersucht: **A)** K9ac: Acetylierung an Lysin 9, K9me3: Trimethylierung an Lysin 9; **B)** K27ac: Acetylierung an Lysin 27, K4me1: Monomethylierung an Lysin 4. Zum besseren Vergleich befindet sich zusätzlich das Profil von p65 nach IL-1 Behandlung in der jeweils oberen Zeile. Die Darstellung erfolgte mit dem *IGV Genome Browser*, die Zahlen in den Klammern geben die Skalierung der „read“ Dichten an. Die Beschriftungen geben die Gennamen an (X als Abkürzung für CXCL), die Pfeile repräsentieren die Transkriptionsrichtung.

5.3.2 Für die IL-1 abhängigen Chromatinveränderungen im CXC-Chemokingen-Cluster ist die Proteinkinase TAK1 essentiell

In den vorangegangenen ChIP-Seq Experimenten konnten verschiedene IL-1 abhängige Veränderungen von Histonmodifikationen innerhalb des Chemokingen-Clusters beobachtet werden (Abschnitt 5.3.1). So kam es unter IL-1 nicht nur zur Rekrutierung von p65 an die induzierbaren Genpromotoren und die beiden Enhancer-Bereiche „upstream“ der „Startgene“ *IL8* und *CXCL2*, sondern auch zur Zunahme der Acetylierungen an Histon H3 an Lysin 9 und 27, insbesondere an den Enhancern. Um die Bedeutung der Kinase TAK1 des cytosolischen IL-1 Signalweges für diese IL-1 Effekte, aber auch für den in unbehandelten Epithelzellen vorliegenden Basalzustand, zu untersuchen, kam erneut der TAK1-Inhibitor 5(Z)-7-Oxozeaenol zur Anwendung. So wurden für die beiden Histonmodifikationen ChIP-Seq Profile unter vier verschiedenen Bedingungen erstellt: unbehandelte Zellen (unbhdlt.), mit IL-1 behandelte Zellen (IL-1), mit dem TAK1-Inhibitor behandelte Zellen (5Oxo) und mit Zellen unter einer Kombinationsbehandlung (5Oxo/IL-1) (Abb.5.16).

Durch den TAK1-Inhibitor wurde an *IL8*, sowohl am Enhancer als auch am Promotor, die IL-1 abhängige Zunahme der K9ac und der K27ac deutlich gehemmt (Abb.5.16, A, B). Auf den basalen Histonstatus und insbesondere auf die H3K4me1 dagegen schien der TAK1-Inhibitor keinen Einfluss zu nehmen (Abb.5.17). Auch die Übersicht über den ganzen Gencluster zeigte ein ähnliches Bild, die Hemmung erfolgte auch am Enhancer „upstream“ von *CXCL2* (Abb.5.16, C, D). Für die übrigen Genpromotoren war dies nicht zu beurteilen, da dort keine so deutlichen IL-1 Effekte zu beobachten waren.

Während die Kinase TAK1 für den basalen Histonstatus und auch die konstitutive Translokation von p65 in den Zellkern (Abb. 5.5) keine Rolle spielte, war sie entscheidend für die Aktivierung von p65 und nahm zudem Einfluss auf IL-1 abhängige Änderungen des Histonstatus im Bereich der IL-1 Zielgene. Somit eignete sich der Inhibitor auch, um indirekt epigenetische Effekte in der Genregulation zu modulieren.

5.3.3 Die Bindungsereignisse im CXC-Chemokingen-Cluster sind übertragbar auf andere Zellsysteme und Stimulationsereignisse

Die durchgeführten ChIP-Seq Experimente führten zu interessanten Erkenntnissen über unbekannte Enhancer-Bereiche des Genclusters und zeigten nicht nur eine IL-1 abhängige Rekrutierung von p65, sondern auch IL-1 Effekte auf Ebene des Histonstatus auf. Daher stellte sich die Frage, ob diese Ereignisse nur in den KB-Zellen von Bedeutung waren oder auch auf andere Zellsysteme oder sogar Stimulationsereignisse übertragbar sind.

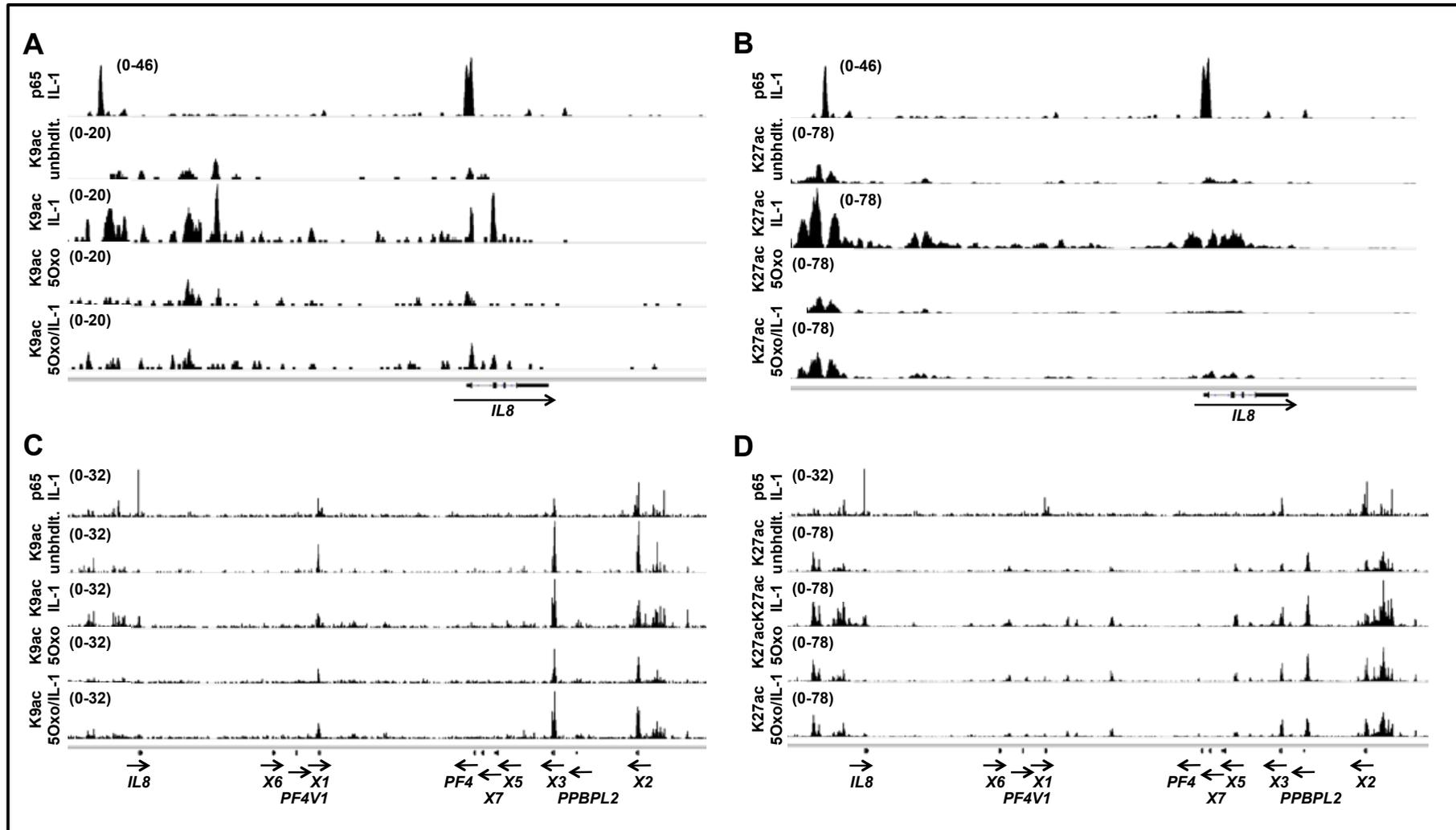


Abb. 5.16: Analyse der TAK1-Abhängigkeit der unter IL-1 Behandlung im CXC-Chemokinen-Cluster beobachteten Ereignisse

Bei diesen ChIP-Seq Experimenten wurden die KB-Zellen zusätzlich zum IL-1 Stimulus (10 ng/ml, 60 min) mit dem TAK1-Inhibitor 5(Z)-7-Oxozeaenol (1 μ M, 30 min vor IL1-Gabe) alleine oder in Kombination behandelt. Anschließend wurden die aus den Proben generierten ChIP-Seq Profile (Darstellung wie Abb. 5.15) von p65, K9ac (A und C, Acetylierung des Lysins 9 am Histon H3) und K27ac (B und D, Acetylierung des Lysins 27 am Histon H3) im gesamten Cluster (C und D) oder am *IL8* Promotor- und Enhancer-Bereich (A und B) einander gegenüber gestellt.

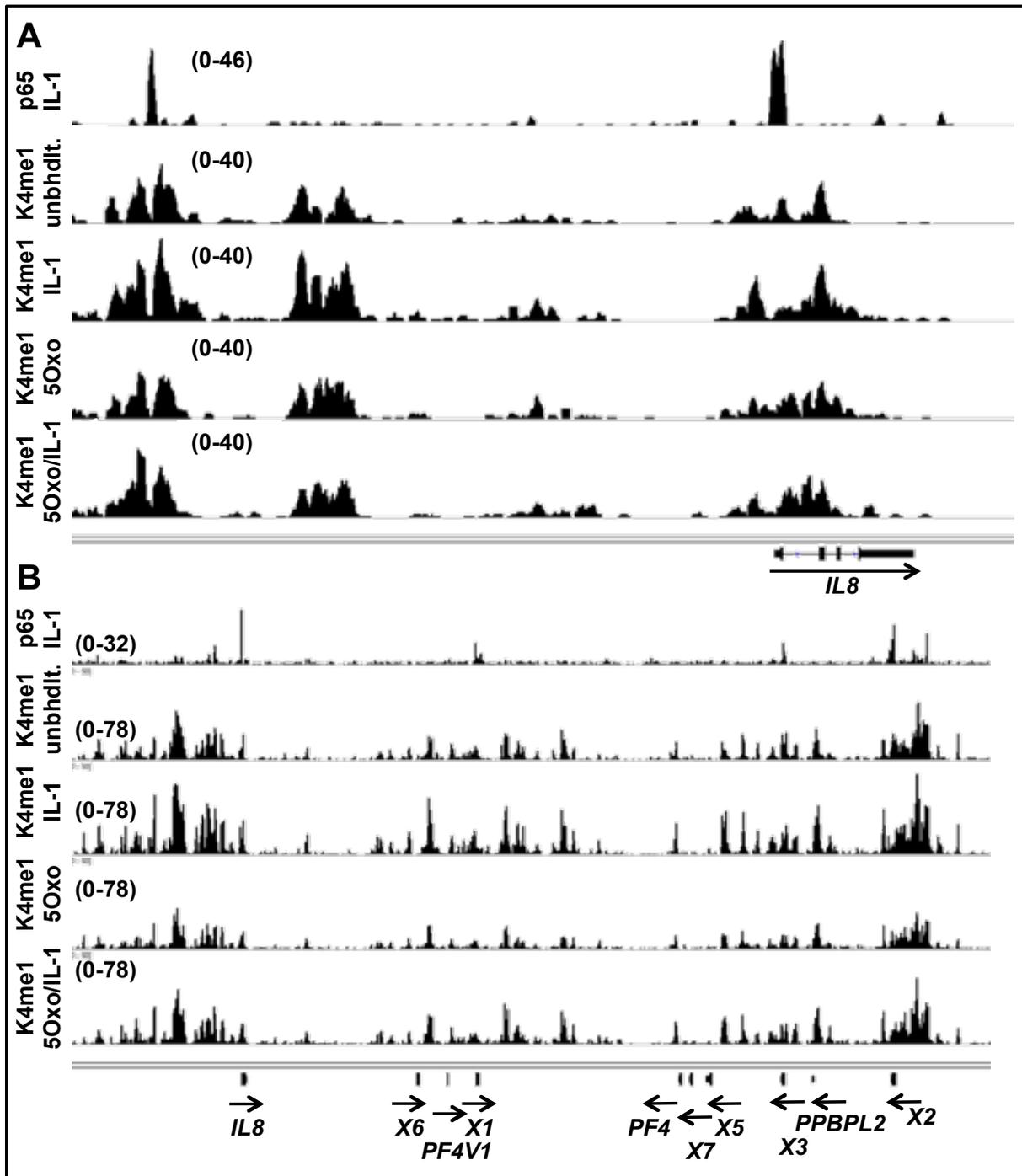


Abb. 5.17: ChIP-Seq Profile der TAK1-unabhängigen H3K4me1 im CXC-Chemokingen-Cluster

ChIP-Seq Proben wurden aus unterschiedlich behandelten KB-Zellen generiert: unbehandelt, IL-1 Stimulus (10 ng/ml, 60 min), TAK1-Inhibitor 5(Z)-7-Oxozeaenol (1 μ M, 30 min vor IL-1-Gabe), Kombinationsbehandlung mit IL-1 und TAK1-Inhibitor. Gezeigt sind die ChIP-Seq Profile für den Antikörper K4me1 (Monomethylierung des Lysins 4 an H3) und zur Orientierung das p65-Profil in IL-1 behandelten Zellen an *IL8* (**A**) sowie im gesamten CXC-Chemokingen-Cluster (**B**). Die Darstellung entspricht der Beschreibung in Abb. 5.15.

Dazu wurden A549-Zellen (Abschnitt 3.9) verwendet, die sowohl mit IL-1 behandelt, als auch mit dem Bakterium *Legionella pneumophila* infiziert worden waren (Abb. 5.18). Die A549-Zellen kamen bereits auch bei der Analyse der DNA-Methylierung als Vergleichssystem zum

Einsatz, waren in der Arbeitsgruppe als IL-1 responsive Zelllinie etabliert und in ihrer Eigenschaft als Lungenepithelzellen für eine Infektion mit Legionellen geeignet. *Legionella pneumophila* ist ein gramnegatives, unbekapseltes und sporenloses Stäbchen-Bakterium und Verursacher von Legionärskrankheit und Pontiac-Fieber (27). Es kann das NF- κ B System von Wirtszellen zum Beispiel extrazellulär über einen TLR („Toll-like receptor“) oder cytosolisch nach dem Eindringen über einen NLR („Nod-like receptor“) aktivieren und stellt daher eine interessante, alternative Stimulationssituation des unspezifischen Immunsystems dar (27).

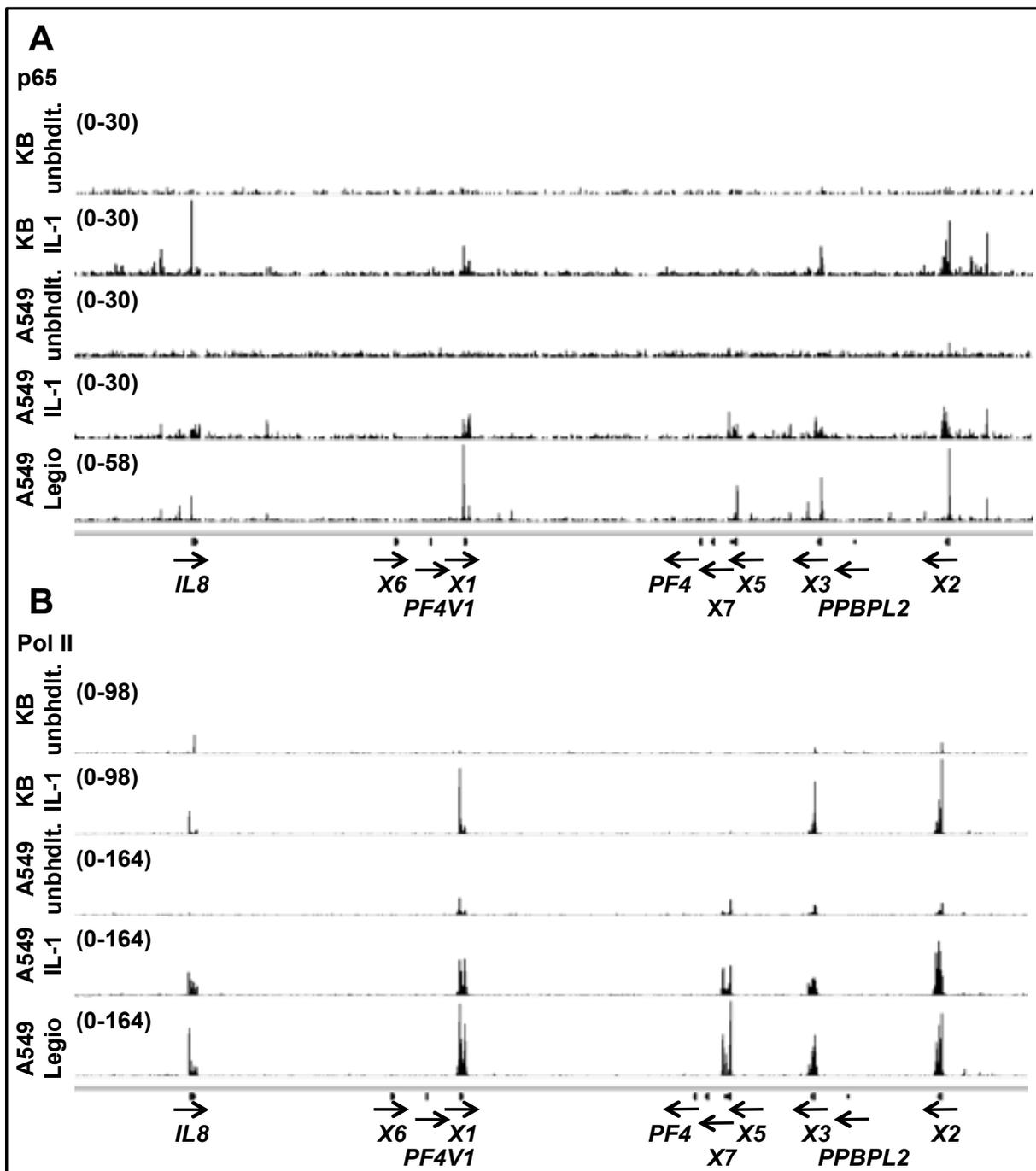


Abb. 5.18: Vergleich der Bindungsereignisse im CXC-Chemokingen-Cluster unter verschiedenen Bedingungen

KB-Zellen und A549-Zellen wurden unbehandelt oder mit IL-1 (10 ng/ml, 60 min) behandelt verwendet um ChIP-Seq Proben mit einem p65 (A) oder Polymerase II (B) Antikörper zu generieren. Zusätzlich wurden A549-Zellen verwendet, die in Zusammenarbeit mit Ilona Du Bois (AG Schmeck, Medical Center/Clinical Pulmonology, Universität Marburg) nach einem Wachstum für 5 Tage in „Ham´s F12“ Medium mit 10% FCS und 1% Glutamin mit dem *Legionella pneumophila* Stamm „corby“ mit einer MOI von 100 für 2 h infiziert worden waren (Legio). Die Darstellung entspricht der Beschreibung in Abb. 5.15.

Vergleicht man zunächst die Profile von p65 und Polymerase II unter der IL-1 Stimulation von KB- und A549-Zellen, fällt in den A549-Zellen sofort die Induktion des in KB-Zellen reprimierten Gens *CXCL5* auf. Dieses wies sowohl einen deutlichen Peak für p65, als auch ausgeprägte Pol II-Bindung auf. Neben diesem zelltypspezifischen Expressionsmuster waren in A549-Zellen auch etwas stärkere, basale Polymerase-Signale detektierbar. Dieses Experiment erlaubte jedoch nicht nur den Vergleich der IL-1 Stimulation in zwei verschiedenen Zelllinien, sondern auch die Gegenüberstellung der Bindungsprofile unter zwei verschiedenen Stimuli. Unter Infektion mit *Legionella pneumophila* kam es in den A549-Zellen zur Aktivierung der gleichen Zielgene im Cluster wie unter IL-1, wobei die gemessenen p65-Signale höher waren (Abb.5.18, A). Von besonderem Interesse waren die beiden Enhancer-Regionen des Chemokingen-Clusters jeweils „upstream“ von *IL8* und *CXCL2*. In diesen Bereichen kam es am jeweils gleichen Locus wie in KB-Zellen zur p65-Rekrutierung und zwar sowohl unter IL-1 Stimulation, als auch bei einer Legionellen-Infektion. Die zuvor in KB-Zellen beobachteten Bindungsereignisse, einschließlich der Enhancer-„Sites“, sind also prinzipiell auch in anderen Zellsystemen und Stimulationsereignissen zu finden und regulieren damit vermutlich über einen einheitlichen Mechanismus die Expression von *IL8*, *CXCL1,2* und *3*. Weitere Gene in dem Cluster, wie z.B. *CXCL5*, sind dagegen zusätzlich zelltyp-spezifisch reguliert, obwohl sie ebenfalls induzierbar p65 binden.

Die ChIP-Seq Analysen ermöglichten die Identifizierung von Enhancern im CXC-Chemokingen-Cluster und zeigten typische Histonmodifikationen und deren Veränderungen auf (Abb.5.19). So findet man die H3K9ac nicht nur an den Promotoren IL-1 induzierbarer Gene, sondern auch an den Enhancern, wo diese wie die H3K27ac nach einem Stimulus ansteigen. Die H3K4me1 dagegen lag IL-1 unabhängig deutlich in den Enhancer-Bereichen vor, weniger ausgeprägt an den Promotorbereichen der Zielgene und in anderen intergenischen Bereichen. Die Kinase TAK1 spielte nicht nur eine Rolle in der p65- und Pol II-Rekrutierung, sondern der TAK1-Inhibitor hemmte auch die korrelierenden Veränderungen des Histonstatus im Chemokingen-Cluster.

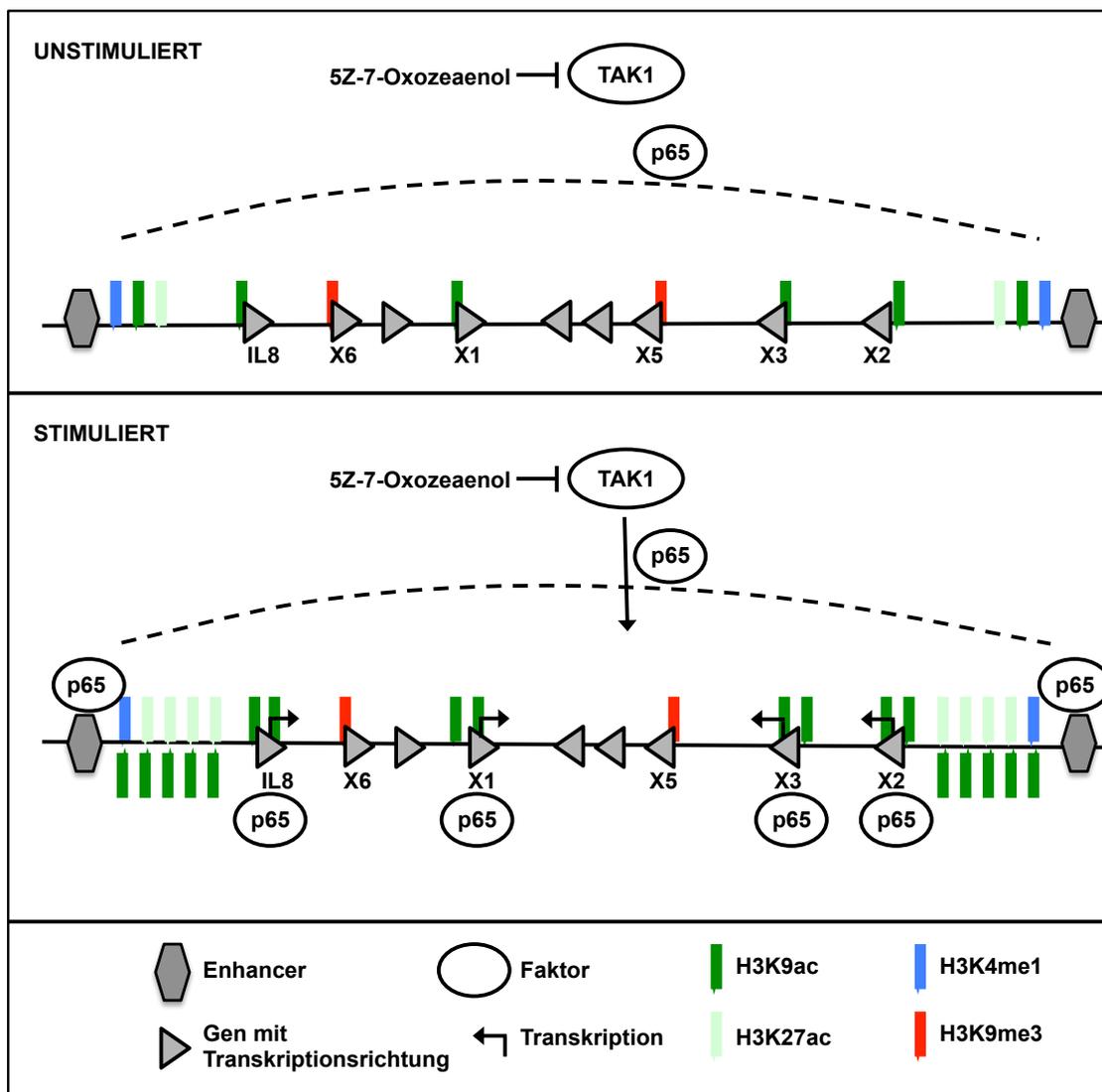


Abb. 5.19: Modell zur Veranschaulichung der nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort von Epithelzellen

Die Promotoren der induzierbaren Zielgene (Pfeile) des CXC-Chemokingen-Clusters sind durch Acetylierung an Lysin 9 des Histons H3 (grün) gekennzeichnet. Diese Histonmodifikation findet man, wie auch die H3K27 Acetylierung (hellgrün), ebenso an den Enhancern (Sechsecke), wobei beide „Marks“ nach IL-1 Stimulation in diesen Bereichen deutlich ansteigen. An diese Loci „upstream“ der beiden „Startgene“, die außerdem IL-1 unabhängig H3K4 Monomethylierung (blau) aufweisen, wird p65 nach einer Stimulation rekrutiert, genauso wie an die Promotoren der induzierten Gene.

5.4 Charakterisierung von weiteren an der IL-1 abhängigen Genregulation beteiligten Chromatinfaktoren

Die vorangegangenen CHIP-PCR und ChIP-Seq Experimente zeigten eine eindeutige Regulation der p65-Bindung und vor allem der H3K27ac an Promotoren und Enhancern. Dies warf die Frage auf, welche weiteren DNA-bindenden Proteine und Kofaktoren an der der IL-1-abhängigen Regulation des Chemokingen-Clusters auf Chromatin-Ebene beteiligt sind.

5.4.1 IL-1 und TAK1 abhängige Rekrutierung von AP-1 Proteinen und CBP Faktoren an den *IL8* Promotor

Neben einer NF- κ B Bindungsstelle enthält der *IL8* Promoter auch eine 5' gelegene, 119 Nukleotide entfernte, gut charakterisierte AP-1 Bindungsstelle. Obwohl IL-1 über TAK1-abhängige MAPK Signalwege AP-1 Faktoren regulieren kann (Abb.5.5 und 5.6) und in KB Zellen viele AP-1 Proteine exprimiert werden, ist die genaue Zusammensetzung der AP-1 Untereinheiten am *IL8* Promoter und auch an anderen IL-1 Zielgenen immer noch unverstanden, insbesondere unter physiologischen Stimulationsbedingungen. Daher wurde im Folgenden die Rekrutierung verschiedener AP-1-Untereinheiten mittels CHIP zunächst am *IL8* Promoter analysiert (Abb.5.20).

Zusätzlich wurde aufgrund der beobachteten Veränderungen in Histon-Acetylierungen eine mögliche Detektion der Acetyltransferase CBP („CREB binding protein“), die mit p65 und AP-1-Untereinheiten interagieren kann (55, 188), überprüft. So konnten für die Proteine CBP, ATF2, FRA1, c-Jun und JunB zwar Signale detektiert werden, die über der IgG-Kontrolle und auch über den Signalen der Negativkontrollregion lagen, aber diese waren dennoch eher im unteren Detektionsbereich angesiedelt. Für c-Jun und CBP konnte dabei auch eine IL-1 Abhängigkeit festgestellt werden und diese Induktionen waren unter dem TAK1-Inhibitor vermindert. Deutlich ausgeprägter waren dagegen die CHIP-Signale für die AP-1-Untereinheit JunD, die bereits im basalen Zustand mit unbehandelten KB-Zellen eindeutig gegenüber den Kontrollen erhöht waren. Für diesen Faktor ließ sich keine Abhängigkeit von IL-1 feststellen und die Signale waren unter dem Einfluss des TAK1-Inhibitors nur leicht erniedrigt. Vollkommen anders sah das Rekrutierungsmuster für das ebenfalls eindeutig detektierbare Protein c-Fos aus, mit einer klaren IL-1 abhängigen Induktion sowie einer Inhibition durch 5(Z)-7-Oxozeaenol. Dieser Faktor gehört ebenfalls zu den AP-1-Untereinheiten und kann Dimere mit Proteinen der Jun-Familie ausbilden, zu denen auch das am *IL8* Promotor detektierte JunD gehört (49, 63).

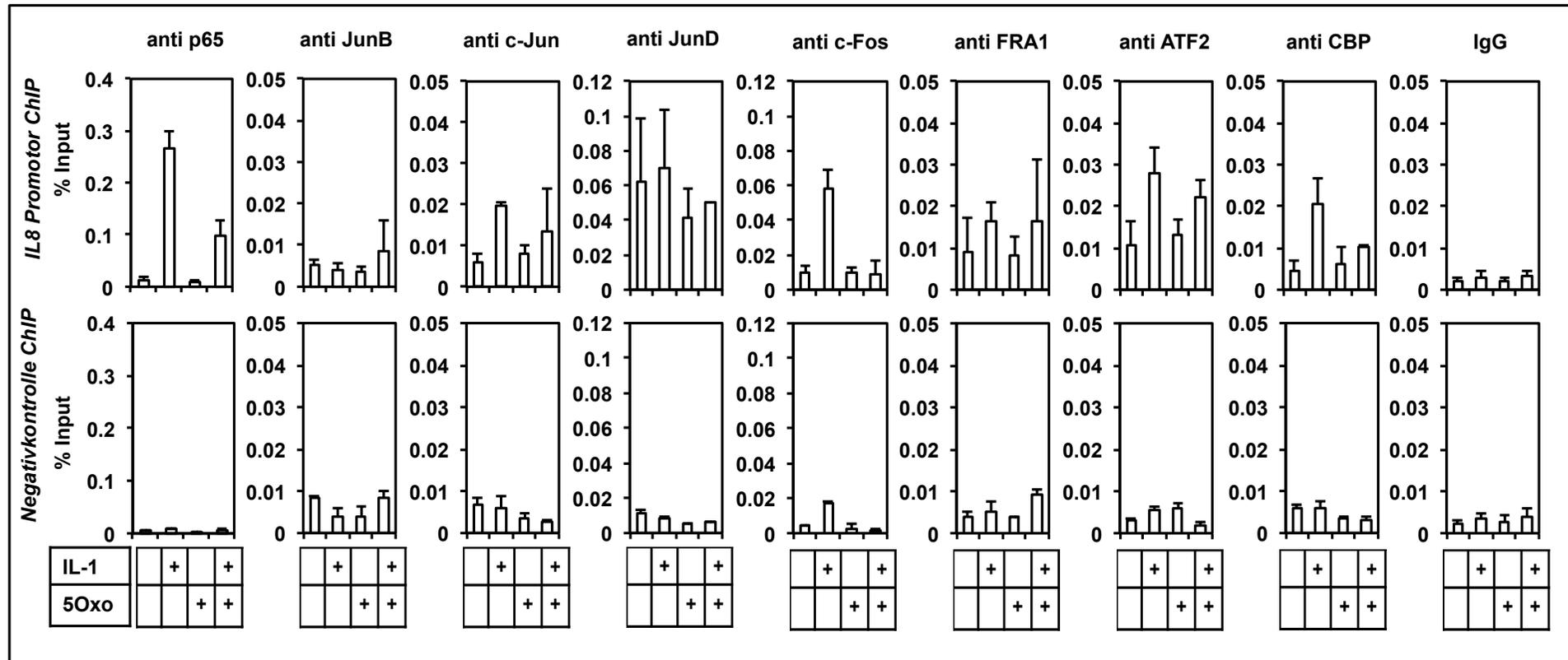


Abb. 5.20: ChIP-Analyse kooperierender Proteine an der p53-Bindestelle des *IL8* Promotors

Mittels ChIP mit Antikörpern gegen verschiedene AP-1-Proteine und die Acetyltransferase CBP wurde die IL-1 abhängige (10 ng/ml, 60 min) Rekrutierung dieser möglichen Kooperationspartner von p65 an den *IL8* Promotor in KB-Zellen untersucht (n=2). Als Kontrolle diente eine genfreie Negativkontroll-Region „upstream“ von *IL8*. Zusätzlich wurde auch die TAK1-Abhängigkeit möglicher Signale durch den Einsatz des TAK1-Inhibitors überprüft (1 μ M, 30 min vor IL1-Gabe). Eingesetzte Antikörper neben p65 und IgG: JunB, c-Jun, JunD, c-Fos, FRA1 (FOSL1), ATF2, CBP (CREBBP). Die Auswertung erfolgte mittels Real time PCR. Das Ergebnis ist in Prozent des Inputs angegeben und der Fehler entspricht der Standardabweichung (Abschnitt 4.10.4).

5.4.2 Bindungskinetik an der IL-1 abhängigen Genregulation beteiligter Kofaktoren

Um diesen AP-1-Komplex aus JunD und c-Fos näher zu analysieren, wurden Bindungskinetiken dieser Proteine erstellt (Abb.5.21). Dazu wurden KB-Zellen für verschiedene Zeitpunkte mit IL-1 stimuliert und das jeweilige Chromatin in entsprechende ChIP-Analysen eingesetzt, wobei auch Antikörper gegen p65 und die aktive Form der Polymerase II (phosphoryliert an Serin 5) verwendet wurden. Bereits 10 min nach einer IL-1 Stimulation ließen sich erste Bindungssignale für p65 im Vergleich zu unbehandelten Zellen erkennen, die bei 30 min IL-1 ihren Höhepunkt erreichten und dann wieder kontinuierlich abnahmen, um nach 360 min wieder annähernd den Basalwert einzunehmen. Auch die Rekrutierung der aktiven Form der Polymerase II erfolgte in den Epithelzellen mit ersten Signalen bei 20 min IL-1 sehr schnell. Die stärksten Signale waren im Bereich von 60 min messbar und folgten im Wesentlichen der p65 Bindung. Für das Protein c-Fos konnte fast eine identische Bindungskinetik wie für die Polymerase II aufgenommen werden. Ganz anders verhielt sich dagegen die AP-1-Untereinheit JunD. Hier waren bereits basal relativ hohe Werte detektierbar, die unter IL-1 leicht zunahmten und auch nach 360 min IL-1 Stimulation noch immer etwas über den Ausgangswerten lagen.

Während JunD also bereits vorgebunden am *IL8* Promotor vorlag, erfolgte unter IL-1 eine sehr schnelle Rekrutierung von p65, gefolgt von Polymerase II und c-Fos. Im Laufe der IL-1 Stimulation erreichten die Signale zwischen 30 und 60 min ihren Höhepunkt und fielen dann wieder ab.

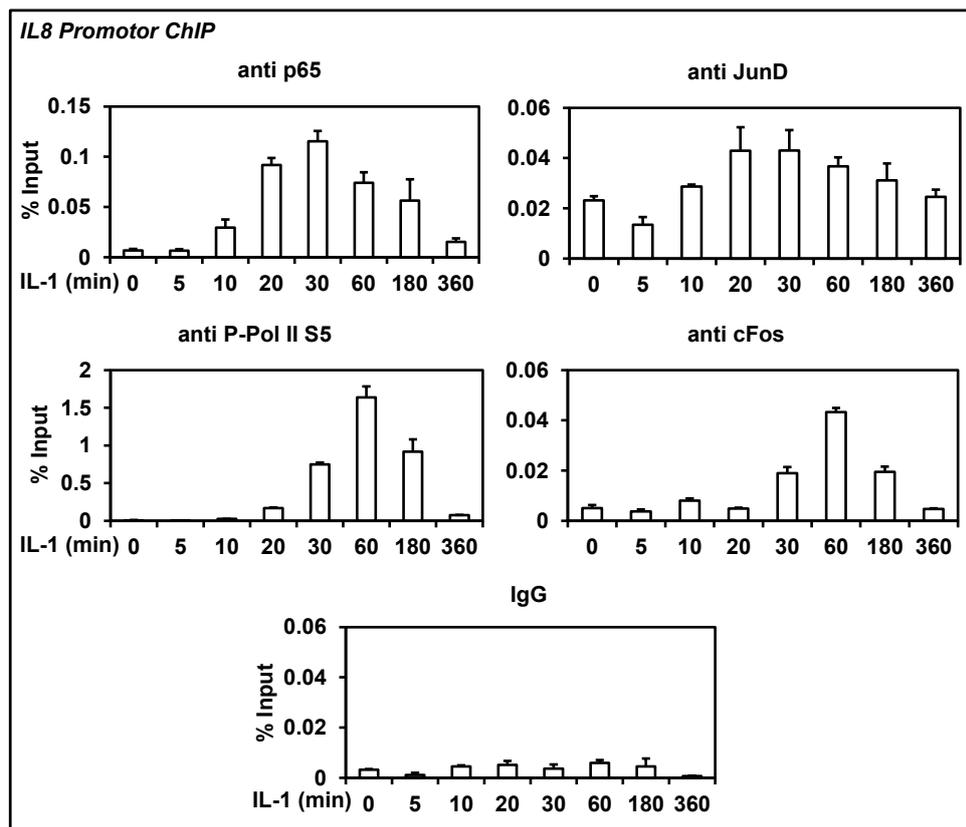


Abb. 5.21: Bindungskinetiken der identifizierten AP-1-Faktoren am *IL8* Promotor
 KB-Zellen wurden für verschiedene Zeitspannen (angegeben in Minuten) mit IL-1 behandelt (10 ng/ml) und anschließend in ChIP-Analysen auf die Bindung von p65, an Serin 5 phosphorylierter Polymerase II (aktive Form, P-Pol II S5), JunD und c-Fos hin untersucht (n=1). Als Kontrolle dienten ChIP-PCRs mit IgG. Die Auswertung erfolgte mittels Real time PCR. Das Ergebnis ist in Prozent des Inputs angegeben und der Fehler entspricht der Standardabweichung (Abschnitt 4.10.4).

An den Promotoren der IL-1 Zielgene spielte also nicht nur die Bindung von p65 selbst und die zuvor charakterisierten Histonmodifikationen eine Rolle, sondern weitere Transkriptionsfaktoren kamen IL-1- und TAK1-abhängig hinzu. Offensichtlich wird daher signalabhängig ein komplexes Zusammenspiel verschiedener AP-1 Proteine und epigenetischer Vorgänge ermöglicht, die in der Summe vermutlich für die extrem schnelle und transiente Aktivierung IL-1 abhängiger Zielgene verantwortlich sind (Abb.5.22).

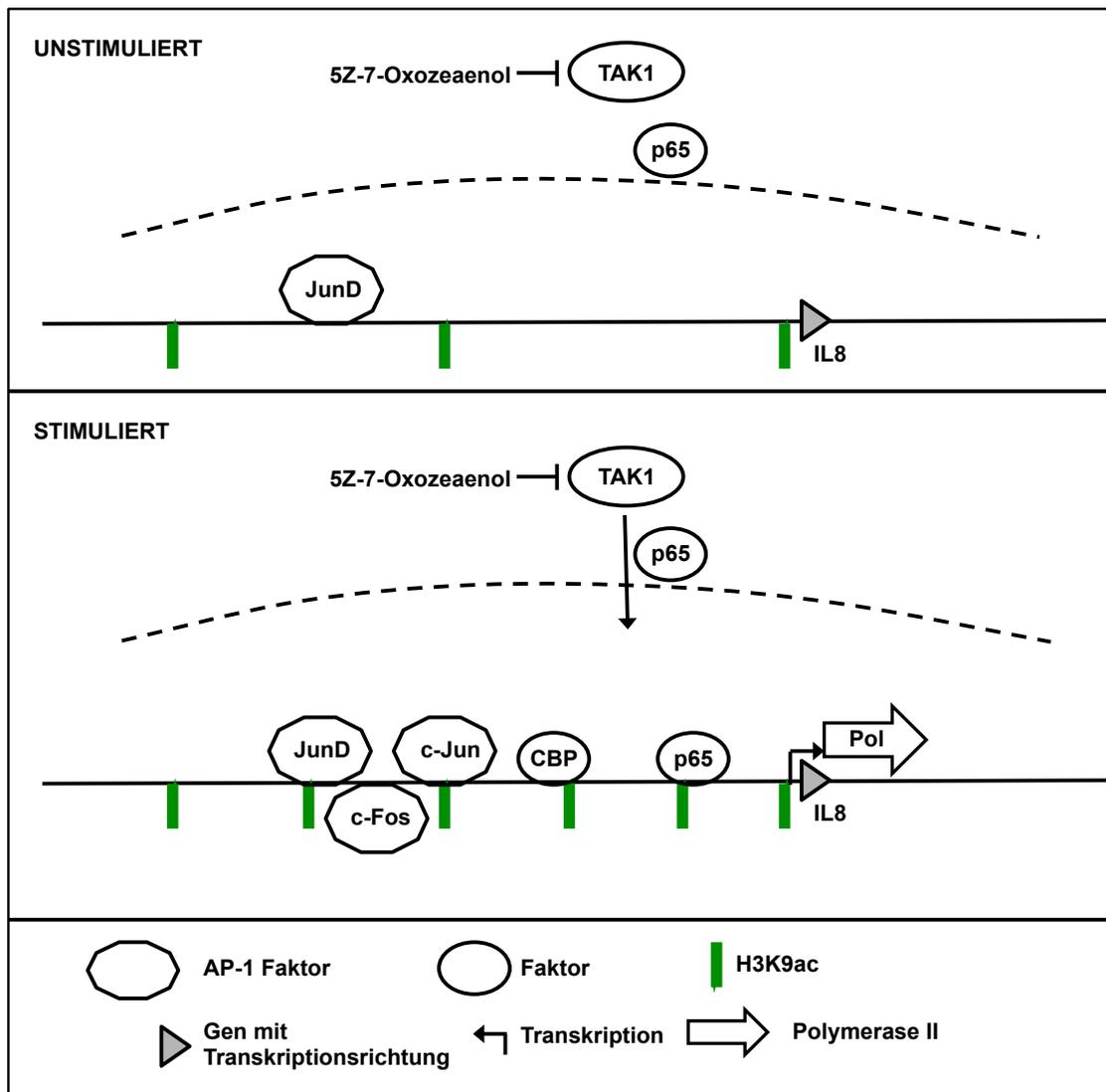


Abb. 5.22: Um Kofaktoren erweitertes Modell zur Veranschaulichung der nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort von Epithelzellen

Im Promotor des Zielgens *IL8* kann der AP-1-Faktor JunD bereits basal nachgewiesen werden. Nach einer IL-1 Stimulation kommt es zur sehr schnellen Rekrutierung von p65, dicht gefolgt von Polymerase II und c-Fos. Auch c-Jun und CBP sind IL-1 abhängig am Promotor messbar, allerdings schwächer und nicht kinetisch charakterisiert.

5.5 Die Cyclin-abhängige Kinase 6 (CDK6) kann an Chromatin rekrutiert werden und beeinflusst die Induktion von *IL8* und weiteren IL-1 Zielgenen

Im Zuge der Charakterisierung der am *IL8* Promoter bindenden Kofaktoren, wurden die bereits erhobenen Daten um einen weiteren bisher nicht als *IL8* Regulator bekannten Faktor erweitert. Vorausgegangene Experimente der Arbeitsgruppe konnten die Cyclin-abhängige Kinase 6 (CDK6) als neue NF- κ B-Kinase identifizieren und zeigen, dass die Hemmung von CDK6 die Induzierbarkeit von p65-Zielgenen inhibiert (24). Dr. Katja Handschick, Dr. Knut Beuerlein und Helmut Müller (AG Kracht, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, JLU Gießen) führten diesbezüglich weitere Untersuchungen durch, die die Bedeutung von CDK6 im IL-1 Signalweg weiter stützten. So wirkte sich ein CDK6 „knockdown“ inhibierend auf die

IL-1 induzierte Genexpression aus und PLA („proximity ligation assay“)- und CoIP (Koimmunopräzipitation)-Versuche deuteten auf eine Kollokalisierung bzw. Interaktion von p65 und CDK6 hin (64). Daher lag es nahe die Kinase CDK6 auch in die Chromatin-fokussierten Analysen dieser Arbeit miteinzubinden und eine direkte Beteiligung an der IL-1 regulierten Genexpression zu überprüfen.

5.5.1 CDK6 wird nach IL-1 Induktion an den Promotor von *IL8* sowie an alle anderen induzierten Gene des CXC-Chemokingen-Clusters rekrutiert

Die Frage ob CDK6 selbst an Chromatin rekrutiert werden kann, wurde mit Hilfe entsprechender ChIP-Experimente am *IL8* Promotor beantwortet. Dabei wurden die gemessenen ChIP-Signale erneut gegen die Negativkontrollregion und die IgG-Kontrolle abgeglichen (Abb.5.23).

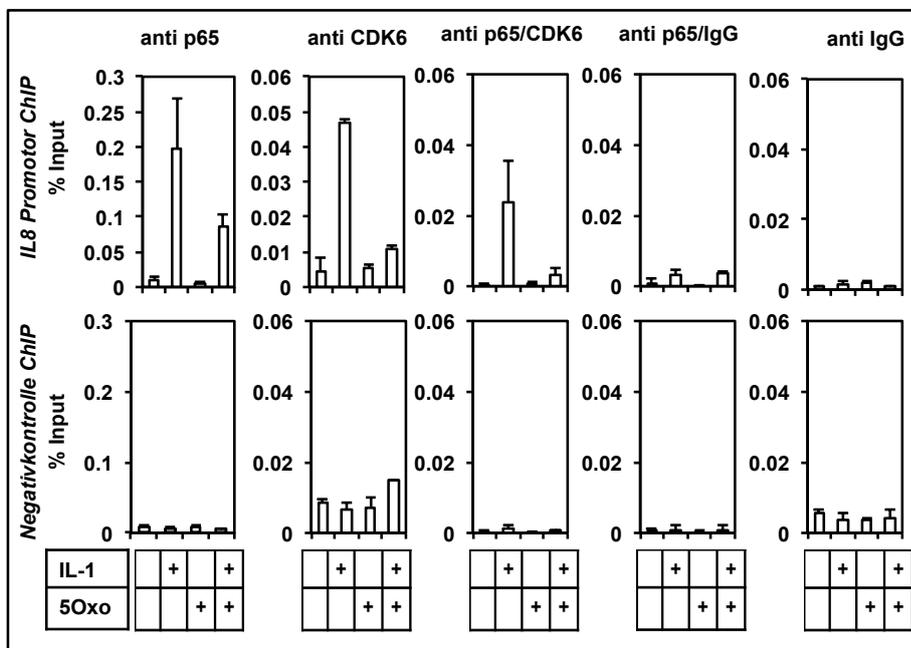


Abb. 5.23: Detektion von CDK6 am Chromatin des *IL8* Promotors durch ChIP und ReChIP

KB-Zellen wurden mit IL-1(10 ng/ml, 60 min), TAK1-Inhibitor (5Oxo, 1 μ M, 30 min vor IL1-Gabe) oder einer Kombination beider Stoffe behandelt. Zum Nachweis der Ereignisse an dem selben Allel und in den selben Zellen wurde ein ReChIP durchgeführt, bei dem nach dem p65-Antikörper ein Antikörper gegen CDK6 (anti p65/CDK6) bzw. eine IgG-Kontrolle (anti p65/IgG) in einer zweiten ChIP-Prozedur verwendet wurde (n=2, Abschnitt 4.5.3). Als Vergleichsabschnitt zum Promotor wurde erneut die Negativkontrollregion verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels Real time PCR. Das Ergebnis ist in Prozent des Inputs angegeben und der Fehler entspricht der Standardabweichung (Abschnitt 4.10.4).

In dieser ChIP war nach IL-1 Behandlung neben der Rekrutierung von p65 auch die IL-1 abhängige Bindung von CDK6 zu beobachten. Das Signal hob sich deutlich von dem der Kontrollen ab und wurde durch den Einsatz des TAK1-Inhibitors 5(Z)-7-Oxozeanol gehemmt. Um sicherzugehen, dass die nachgewiesene Rekrutierung beider Faktoren an den *IL8* Promotor tatsächlich an dem selben Allel und in den selben Zellen stattfand, wurde

zusätzlich eine ReChIP durchgeführt (Abschnitt 4.5.3). Dabei wurde nach der p65-ChIP eine weitere Immunopräzipitation mit dem zweiten Antikörper angeschlossen, mit CDK6 oder zur Kontrolle mit IgG. Auch über diese Methode konnte die gleichzeitige Bindung von p65 und CDK6 an denselben DNA-Abschnitt, IL-1 und TAK1 abhängig detektiert werden.

Die Experimente zeigten, dass die Kinase CDK6 ein Faktor ist, der an Chromatin rekrutiert werden kann und sich an IL-1 Zielgenen wie der Transkriptionsfaktor p65 verhält. Um diese Aussage über *IL8* hinaus weiter festigen zu können, wurde ein CDK6 ChIP-Seq Experiment durchgeführt. Vergleicht man die hierbei generierten Bindungsprofile mit dem von p65 im CXC-Chemokingen-Cluster, sieht man die Übereinstimmung mit p65 an den Zielpromotoren und dass auch an den übrigen induzierbaren Genen des Clusters für CDK6 eine IL-1 und TAK1 Abhängigkeit vorlag (Abb.5.24).

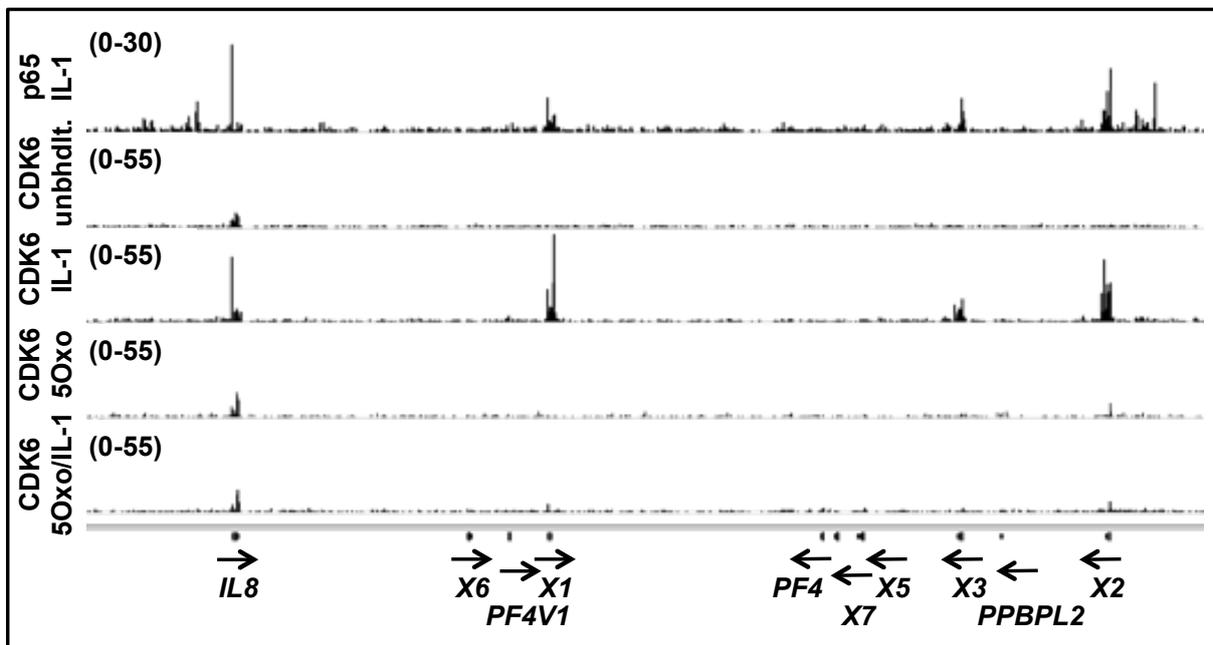


Abb. 5.24: CDK6 ChIP-Seq Profile am CXC-Chemokingen-Cluster

Chromatin aus KB-Zellen, die mit IL-1(10 ng/ml, 60 min), TAK1-Inhibitor (5Oxo, 1 μ M, 30 min vor IL1-Gabe) oder einer Kombination beider Stoffe behandelt wurden, wurde mittels ChIP-Seq mit Antikörpern gegen p65 und CDK6 analysiert. Die Darstellung erfolgte mit dem *IGV Genome Browser*, die Zahlen in den Klammern geben die Skalierung der „read“ Dichten an. Die Beschriftungen geben die Gennamen an (X als Abkürzung für *CXCL*), die Pfeile repräsentieren die Transkriptionsrichtung.

5.5.2 CDK6 bindet als genereller Kofaktor an die Promotoren IL-1 regulierter Gene und kolokalisiert genomweit mit p65 und Pol II an aktiven Genen

Das CDK6 ChIP-Seq Experiment erlaubte aber nicht nur eine Übersicht über den Modell-Gencluster, sondern auch die genomweite Analyse der CDK6-Bindungsereignisse. Im Rahmen dieser Auswertungen wurden verschiedene IL-1 Zielgene untersucht und die CDK6-Bindungsprofile an diesen mit den zuvor erhobenen Profilen von Polymerase II, p65 und der

Acetylierung des Lysins 9 an Histon H3 (H3K9ac) verglichen (Abb.5.25). Dabei wurde nicht nur der jeweilige Promotorbereich, sondern auch der gesamte Genkörper dargestellt. Erneut zeigte sich eine Korrelation zwischen der Bindung von p65 und CDK6. An allen Genen mit p65-Bindung kam es auch zur Rekrutierung von CDK6, während an Genen mit deutlicher H3K9ac und alleiniger Bindung von Pol II (*CCND1*) kein CDK6 Signal auftrat. Dies war auch an *MMP1* der Fall, an dem aber auch die übrigen Faktoren nicht nachweisbar waren. Die beiden Gene *CCND1* und *MMP1* wiesen in mRNA-Untersuchungen eine Abhängigkeit vom Zellzyklus auf, nicht aber von IL-1, und dienten daher als Vergleich. Am häufigsten konnten p65- und CDK6-Peaks in der Nähe des Transkriptionsstarts beobachtet werden. Kam es zusätzlich zu weiteren p65 Signalen im „gene body“ (*CXCL3*, *CCL20*), trat auch hier fast immer eine Überlappung mit CDK6 auf. Um diese Überschneidungen weitreichender auszuwerten, wurden die detektierten Peaks der verschiedenen Faktoren in Venn-Diagrammen miteinander verglichen (Abb.5.26, A). Dabei zeigte sich eine deutliche gemeinsame Schnittmenge von CDK6-Signalen mit denen für p65, Pol II und H3K9ac, während es mit der Trimethylierung des Lysins 9 an Histon H3 (H3K9me3) kaum Übereinstimmungen gab.

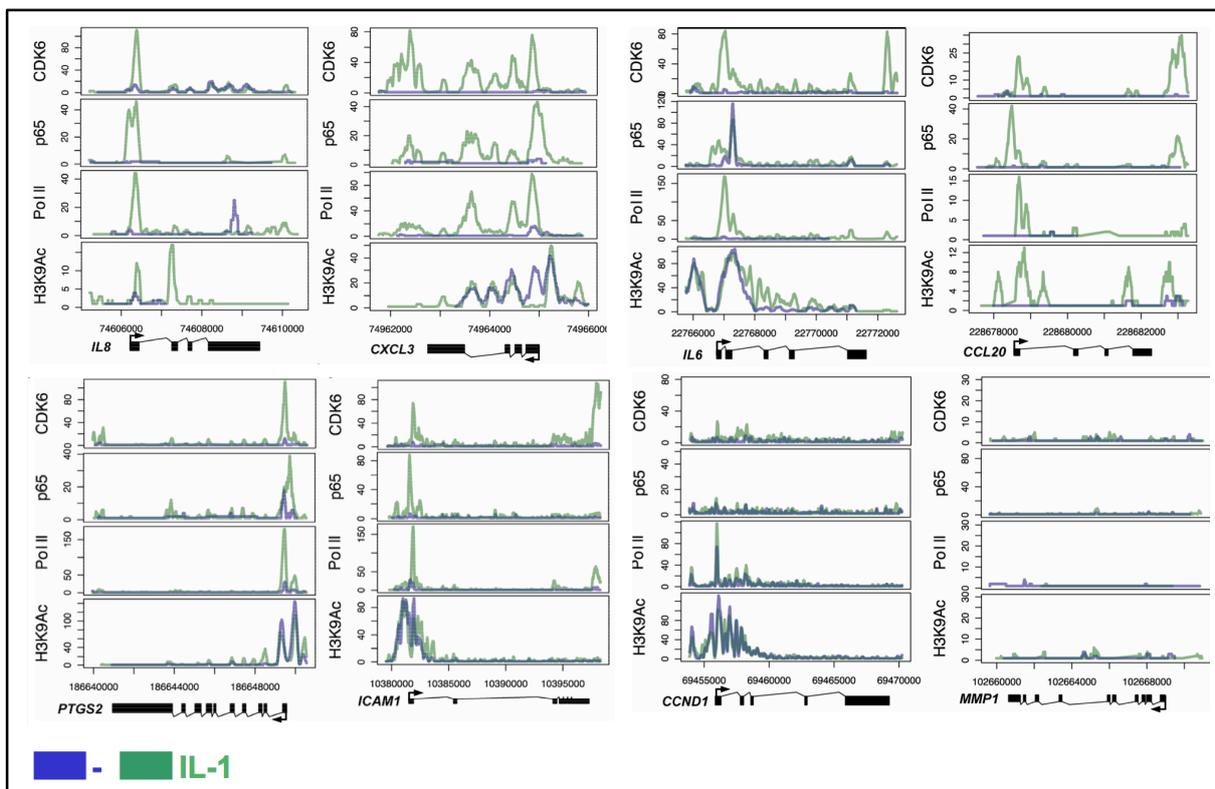


Abb. 5.25: Das Bindungsverhalten von CDK6, p65 und Pol II an IL-1 Zielgenen
Die ChIP-Seq Profile der Proteine CDK6, p65 und Pol II, sowie der Histonmodifikation H3K9ac, wurden für unbehandelte (blau) und IL-1 behandelte (10 ng/ml, 60 min, grün) KB-Zellen über verschiedene IL-1 Zielgene ausgewertet. Zum Vergleich dienen die beiden Gene *CCND1* und *MMP1*, die Zellzyklus-, aber nicht IL-1-abhängig induziert wurden. Die meisten Zielgene wiesen dabei eine starke H3K9 Acetylierung auf, kombiniert mit einer IL-1-abhängigen Pol II- und p65-Rekrutierung. An diesen Genen (*IL8*, *CXCL3*, *IL6*, *CCL20*, *PTGS2*, *ICAM1*) konnte auch eine CDK6-Bindung nach IL-1 detektiert werden, während am

Gen *MMP1* keines der untersuchten Merkmale auftrat. An *CCND1* waren H3K9ac und Pol II nachweisbar, während p65 und CDK6 Signale fehlten. Zusammenarbeit mit Dr. Marek Bartkuhn (AG Renkawitz, JLU Gießen), Abbildung aus 64, Lizenznummer 3541300192068.

Die ChIP-Seq Ergebnisse für die vier beschriebenen Faktoren wurden nicht nur an einzelnen IL-1 Zielgenen und als Venn-Diagramme ausgewertet, sondern auch als Gesamtübersicht für alle 34.450 in der „RefSeq“ Datenbank annotierten Promotoren bekannter Gene (Abb.5.26, B). Dazu wurden die gewonnen Bindungsprofile mit einem Clusteralgorithmus auf Ähnlichkeiten hin untersucht, um die TSS der Gene zentriert und über einen Bereich von 10 kb weiterer DNA Sequenz als Heatmap dargestellt. Diese Ansicht erlaubte die Visualisierung der starken Korrelation zwischen p65, Pol II, H3K9ac und CDK6 Bindungsereignissen über eine große Anzahl humaner Promotorbereiche. Eine solche Korrelation findet sich auch über allen anhand der Microarray Daten ermittelten 245 IL-1 induzierten Genen, jedoch ist hier zusätzlich eine IL-1 abhängige Zunahme der Bindungsereignisse zu beobachten (Abb.5.26, C). Pol II, p65 und CDK6 Bindung traten dabei sehr nah der Transkriptionsstartstelle auf und in diesem Bindungsbereich konnte ein „Tal“ im Signal der H3K9ac detektiert werden, was auf die Öffnung des Chromatins durch Bindung des Transkription-initiiierenden Multiproteinkomplexes und die damit verbundene Abnahme der Histondichte zurückzuführen war.

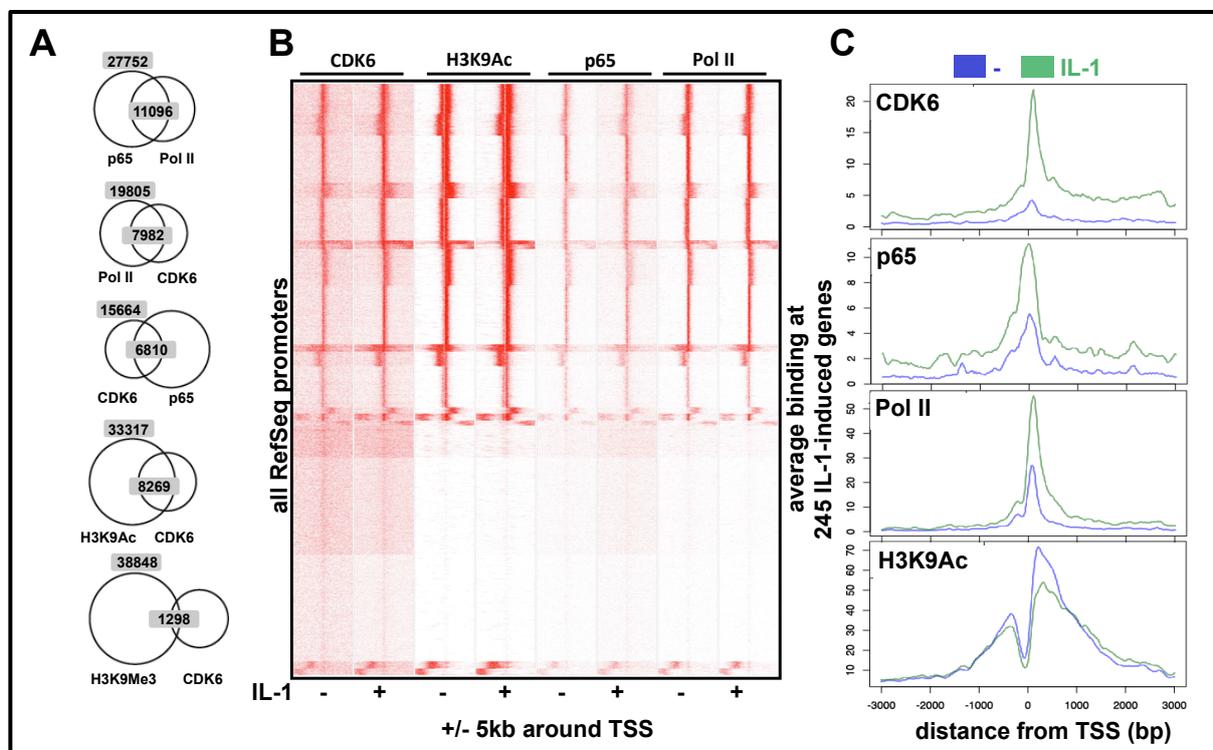


Abb. 5.26: Genomweite Analyse der Bindungsereignisse von p65, Pol II und CDK6, deren Korrelation untereinander und mit der Histonmodifikation H3K9ac

A) Die Bindungssignale von p65, Pol II und CDK6 in unbehandelten KB-Zellen wurden in Venn-Diagrammen miteinander verglichen und für CDK6 den Histonmodifikationen H3K9ac und H3K9me3 gegenüber gestellt. **B)** Durch eine „Heatmap“ (Bindungsereignisse rot

dargestellt) über alle 34.450 „RefSeq Promotoren“ bekannter Gene (+/-5 kb um den Transkriptionsstart) wurde die Korrelation der Signale von CDK6, H3K9ac, p65 und Pol II in unbehandelten und IL-1 behandelten (10 ng/ml, 60 min) KB-Zellen visualisiert. **C)** Die ChIP-Seq Profile der gleichen Faktoren wurden für den Transkriptionsstart von 245 IL-1 induzierten Genen als Metaprofile gemittelt dargestellt. Zusammenarbeit mit Dr. Marek Bartkuhn (AG Renkawitz, JLU Gießen), Abbildung aus 64, Lizenznummer 3541300192068.

5.5.3 CDK6 spielt eine wichtige Rolle im Aktivierungskomplex an den Genpromotoren

In den vorangegangenen Experimenten konnte CDK6 als neuer Faktor am Chromatin von IL-1 Zielgenen identifiziert und gezeigt werden, dass diese Rekrutierung ebenfalls von IL-1 und TAK1 abhängig ist. Es kam genomweit zu einer großen Übereinstimmung zwischen den Bindungsereignissen von p65 und CDK6. Um den Einfluss beider Faktoren aufeinander näher zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit Johanna Sölch und Katja Handschick (AG Kracht, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, JLU Gießen) HeLa-Zellen untersucht, in denen die endogene CDK6 oder p65 Menge mittels Überexpression oder RNA Interferenz (RNAi) moduliert worden war. HeLa-Zellen sind, wie auch KB-Zellen, humane, epitheliale Zellen und diesen damit sehr ähnlich, was auch auf das Spektrum an IL-1-induzierten Genen zutrifft. Im Gegensatz zu KB-Zellen sind HeLa-Zellen allerdings gut transfizierbar und wurden daher bei diesen Untersuchungen in allen Experimenten verwendet, die eine genetische Manipulation von Chromatinfaktoren oder Signalproteinen erforderte. Verwendet wurden mit einem leeren pSuper Vektor oder mit einem gegen CDK6 gerichteten shRNA Konstrukt (pSuper-shCDK6) stabil transfizierte HeLa-Zelllinien (Abb.5.27, B). Für den p65 „knockdown“ dagegen wurde nach der Transfektion eine Selektion in Puromycin für 48 h mit einer anschließenden Analyse aller molekularen Ereignisse durchgeführt, da eine dauerhafte Suppression von p65 in HeLa-Zellen nicht möglich war (Abb.27, A).

Ziel dieser Experimente war auch die Untersuchung einer möglichen synergistischen Aktivierung des *IL8* Promotors durch IL-1 und G1-CDK6-abhängige Signalwege. Daher wurden die Zellen für 48 h ohne Serum kultiviert, um sie im Zellzyklus zu arretieren, und dann für 6 h mit 20% Serum behandelt, um den G1-CDK6 Signalweg zu aktivieren. Die Stimulation der IL-1 Signaltransduktion erfolgte direkt danach mit einer IL-1 Zugabe. Unter all diesen Bedingungen wurden die *IL8* mRNA Induktion und die erfolgreiche Suppression der CDK6 und p65 Proteinmenge in den selben Zellen durch Johanna Sölch und Katja Handschick untersucht. Diese Ergebnisse sind in der „Molecular Cell“-Publikation, Abb. 6E und S2F, dargestellt (64) und zeigen eine starke Aktivierung der *IL8* mRNA durch eine IL-1 + Serum Kostimulation, sowie eine erfolgreiche Suppression der CDK6 und p65 Proteinmenge im jeweiligen „knockdown“. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unter diesen experimentellen Bedingungen ChIP Untersuchungen durchgeführt, um die Effekte von p65 und CDK6 am *IL8* Locus auf Chromatinebene beurteilen zu können (Abb.5.27).

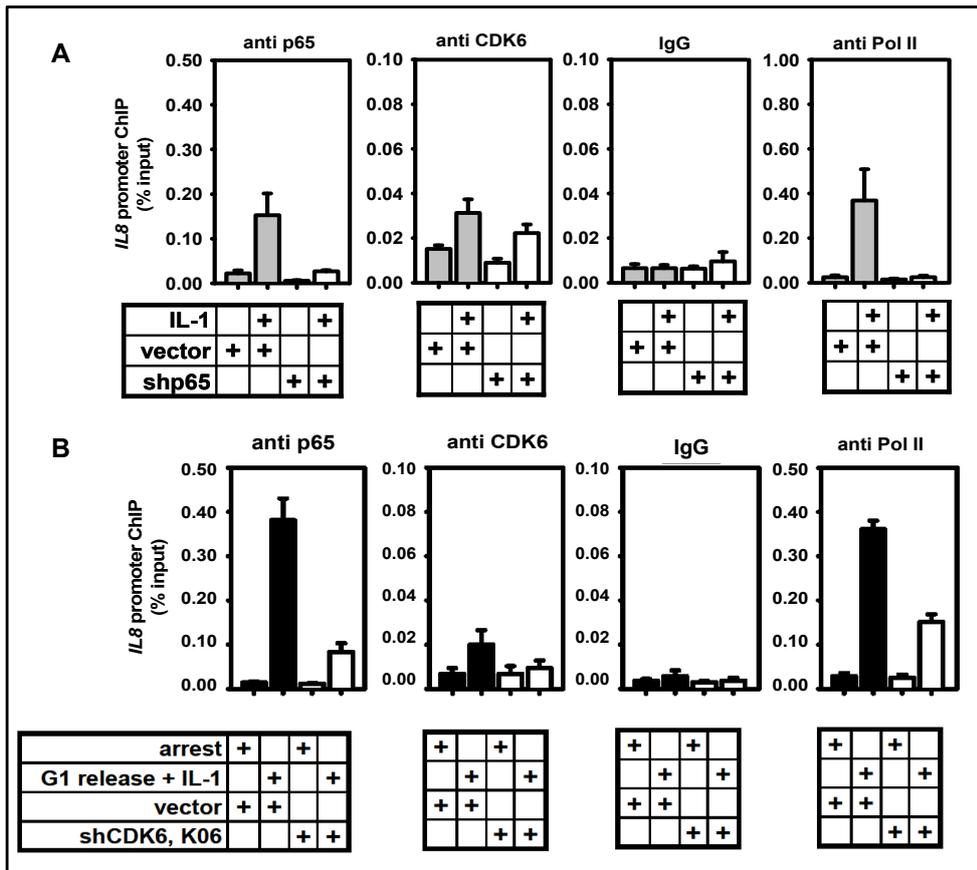


Abb. 5.27: Einfluss eines p65 bzw. CDK6 „knockdowns“ auf die gegenseitige Rekrutierung beider Faktoren sowie auf die Bindung von Polymerase II

A) Chromatin aus HeLa-Zellen mit semi-transientem p65 „knockdown“ (shp65) bzw. Leervektor-Kontrolle (vector) (Johanna Sölch, Katja Handschick), sowie mit und ohne erfolgter IL-1 Stimulation (10 ng/ml, 60 min), wurde mittels ChIP auf die Rekrutierung von p65, CDK6 und Pol II an den Promotor von *IL8* untersucht (n=2). **B)** Ein ChIP mit den gleichen Antikörpern wurde mit dem Chromatin aus HeLa-Zellen mit stabiler Transfektion eines CDK6 „knockdown“ Vektors (RNAi, shCDK6, Klon K06) bzw. einer Leervektor-Kontrolle (vector) (Johanna Sölch, Katja Handschick) durchgeführt (n=2). Dabei wurden arretrierte Zellen (G0-Phase, 48 h Serumentzug) mit Zellen im Zellzyklus „Release“ (G1-Phase, 20% Serum für 6 h nach Arrest) und IL-1 Stimulation (10 ng/ml, 60 min) miteinander verglichen. Die Auswertung erfolgte für **A)** und **B)** mittels Real time PCR als Prozent des Inputs, der Fehler wurde durch den „Standard error of the mean“ (Sigma Plot, Version 11.0) ermittelt (Abbildung modifiziert aus 64, Lizenznummer 3541300192068).

Die Reduktion der p65-Menge durch semi-transienten „knockdown“ wirkte sich auch auf Chromatin-Ebene aus und führte zu deutlich reduzierten p65-Signalen am *IL8* Promotor, während die Bindung von CDK6 unter diesen Bedingungen kaum verändert war (Abb.5.27, A). Die IL-1 abhängige Rekrutierung der Polymerase II dagegen wurde durch den p65 „knockdown“ fast vollständig inhibiert. Bei einer Reduktion des Transkriptionsfaktors p65 waren also sowohl die *IL8* mRNA Menge (64, Abb. 6, E), als auch die Pol II-Bindung sehr stark beeinträchtigt. Unter einem stabilen CDK6 „knockdown“ in HeLa-Zellen war erwartungsgemäß die CDK6-Bindung an das Chromatin des *IL8* Promotors vermindert, aber auch das p65-ChIP-Signal nach IL-1 Stimulation etwa vierfach reduziert (Abb. 5.27, B). Die Rekrutierung der Polymerase II nahm um etwa 50% unter diesen Bedingungen ab.

Durch die beobachtete Einflussnahme von p65 und CDK6 auf die Pol II Rekrutierung und die *IL8* Transkription, war es von Interesse auch für CDK6 eine Bindungskinetik zu erstellen. Das Primerpaar für den Promotor von *CXCL2* war dafür besonders geeignet, da hier im Gencluster die stärksten CDK6 Signale detektiert werden konnten und so auch niedrige Anfangs- und Schlusspunkte innerhalb einer Kinetik sichtbar werden sollten. Die ChIP für die Kinetik wurde in KB-Zellen durchgeführt, die für verschiedene Zeitpunkte mit IL-1 behandelt worden waren (Abb.5.28). Analog zu den zuvor beschriebenen Vorgängen am *IL8* Gen, kam es auch am *CXCL2* Locus zur raschen Rekrutierung von p65 mit dem erstem Signalanstieg 10 min nach IL-1 Stimulation, einem Maximum bei 30 min und der nachfolgenden Abnahme bis fast zum Basallevel nach 360 min. Auch die Rekrutierung der aktivierten transkriptions-initiiierenden Form der Polymerase II folgte dieser Kinetik mit einem Maximum der Bindung zwischen 30 und 60 min. Die durchgeführte Bindungskinetik für CDK6 zeigte, dass dieses Protein ebenfalls sehr schnell nach IL-1 Gabe rekrutiert wurde. Der Höhepunkt konnte für CDK6 bereits nach 20 min festgestellt werden und das Signal sank dann relativ deutlich bereits nach 30-60 min ab. Für den Promotor des Zielgens *CXCL2* deutet die erstellte Kinetik auf eine gleichzeitige, vielleicht sogar vorangehende Bindung von CDK6 im Vergleich zu p65 und Polymerase II hin. Dieses Ergebnis ist auch kompatibel mit dem in den „knockdown“ Experimenten beobachteten stärkeren Einfluss von CDK6 auf die induzierbare Rekrutierung von p65.

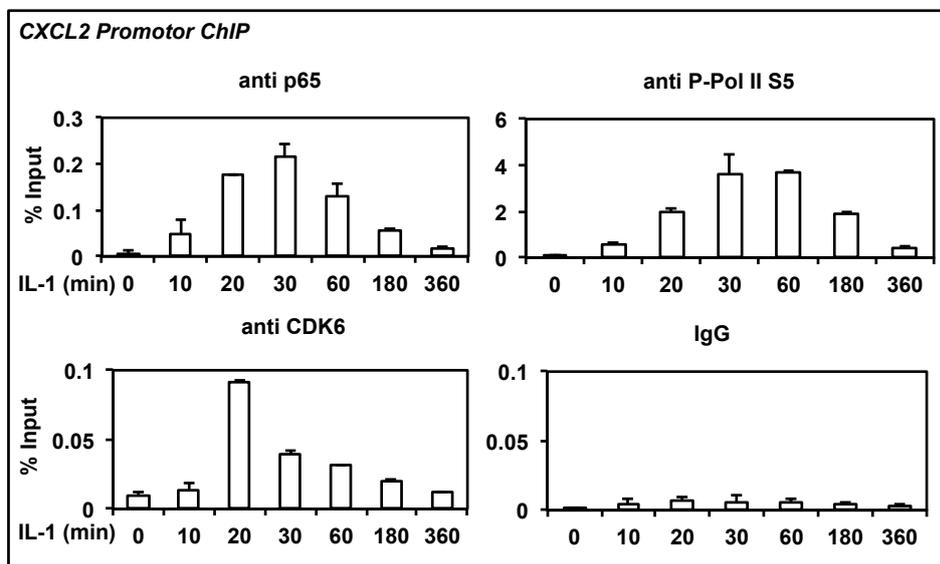


Abb. 5.28: Zeitabhängige Rekrutierung von CDK6 im Vergleich zu p65 und Polymerase II am Promotor von *CXCL2*

Mit Antikörpern gegen p65, die an Serin 5 phosphorylierte Form der Polymerase II (aktiv, transkriptions-initiiierend, P-Pol II S5) und CDK6 wurde mittels ChIP in KB-Zellen, die für die angegebenen Zeiten mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt worden waren, Bindungskinetiken durch Real time PCR Auswertungen erstellt (n=2). Als Kontrolle diente IgG, das Ergebnis ist in Prozent des Inputs angegeben und der Fehler entspricht der Standardabweichung (Abschnitt 4.10.4).

Neben des Einflusses auf den Zellzyklus ist für eine Reihe der Mitglieder der cyclinabhängigen Proteinkinasen bereits eine Beeinflussung der Gentranskription beschrieben worden (101). So sind Cyclin-abhängige Kinasen wie CDK7 und CDK9 in der Lage, die Polymerase II selbst zu phosphorylieren und damit die Aktivierung, das Voranschreiten und Pausieren des Enzyms zu beeinflussen (95). Nachdem gezeigt werden konnte, dass CDK6 im Bereich der TSS transient rekrutiert wird, stellte sich die Frage, ob auch diese CDK einen ähnlichen Einfluss auf Pol II haben könnte wie CDK7 oder CDK9, insbesondere an einem IL-1 Zielgen. Daher wurden unter identischen „Arrest/Release“ und IL-1 Stimulationsbedingungen wie zuvor beschrieben, in HeLa Kontroll-Zellen und in CDK6 „knockdown“ Zellen CHIP Experimente mit „Scanning Primern“ durchgeführt, die das gesamte *IL8* Gen abdecken (Abb.5.29).

Bei der Ausbildung des Präinitiationskomplexes im Bereich des Transkriptionsstarts wird die Polymerase II an Serin 5 phosphoryliert (95), was auch im durchgeführten CHIP detektiert werden konnte. Dieses Signal nahm über das Gen hinweg ab, während die Phosphorylierung an Serin 2, die typisch für Elongation und Lösen der Polymerase am Ende der Transkription ist (95), über das Gen hinweg zunahm. Zusätzlich zur Darstellung der CHIP-Signale als Prozent vom Input wurden die relativen Pol II-Phosphorylierungen durch Normalisierung gegen die Gesamtmenge an rekrutierter Polymerase II dargestellt, die mit einem Pol II Antikörper ermittelt wurde. In HeLa-Zellen mit einem CDK6 „knockdown“ sieht man hier leicht erhöhte Werte für die Phosphorylierung an Serin 5. Am auffälligsten ist auch in dieser CHIP der starke Einfluss von CDK6 auf die Rekrutierung der Polymerase selbst. Diese ist durch die reduzierte Menge an endogener CDK6 deutlich vermindert. CDK6 ist also in erster Linie mitentscheidend für die Anlagerung der Polymerase II nach IL-1 Behandlung, ein „knockdown“ führt aber auch zu leicht erhöhten Werten der relativen Phosphorylierung an Serin 5.

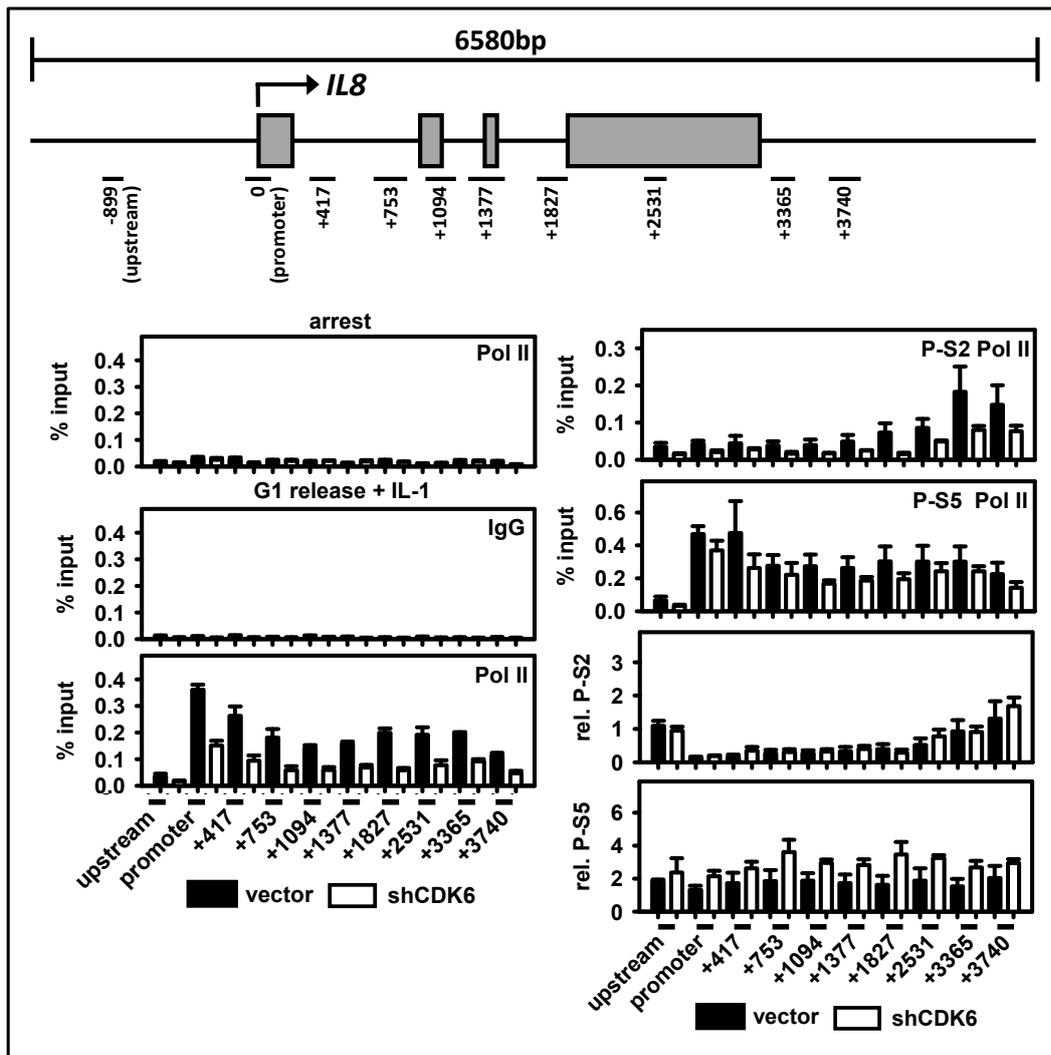


Abb. 5.29: Aktivierung und Verteilung der Polymerase II über dem gesamten *IL8* Locus in Abhängigkeit von CDK6

Das obere Schema zeigt die Lage aller verwendeten Primer über dem Locus von *IL8*. Für die ChIP-Analyse wurden erneut die bereits beschriebenen HeLa-Zellen mit stabilem CDK6 „knockdown“ oder Leervektor-Kontrolle verwendet (Johanna Sölch, Katja Handschick), die sich im Zellzyklus-Arrest oder G1 „Release“ mit IL-1 Behandlung befanden (10 ng/ml, 60 min, Abb. 5.26). Es wurden Antikörper gegen Polymerase II sowie die an Serin 5 (initiierende Form) oder Serin 2 (elongierende Form) phosphorylierte Pol II eingesetzt. Durch Normalisierung gegen den Pol II Antikörper wurden die relativen Signale für die phosphorylierten Formen bestimmt (rel. P-S2, rel. P-S5). Die Auswertung erfolgte mittels Real time PCR als Prozent des Inputs (n=2), der Fehler wurde durch den „Standard error of the mean“ (Sigma Plot, Version 11.0) ermittelt (Abbildung aus 64, Lizenznummer 3541300192068).

Zusammenfassend identifizieren diese Ergebnisse mit der Proteinkinase CDK6 einen neuen Faktor, der an das Chromatin, insbesondere auch der IL-1-induzierten Zielgene, rekrutiert wird. Gemeinsam mit den umfangreichen funktionellen Untersuchungen, welche in der Dissertation von Katja Handschick (AG Kracht) und in der dazugehörigen Veröffentlichung dargestellt sind (64), weisen diese Ergebnisse der „klassischen“ Zellzyklus Kinase CDK6 damit eine neue nukleäre Funktion zu (Abb.5.30).

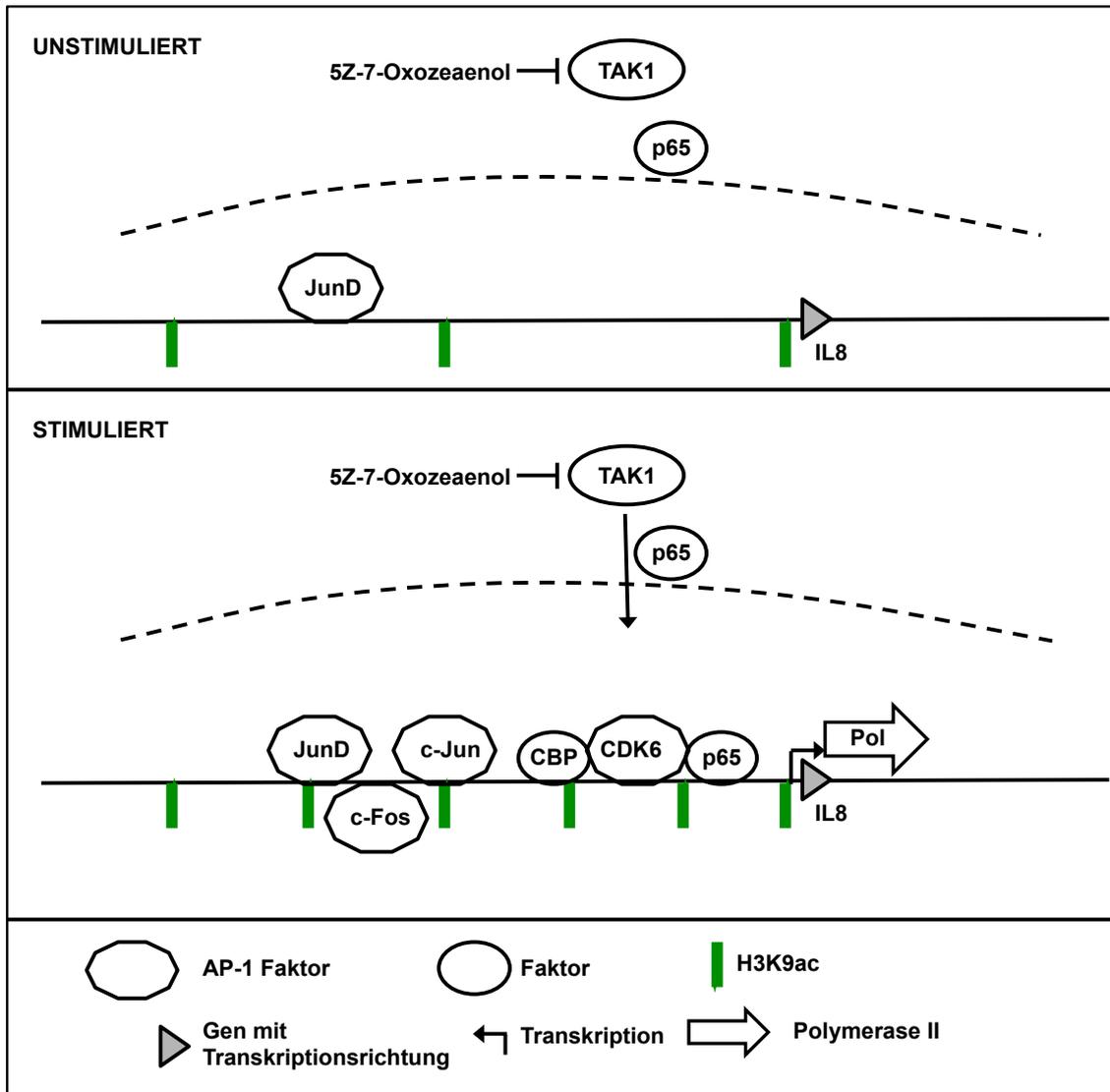


Abb. 5.30: Integration von CDK6 als neuem Kofaktor in das Modell zur Veranschaulichung der nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort von Epithelzellen

Die durch Vorversuche der Arbeitsgruppe als *IL8* Regulator charakterisierte Proteinkinase CDK6 konnte durch ChIP am Chromatin von *IL-1* Zielgenen nachgewiesen werden. Die CDK6-Rekrutierung trat dabei ebenfalls *IL-1* und TAK1-abhängig auf. Genomweit besteht eine Korrelation in der Anwesenheit von p65, CDK6 und Polymerase II an aktiven Promotorbereichen, insbesondere auch an Genen der Entzündungsantwort in Epithelzellen.

5.6 Identifizierung und Charakterisierung zweier Enhancerbereiche „upstream“ der beiden Startgene im *IL-1* koregulierten Chemokingen-Cluster

Bis zu diesem Punkt waren eine Reihe an *IL-1*-induzierbaren Chromatinfaktoren sowie einige charakteristische Histonmodifikationen an den Promotoren des Chemokingen-Clusters charakterisiert worden. Im Folgenden stellte sich die Frage, inwieweit weitere genomische, genfreie Regionen an der Regulation des Clusters beteiligt sein könnten, da im *CXC*-Chemokingen-Cluster auf Chromosom 4 neben den p65-Bindungsstellen an den Zielgenen

selbst zwei zusätzliche IL-1-regulierte p65 Peaks jeweils „upstream“ der beiden „Startgene“ *IL8* und *CXCL2* identifiziert worden waren. Diese wurden daraufhin auf typische Enhancer-Merkmale und auf ihre Zusammensetzung Chromatin-gebundener Proteine unter Berücksichtigung der bisher bereits an den Promotoren charakterisierten Chromatinfaktoren überprüft.

5.6.1 Die Chromatinabschnitte im Bereich der IL-1 regulierten p65 Peaks „upstream“ der beiden Startgene des Clusters weisen Enhancer-typische Histonmodifikationen auf

Wie in der Einleitung ausführlich beschrieben, kann der Histonstatus eines DNA-Bereiches viele Hinweise auf zugrunde liegende Regulationsmechanismen der Chromatinstrukturen geben. H3K27 Acetylierung und H3K4 Monomethylierung zeichnen dabei aktive Enhancer aus, genauso wie die Bindung des Faktors CBP (38, 140). Für beide Histonmodifikationen wurden in KB-Zellen ChIP-Seq Profile erstellt und für die Bereiche um die Promotoren der Startgene und die möglichen Enhancer zusammen mit den p65-Bindungsprofilen einander gegenüber gestellt (Abb.5.31).

Die H3K4 Monomethylierung trat an den „upstream“ p65 Peaks von *IL8* (Abb. 5.31, A) und *CXCL2* (Abb. 5.31, B) mit deutlichen Signalen auf, während diese an den Promotoren der Startgene schwächer detektierbar waren. Ebenfalls deutlich ausgeprägt konnte die H3K27 Acetylierung in den Enhancer-Bereichen gemessen werden und erneut niedriger an den Promotoren. Typischerweise markieren beide Modifikationen auch aktive Genpromotoren, treten aber verstärkt an Enhancern auf (38). Während die H3K4 Monomethylierung sowohl an Promotoren, als auch an den Enhancern, IL-1 unabhängig war, nahm die H3K27 Acetylierung unter IL-1 deutlich zu. Die konstitutive H3K4me1 und die IL-1 abhängige H3K27ac beschreiben dabei den typischen Zustand eines regulierten Enhancers. Beide Modifikationen konnten nicht nur direkt am „upstream“ liegenden p65 Peak beobachtet werden, sondern wiesen ein „Spreading“ in Richtung der beiden Startgene auf. Ein solcher Histonstatus mit H3K27ac und H3K4me1 trat auch im Bereich anderer, nicht IL-1 regulierter Gene, wie zum Beispiel dem *GAPDH* Locus auf (Abb. 5.32). Bei diesem aktiven „housekeeping“ Gen fehlten aber im Gegensatz zum *CXC*-Chemokingen-Cluster die quantitativen Unterschiede zwischen Promotor und Enhancer sowie die IL-1 abhängige Regulation. Sowohl p65 Bindung, als auch H3K4me1 und H3K27ac waren in diesem Genbereich nur konstitutiv nachweisbar.

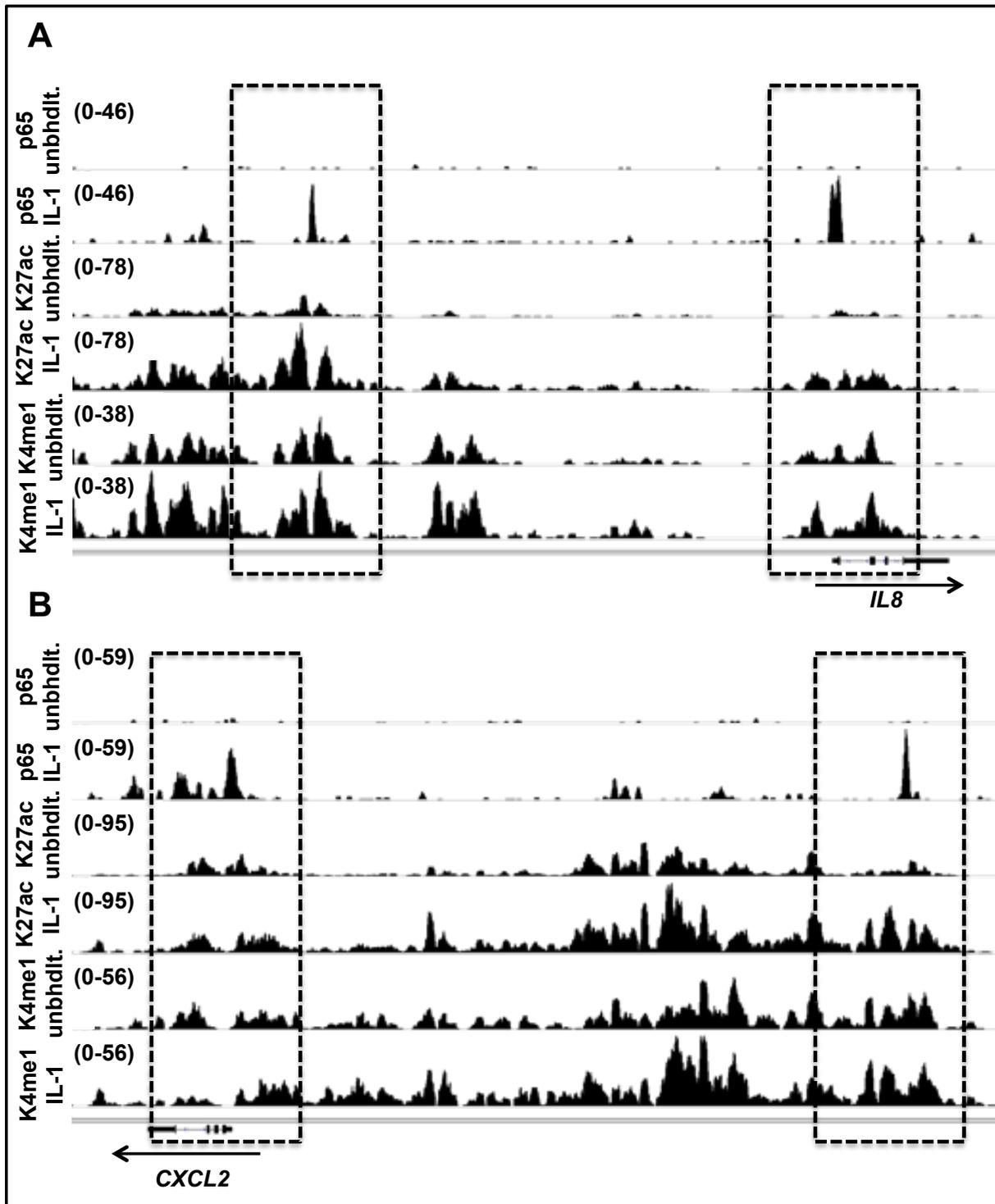


Abb. 5.31: ChIP-Seq Profile wichtiger Enhancer-Histonmodifikationen im Bereich zwischen „Startgenen“ und „upstream“ liegenden p65 Peaks

Die ChIP-Seq Profile für die Histonmodifikationen H3K27 Acetylierung (K27ac) und H3K4 Monomethylierung (K4me1) sowie für p65 wurden in unbehandelten und IL-1 behandelten (10 ng/ml, 60 min) KB-Zellen generiert. Die Abbildung fokussiert sich dabei auf die Bereiche zwischen dem „Startgenen“ *IL8* (A) bzw. *CXCL2* (B) und dem zugehörigen „upstream“ liegenden p65 Peak. Die Bereiche um die beiden p65 Peaks sind jeweils durch Rahmen gekennzeichnet. Die Darstellung erfolgte mit dem *IGV Genome Browser*, die Zahlen in den Klammern geben die Skalierung der „read“ Dichten an.

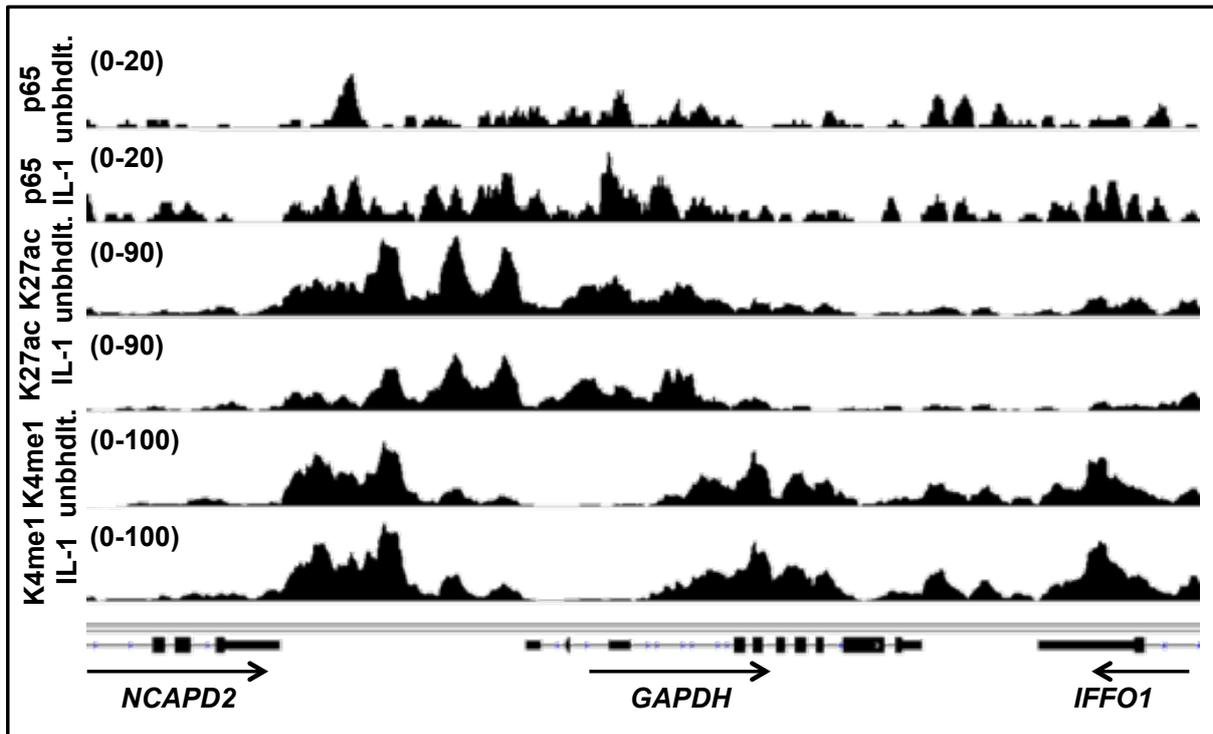


Abb. 5.32: Die Histonmodifikationen K27ac und K4me1 am *GAPDH* Locus

Die ChIP-Seq Profile für die Histonmodifikationen H3K27 Acetylierung (K27ac) und H3K4 Monomethylierung (K4me1), sowie für p65, wurden in unbehandelten und IL-1 behandelten (10 ng/ml, 60 min) KB-Zellen generiert. Die Darstellung zeigt den Bereich um das aktive Gen *GAPDH* und erfolgte mit dem IGV *Genome Browser*, die Zahlen in den Klammern geben die Skalierung der „read“ Dichten an.

Zur vollständigen Analyse der für Enhancer typischen Histonmodifikationen H3K27ac und H3K4me1, sowie möglichen Veränderungen in der Histondichte, wurden diese in Kooperation mit Johanna Sölch und Doris Newel (AG Kracht) mittels ChIP-PCRs an den Enhancern und Promotoren von *IL8* und *CXCL2* untersucht (Abb.5.33). Außerdem wurden die KB-Zellen in diesem Experiment neben IL-1 erneut auch mit dem TAK1-Inhibitor 5(Z)-7-Oxozeaenol behandelt. Durch den Einsatz mehrerer „Scanning Primer“ über den Enhancer und den Promotor sollten alle Veränderungen erfasst werden (Abb. 5.33, A).

Erwartungsgemäß konnte die aktive, transkriptions-initiiierende Form der Polymerase II nur an den Promotoren detektiert werden, während p65 auch an den Enhancern messbar war (Abb. 5.33, B). Unter IL-1 kam es an den gesamten Loci zu einer Abnahme der Histondichte, besonders ausgeprägt im Bereich der p65-Bindestellen, was auf Chromatin-Remodelling Vorgänge hindeutet. Normierte man die Signale für H3K27ac und H3K4me1 gegen das Signal für H3, war unter IL-1 besonders an den Enhancern ein deutlicher Anstieg der H3K27ac zu verzeichnen, während die H3K4me1 unverändert blieb (Abb. 5.33, C). Der TAK1-Inhibitor konnte alle beobachteten IL-1 Effekte auf Histondichte und Enhancer-Modifikationen stark reduzieren.

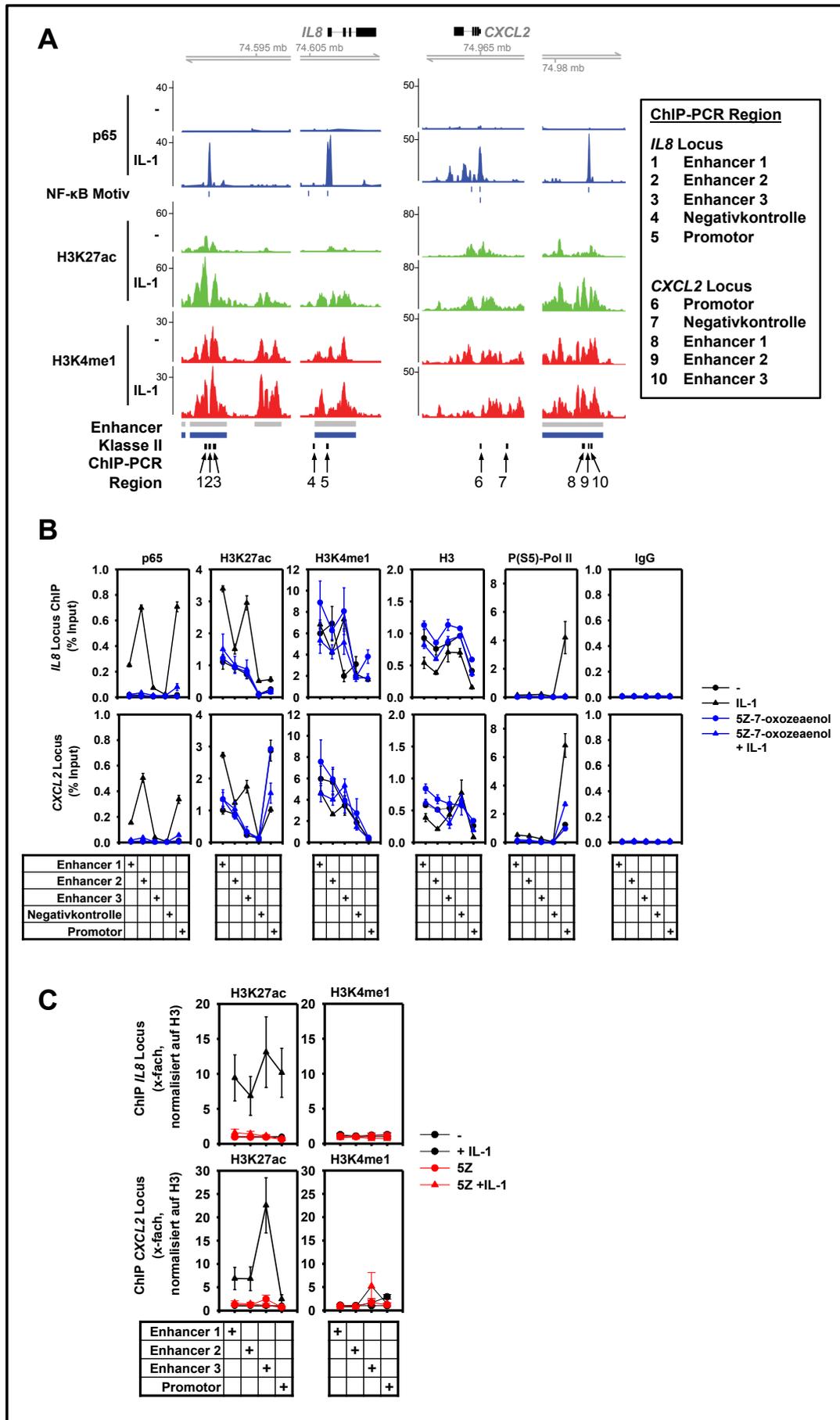


Abb. 5.33: ChIP-PCR-basierte Validierung und weitere Analyse der IL-1 und TAK1-abhängigen Veränderungen der Enhancer-typischen Histonmodifikationen

A) Die Übersicht zeigt die Lage der eingesetzten ChIP-PCR Primer am Locus von *IL8* und *CXCL2* im Vergleich zu den ChIP-Seq Profilen von p65, H3K27ac und H3K4me1, sowie ermittelten NF- κ B Motiven. **B)** Chromatin aus unbehandelten, mit IL-1 (10 ng/ml, 60 min), dem TAK1-Inhibitor (5(Z)-7-Oxozeaenol, 1 μ M, 30 min vor IL-1-Gabe) oder einer Kombination beider Stoffe behandelten KB-Zellen wurde in ChIP-Experimenten mit Antikörpern gegen p65, H3K27ac, H3K4me1, H3 und an Serin 5 phosphorylierte Polymerase II (P(S5)-Pol II) analysiert (n=2). Bei der Auswertung mittels Real time PCR wurden die in A) beschriebenen Primer verwendet und IgG diente als Kontrolle. Die Werte sind als Prozent des Inputs angegeben, der Fehler entspricht dem „Standard error of the mean“ (Sigma Plot, Version 11.0). **C)** Die unter B) generierten Werte für die H3K27ac und H3K4me1 wurden gegen H3 normiert, um eine Anpassung an die Histondichte vorzunehmen. Kooperation mit Johanna Sölch und Doris Newel, Abbildung modifiziert aus 81, CC BY-NC-ND Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

5.6.2 Vergleich der Kofaktor-Rekrutierung an p65 Promotor und Enhancer Peaks

Enhancer weisen nicht nur einen typischen Histonstatus auf, sondern ähneln in ihrer Zusammensetzung Chromatin-rekrutierter Proteine häufig den zugehörigen Genpromotoren (38). Daher wurden die Enhancer-Bereiche von *IL8* (Abb. 5.34, A) und *CXCL2* (Abb. 5.34, B) in Kooperation mit Johanna Sölch und Doris Newel (AG Kracht) zusätzlich auf die Bindung weiterer Proteine neben p65 im ChIP überprüft.

Enhancer und Promotor wiesen an beiden Genen eine ähnliche Zusammensetzung an Kofaktoren auf. Auch an den Enhancern war eine bereits konstitutiv vorhandene Bindung von JunD nachweisbar, während der Faktor c-Fos, wie p65 selbst, erst nach IL-1 Stimulation deutlich detektierbar war. Die Signale der übrigen getesteten Faktoren JunB, c-Jun, CBP, ATF2 und FRA1 waren, wie auch an den Promotoren, niedriger, aber meist über den Signalen der IgG-Kontrolle. Der in diesem Experiment verwendete Antikörper-„Lot“ für JunB ergab etwas stärkere Signale als in Abb. 5.20. Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass sowohl für den *IL8*, als auch für den *CXCL2* Locus, die rekrutierten Kofaktoren an Promotor und Enhancer übereinstimmten und fast immer durch den TAK1-Inhibitor in ihrer Bindung gehemmt wurden, wobei die 5(Z)-7-Oxozeaenol-Effekte auf die Basallevel relativ niedrig waren oder kein Effekt zu sehen war.

In weiteren ChIP-Experimenten in Kooperation mit Johanna Sölch und Doris Newel (AG Kracht) wurde auch die Kinetik der Bindung der einzelnen Proteine an die Enhancer und Promotoren der beiden „Startgene“ des CXC-Chemokingen-Clusters untersucht (Abb. 5.35). Die Rekrutierung von p65 erfolgte an Enhancer und Promotor etwa zeitgleich, aber mit einer sehr leichten Verzögerung für den Enhancer-Bereich. Die Wiederabnahme des Signals war wiederum zur gleichen Zeit detektierbar. Die ChIP-PCR Signale für die übrigen Faktoren zeigten an beiden Genen für Enhancer und Promotor eine sehr ähnliche Kinetik, wobei sie an den Enhancern stets insgesamt niedriger waren. Während die PCR-Signale für die Proteine c-Fos und CBP 360 min nach der IL-1 Stimulation wieder ihren Basalwert

erreichten, waren sie für JunD, FRA1, ATF2, c-Jun und JunB zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zum Ausgangswert meist noch erhöht.

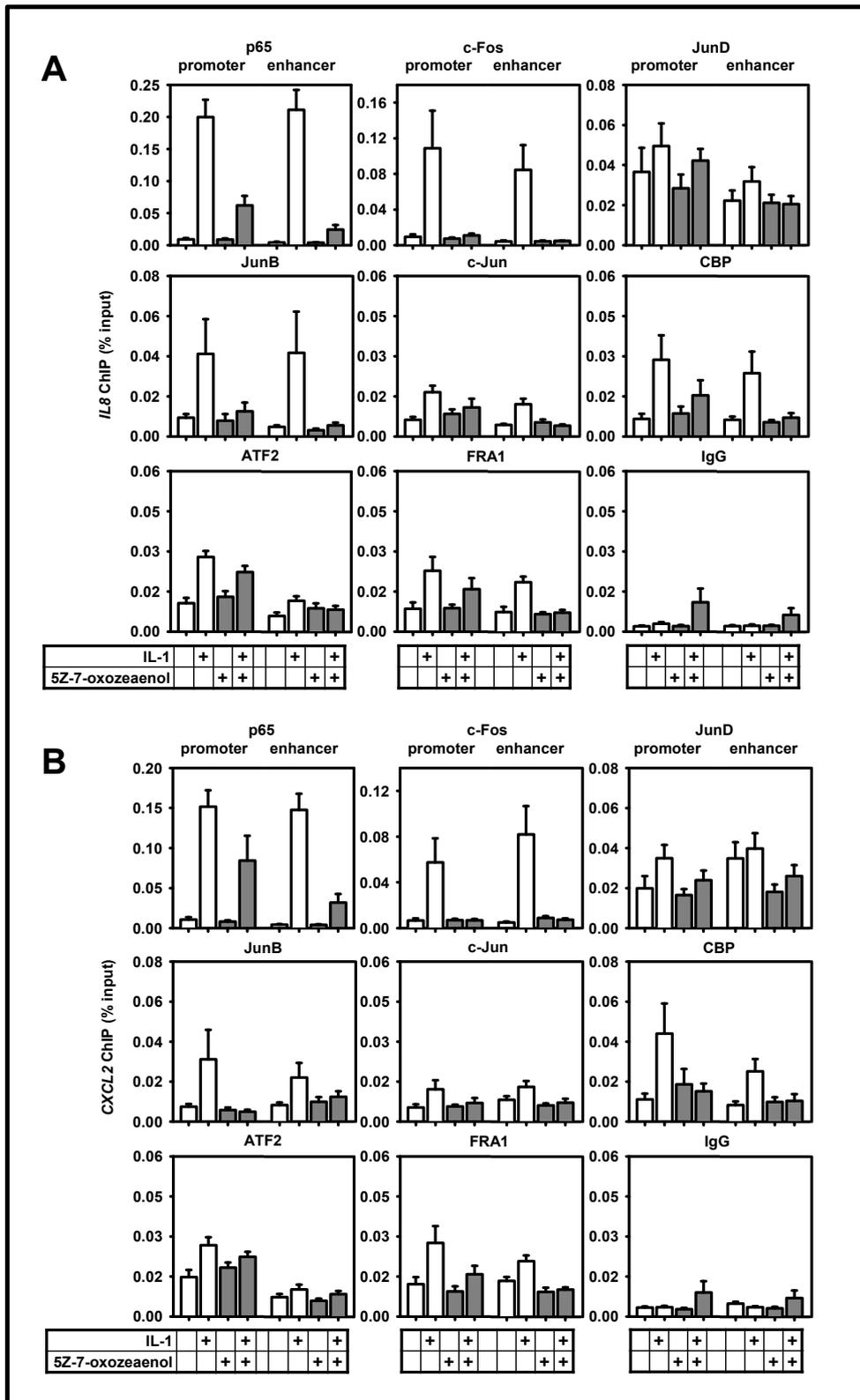


Abb. 5.34: Vergleich der Faktor-Zusammensetzung an Promotor und Enhancer von *IL8* und *CXCL2*

ChIP gegen verschiedene vorher bereits am Promotor detektierte Proteine in KB-Zellen mit

und ohne IL-1 (10 ng/ml, 60 min) bzw. TAK1-Inhibitor Behandlung (5(Z)-7-Oxozeaenol, 1 μ M, 30 min vor IL-1 Gabe). Es wurden jeweils die Primer für Promotoren und Enhancer von *IL8* (**A**) und *CXCL2* (**B**), sowie Antikörper gegen p65, c-Fos, JunD, JunB, c-Jun, CBP, ATF2 und FRA1 verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels Real time PCR als Prozent des Inputs (n=2) und IgG diente als Kontrolle. Der Fehler entspricht dem „Standard error of the mean“ (Sigma Plot, Version 11.0). Abbildung modifiziert aus 81, CC BY-NC-ND Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

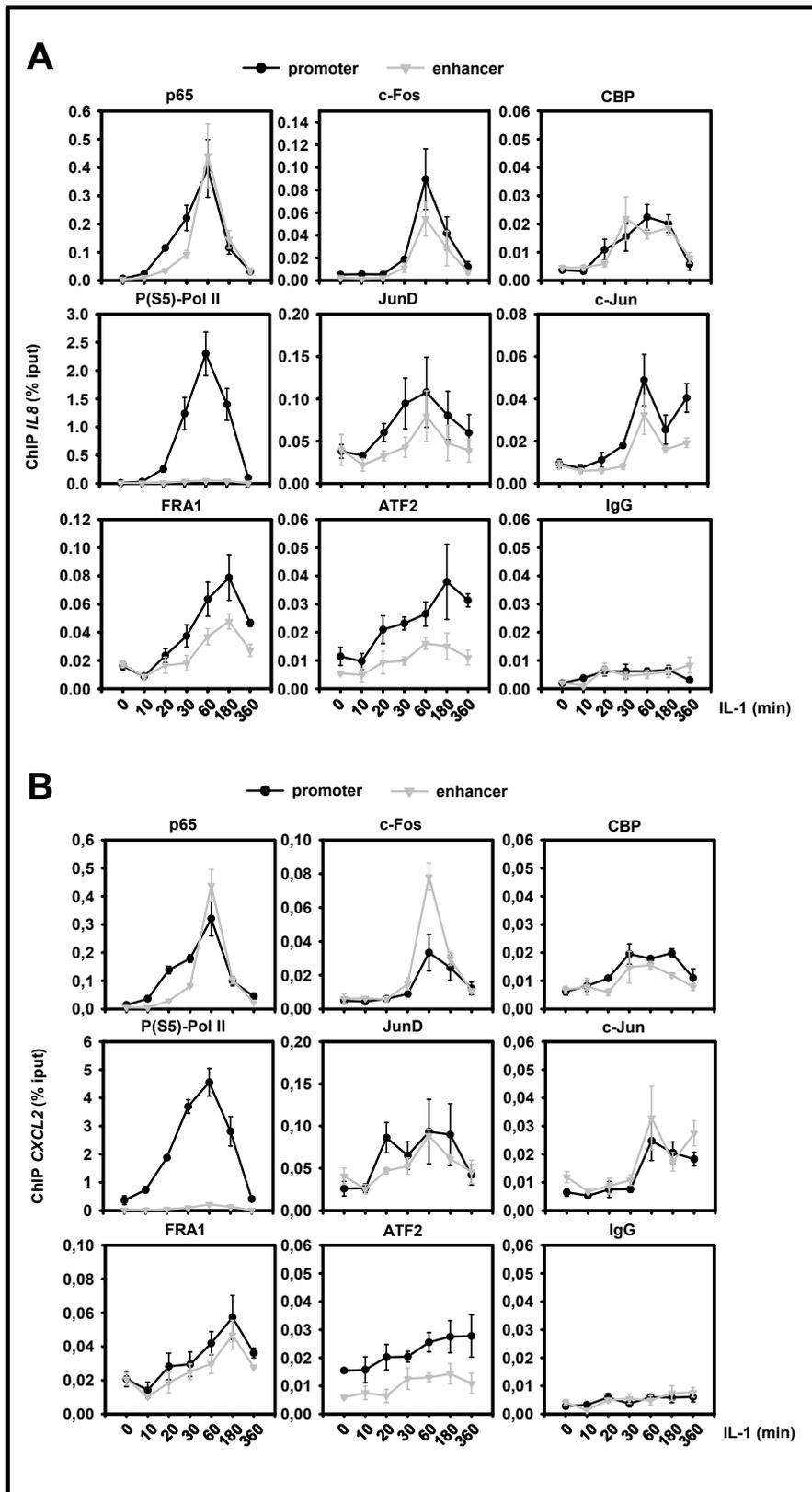


Abb. 5.35: Bindungskinetik der an Promotor und Enhancer von *IL8* und *CXCL2* detektierten Faktoren

KB-Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt und anschließend in ChIP-Experimenten in Kooperation mit Johanna Sölch und Doris Newel (AG Kracht) untersucht (n=2). Dabei wurden die gleichen Primer und Antikörper wie in Abb. 5.33 verwendet und der Locus von *IL8* (**A**) und *CXCL2* (**B**) analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels Real time PCR als Prozent des Inputs und IgG diente als Kontrolle. Der Fehler

entspricht dem „Standard error of the mean“ (Sigma Plot, Version 11.0). Abbildung aus 81, CC BY-NC-ND Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

Insgesamt ähneln sich Promotor und Enhancer also nicht nur in der Zusammensetzung detektierbarer Kofaktoren, sondern auch in der Bindungskinetik dieser Proteine. Das in dieser Arbeit neu am Chromatin von IL-1 Zielgenen nachgewiesene Protein CDK6 bildete allerdings eine Ausnahme und wurde nicht an Enhancer rekrutiert (Abb. 5.36). Hier wurde außerdem die phosphorylierte Form der Polymerase II mit unterschiedlicher Skalierung dargestellt, um zu zeigen, dass auch am Enhancer Spuren von Pol II detektiert werden konnten, die eine ähnliche Kinetik wie am Promotor aufwiesen. Die Signale lagen über den IgG-Kontrollen, waren aber verglichen mit dem Promotor extrem niedrig und könnten auch auf eine indirekte ChIP durch räumliche Nähe zwischen Promotor und Enhancer während dem Vorgang des „Crosslinkings“ zurückzuführen sein. Dieses erscheint plausibel, weil in der RNA Sequenzierung keine Transkripte in diesem Bereich gefunden wurden.

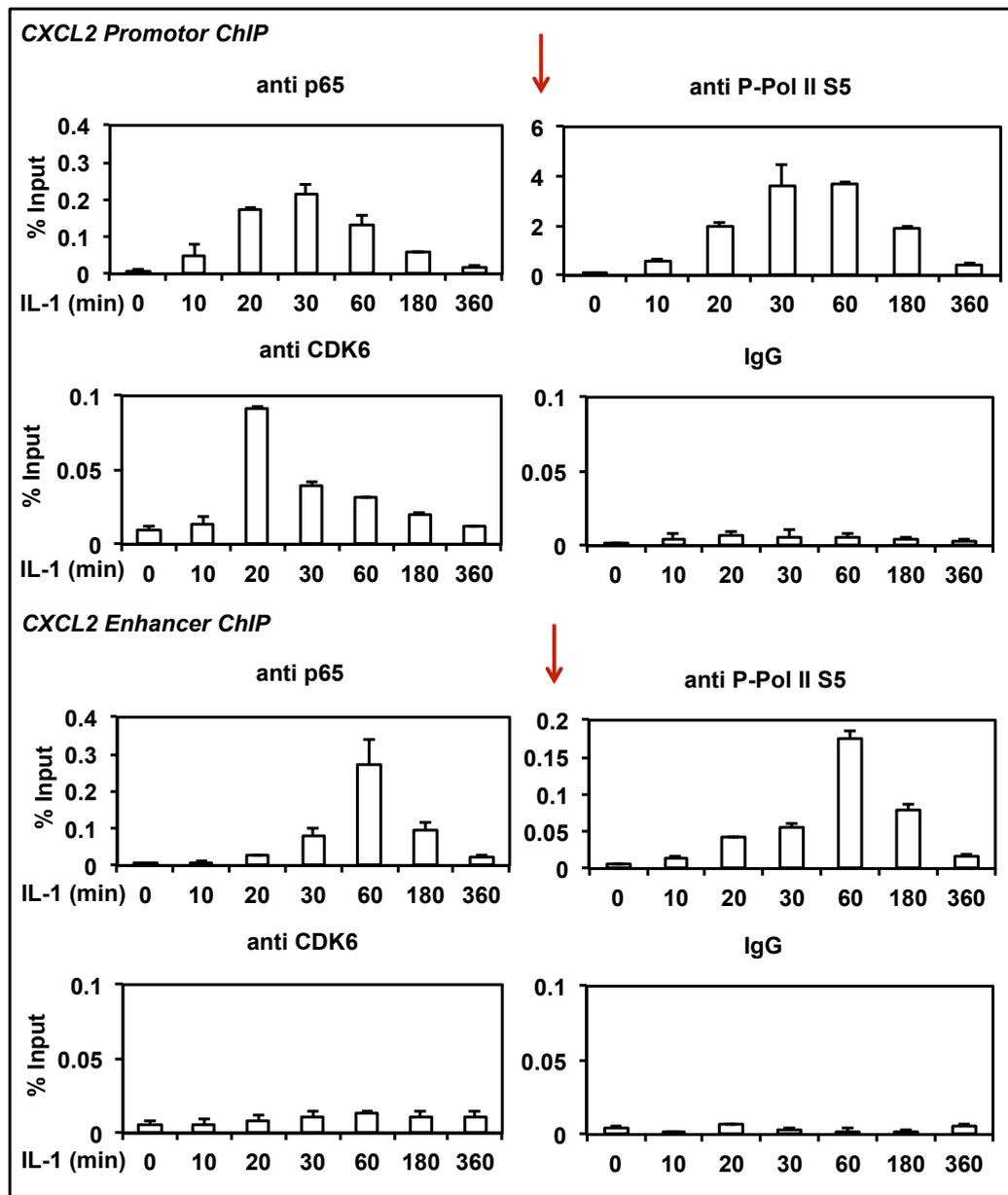


Abb. 5.36: Analyse möglicher Bindung von CDK6 und Polymerase II an den Enhancer von CXCL2

KB-Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit IL-1 behandelt (10 ng/ml) und in einer ChIP mit den Antikörpern gegen p65, aktive Form der Polymerase II (phosphoryliert an Serin 5, P-Pol II S5) sowie CDK6 analysiert (n=2). Es wurden Primer für den Locus von CXCL2 verwendet, da mit dem CXCL2 Promotor Primerpaar die stärksten CDK6 Signale gemessen werden konnten. Die Auswertung erfolgte mittels Real time PCR als Prozent des Inputs und IgG diente als Kontrolle. Für die Beurteilung der Signale für die Pol II wurde die Skalierung am Enhancer angepasst (markiert durch roten Pfeil).

5.6.3 CTCF und Kohesin Bindestellen im Chemokingen-Cluster deuten auf eine komplexe dreidimensionale Struktur hin

Die vorangegangenen Experimente zeigten eindrücklich, dass die identifizierten zusätzlichen p65 Bindestellen „upstream“ der beiden Startgene des Chemokingen-Clusters typische Enhancer-Merkmale aufweisen. Die Wirkungsweise von Enhancern wird durch die dreidimensionale Organisation des Chromatins einer Region beeinflusst und so findet man in

solchen Bereichen häufig Proteine, die für eine solche Domänen-Strukturierung notwendig sind (102, 122). An solchen „Enhancer blocking“ und „Enhancer activating“ Vorgängen kann das DNA-bindende Protein CTCF beteiligt sein (82, 122, 139). Dieses interagiert mit Komponenten des Kohesin-Komplexes (129, 144, 161, 171), der durch die Ausbildung einer ringförmigen Struktur Chromatinstränge in räumliche Nähe zueinander bringen kann (143). Durch eine CTCF ChIP-Seq sollte das CXC-Chemokingen-Cluster auf Hinweise für eine solche Strukturierung hin untersucht werden. Dazu wurden in KB-Zellen unter den vier bereits angewandten Behandlungsbedingungen (unbehandelt, IL-1, TAK1-Inhibitor, Kombinationsbehandlung aus IL-1 und TAK1-Inhibitor) alle CTCF „sites“ des Clusters charakterisiert (Abb. 5.37).

Innerhalb des CXC-Chemokingen-Clusters konnten so acht CTCF Bindestellen detektiert werden, die ebenfalls eine tendenziell spiegelbildliche Anordnung aufwiesen. So befand sich jeweils eine „site“ in den Enhancer-Bereichen der beiden Startgene, wobei diese am *IL8* Enhancer „downstream“ und am *CXCL2* Enhancer „upstream“ von der p65-Bindestelle lag. Innerhalb des Clusters konnte CTCF an den Promotoren von allen induzierbaren Genen des Clusters detektiert werden (*IL8*, *CXCL1*, *CXCL3* und *CXCL2*). Zusätzlich traten zwei schwächere intragenische Peaks auf (CTCF4 und CTCF6), die im ChIP-Seq allerdings nur unter dem TAK1-Inhibitor beobachtet werden konnten. Für alle CTCF Signale konnte keine deutliche IL-1 Regulation nachgewiesen werden, während sich unter dem Einfluss des TAK1-Inhibitors manche Signale verstärkten (CTCF1, CTCF3) und andere abschwächten (CTCF2).

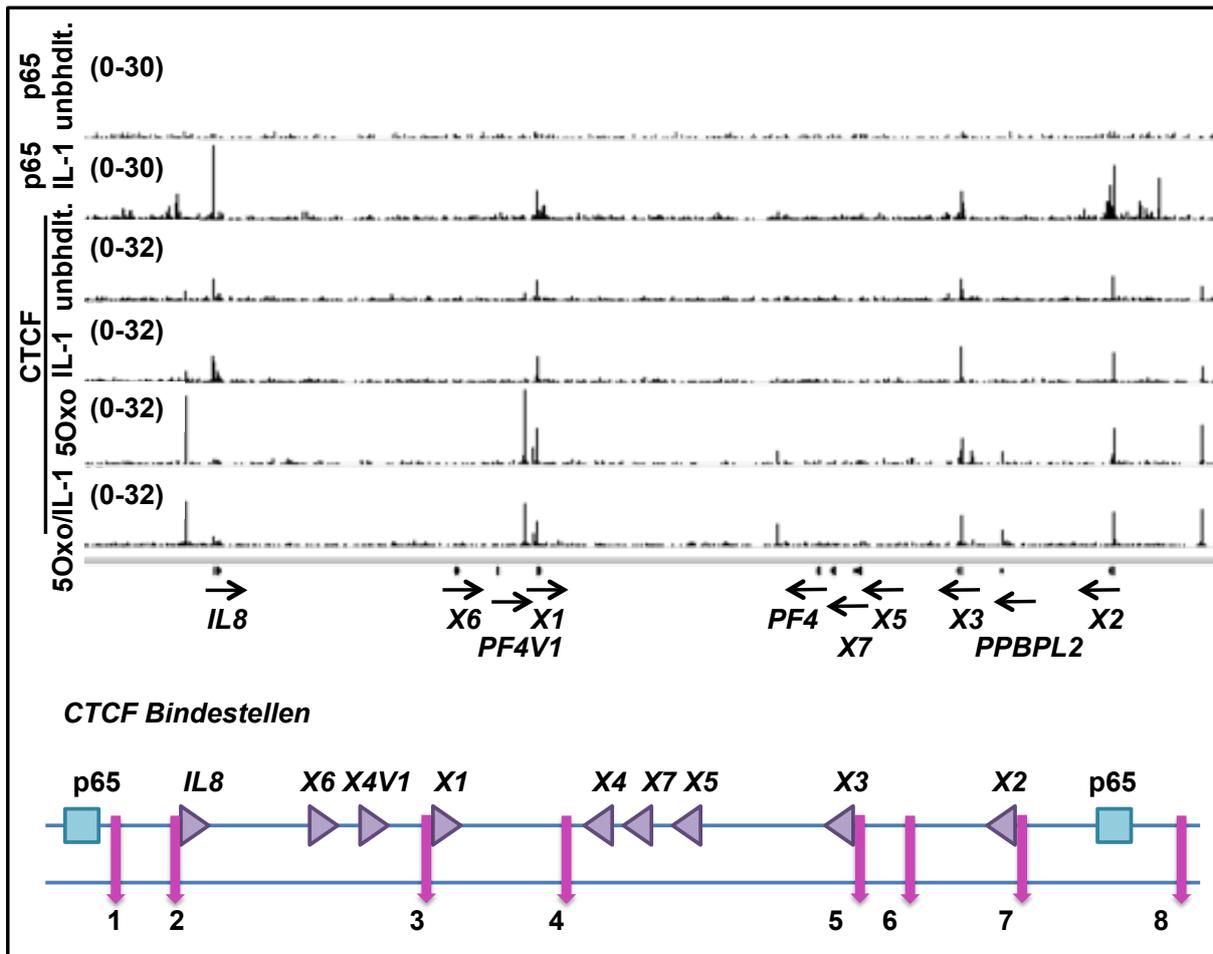


Abb. 5.37: CTCF ChIP-Seq Profile im CXC-Chemokinen-Cluster

Mittels ChIP-Seq wurden in KB-Zellen mit und ohne IL-1 (10 ng/ml, 60 min) bzw. 5(Z)-7-Oxozeaenol (5Oxo, 1 μ M, 30 min vor IL-1 Gabe) alle CTCF-Bindestellen innerhalb des Genclusters identifiziert. Zum Vergleich sind die ChIP-Seq Profile von p65 in unbehandelten und IL-1 behandelten Zellen aufgeführt (oben). Alle acht CTCF „sites“ sind in der unteren Übersicht in ihrer Lage zu den einzelnen Genen (lila Pfeile) bzw. den Enhancern (hellblaue Quadrate) aufgeführt. Die Darstellung erfolgte mit dem *IGV Genome Browser*, die Zahlen in den Klammern geben die Skalierung der „read“ Dichten an. Die Beschriftungen geben die Gennamen an (X als Abkürzung für CXCL), die Pfeile repräsentieren die Transkriptionsrichtung.

Bei der Ausbildung von räumlichen Chromatinstrukturen spielt die Assoziation von CTCF mit dem Kohesin-Komplex eine wichtige Rolle (13, 12, 161, 171, 174). Um dieses innerhalb des Chemokinen-Clusters zu überprüfen, wurde eine Chromatin-IP mit einem Antikörper gegen die Kohesin-Untereinheit Rad21 durchgeführt und an Beispielen detektierter CTCF „sites“ ausgewertet (Abb.5.38). An den CTCF Bindestellen in den Enhancer-Bereichen der beiden „Startgene“ (CTCF1 und CTCF8) war neben starken CTCF-Signalen auch deutliche Rad21-Bindung messbar. Die CTCF „sites“ an den Genpromotoren von CXCL1 und CXCL2 (CTCF3 und CTCF7) bestätigten sich ebenfalls im ChIP und wiesen auch Rad21-Signale auf. Als Beispiel für intragenische CTCF Peaks wurde CTCF6 überprüft. Hier war CTCF ohne den TAK1-Inhibitor, wie auch im ChIP-Seq, kaum nachweisbar und das Gleiche galt für Rad21.

Sowohl die Bindung von CTCF als auch von Rad21 zeigte eher schwache IL-1 Regulation, an einigen „sites“ war für Rad21 eine leichte IL-1 Induktion zu erkennen. Stärker ausgeprägt war diese an den zusätzlich eingesetzten Primern für den Promotor und Enhancer p65 Peak von *IL8*. Interessanterweise waren die schwachen Rad21-Signale hier IL-1 induziert, während CTCF nicht sichtbar war.

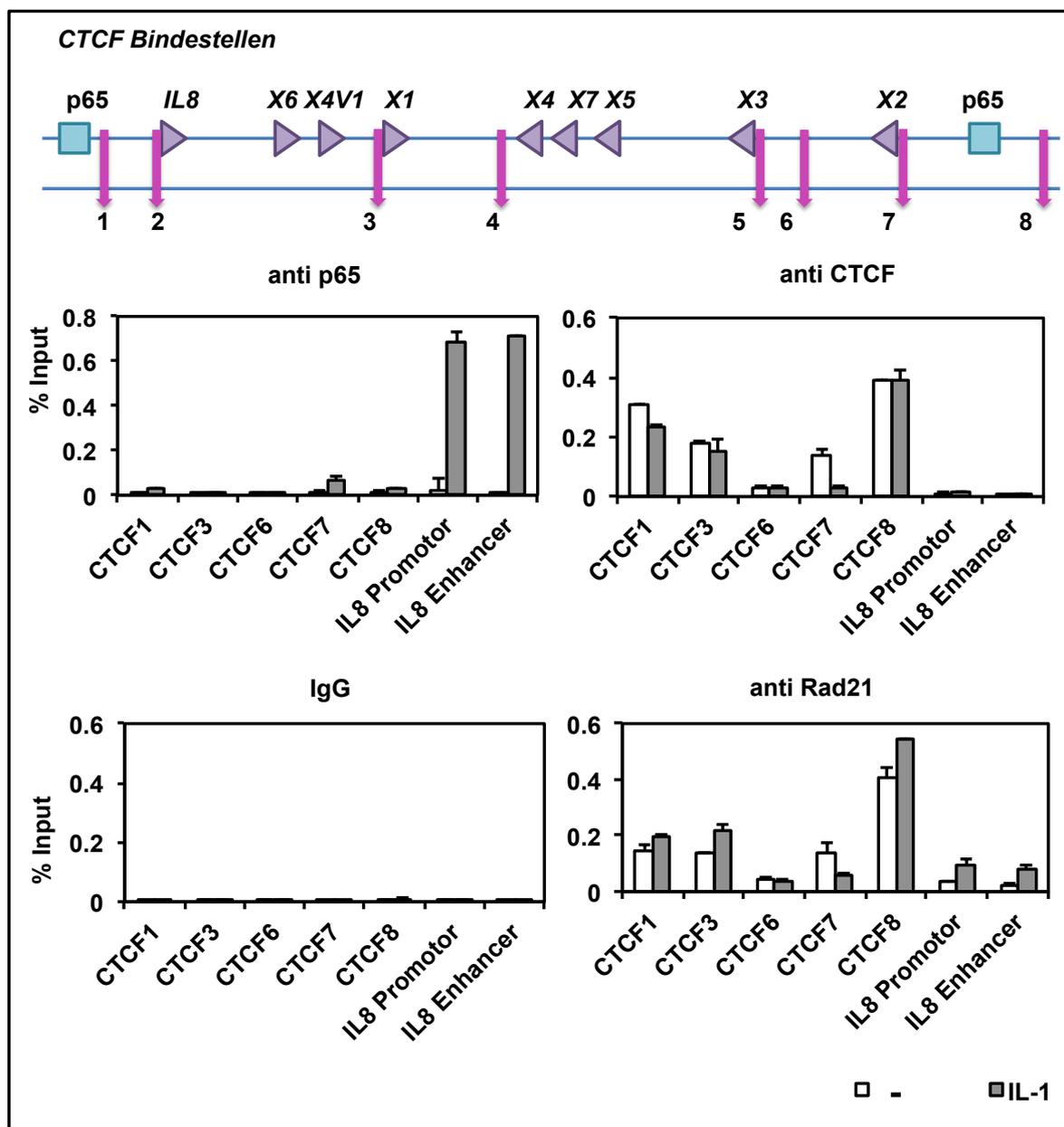


Abb. 5.38: Überprüfung von CTCF-Bindestellen auf die Assoziation mit Rad21

Für einige der detektierten CTCF-Bindestellen im CXC-Chemokinen-Cluster wurde eine ChIP in unbehandelten (-) und IL-1 (10 ng/ml, 60 min) behandelten KB-Zellen zur Detektion von Rad21 durchgeführt. Dabei wurden sowohl Bindestellen der Enhancer-Bereiche als auch Beispiele für „sites“ an Promotoren und in intragenischen Bereichen ausgewählt. Zum Vergleich wurden auch Antikörper gegen p65 und CTCF eingesetzt, sowie die bereits vorher verwendeten Primer für die p65-Bindestellen an Promotor und Enhancer von *IL8*. Die Auswertung erfolgte mittels Real time PCR als Prozent des Inputs (n=2), IgG diente als Kontrolle und der Fehler entspricht der Standardabweichung (Abschnitt 4.10.4).

Zusammenfassend waren sowohl CTCF, als auch die Kohesin-Untereinheit Rad21, innerhalb des Genclusters nachweisbar. Die deutlichsten Signale ließen sich dabei in zwei Gruppen unterscheiden: Zum einen CTCF/Kohesin-Bindung in den Enhancer Bereichen und zum anderen an den Promotoren der IL-1 induzierbaren Genen des Clusters. An den Promotoren lagen diese dabei versetzt von den p65-Bindestellen, weswegen beide Proteine nicht mit den selben Primern detektiert wurden. Das Auftreten von CTCF und Kohesin, insbesondere in den Enhancer-Bereichen, verstärkte die bereits beobachteten, typischen Enhancer-Merkmale und deutete auf eine komplexe, dreidimensionale Struktur des CXC-Chemokingen-Clusters hin.

Die auffällige CTCF-Bindung an alle IL-1 induzierbaren Gene des Clusters könnte für die Aktivierbarkeit dieser Gene von großer Bedeutung sein. Dies könnte zum einen über die Kontaktvermittlung zum Enhancer bei der Strukturierung des Locus erfolgen, zum anderen mit einer positiven Rolle von CTCF bei der Aktivierung dieser Gene zusammenhängen. Um einen Hinweis darauf zu erlangen, ob CTCF tatsächlich mit der IL-1 Induzierbarkeit der Zielgene korreliert, dienten die A549-Zellen erneut als Vergleichszellen. In diesen Zellen zeigte sich, wie bereits beschrieben, ein anderes Expressionsmuster innerhalb des Genclusters. So war das in KB-Zellen stark reprimierte Gen *CXCL5* in A549-Zellen gut durch IL-1 induzierbar (Abschnitt 5.3.3) und wies im ChIP-Seq deutliche Rekrutierung von p65 und Polymerase II auf. Daher wurde in A549- und KB-Zellen eine ChIP mit Antikörpern gegen p65 und CTCF durchgeführt und unter anderem auch mit Primern im „CpG island“ des Gens *CXCL5* ausgewertet (Abb.5.39).

An den in beiden Zelllinien gut induzierbaren Genen *CXCL1* und *CXCL2* war kein Unterschied in der CTCF-Bindung zu erkennen und das Gleiche galt auch für die CTCF-Bindestelle am Enhancer von *IL8*. Betrachtete man dagegen die CTCF Signale mit dem Primer, der im möglichen Bindebereich von CTCF im „CpG island“ von *CXCL5* detektiert, zeigte sich in den A549-Zellen ein deutlich höheres Signal als in den KB-Zellen. Der Primer befand sich offenbar auch recht nah an der p65-Bindestelle von *CXCL5*, denn auch hier ist in A549-Zellen ein Signal erkennbar, das erst nach IL-1 Behandlung auftrat. So spielte also bei der IL-1 Induzierbarkeit von Genen nicht nur der Methylierungsstatus der „CpG island“ Promotoren im CXC-Chemokingen-Cluster eine Rolle, sondern auch die CTCF-Bindung in diesem Bereich. Auffällig ist, dass im Gegensatz zu der H3K27ac Histonmodifikation und den Chromatinfaktoren, die CTCF und Rad21 Bindungsereignisse nicht Stimulus-reguliert sind. Möglicherweise determinieren diese Proteine daher eine bestimmte 3D Struktur des Chromatins, die besonders „permissiv“ für IL-1-abhängig rekrutierte Transkriptions- und Kofaktoren ist.

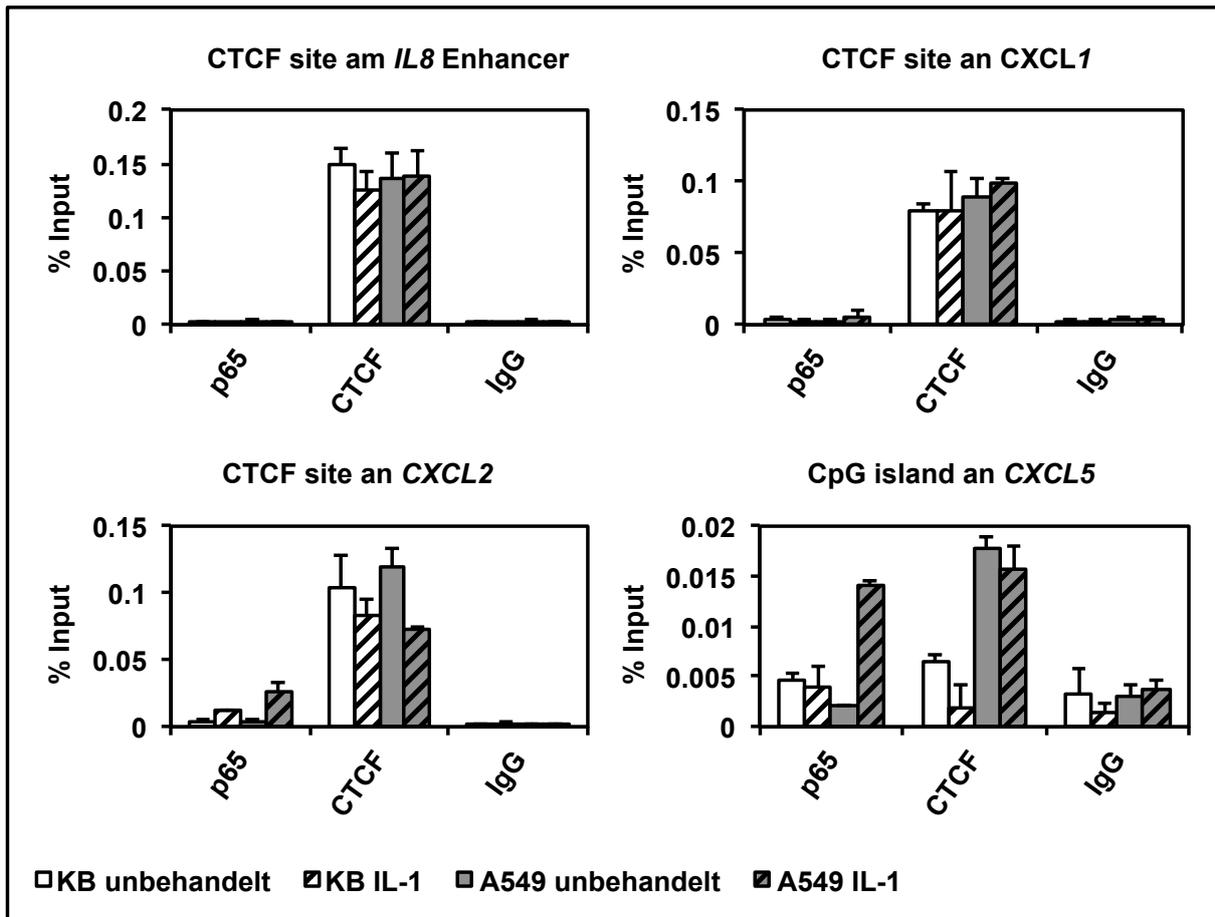


Abb. 5.39: Korrelation von CTCF-Bindung und Induzierbarkeit von IL-1 Zielgenen

Mittels ChIP wurde die Bindung von CTCF an Promotoren und Enhancer von Genen des Chemokinen-Clusters in unbehandelten und IL-1 stimulierten (10 ng/ml, 60 min) KB- und A549-Zellen miteinander verglichen. Dazu wurden die bereits beschriebenen Primer der CTCF Bindestellen für den *IL8* Enhancer (CTCF1), den Promotor von *CXCL1* (CTCF3) sowie von *CXCL2* (CTCF7) verwendet. Außerdem wurde ein Primer für das „CpG island“ des Gens *CXCL5* generiert, welches nur in A549-Zellen eine IL-1 Induzierbarkeit aufwies. Die Auswertung erfolgte mittels Real time PCR als Prozent des Inputs (n=2), IgG diente als Kontrolle und der Fehler entspricht der Standardabweichung (Abschnitt 4.10.4).

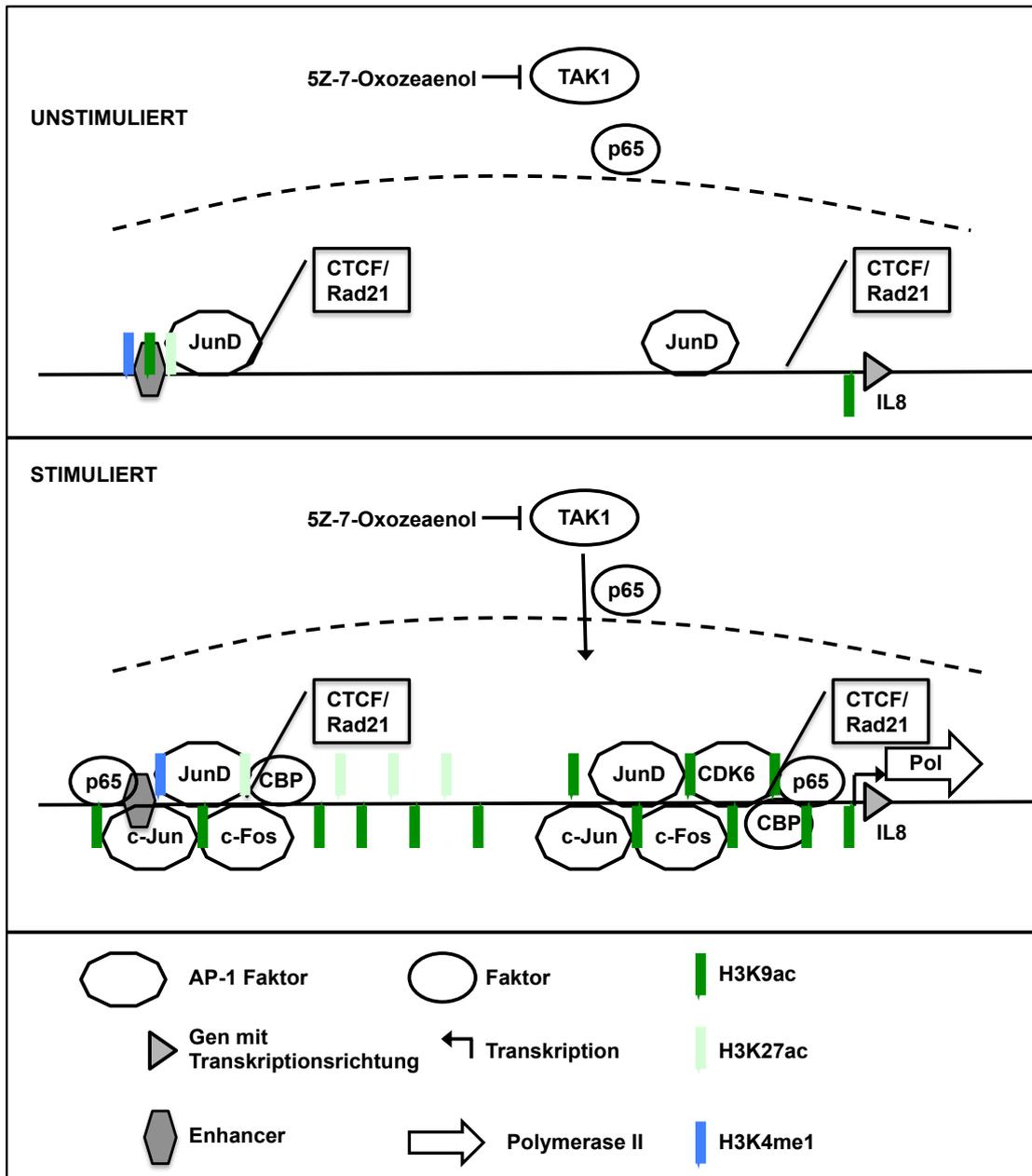


Abb. 5.40: Zusammenfassendes Modell zu Faktoren an Enhancer- und Promotorbereichen in der nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort von Epithelzellen

Die am Promotor von *IL8* bindenden Faktoren konnten auch am „upstream“ liegenden Enhancer-Bereich beobachtet werden, wobei CDK6 eine Ausnahme bildete und nur am Promotor nachweisbar war. An den Promotoren der IL-1 induzierbaren Gene des CXC-Chemokin-Genclusters und in der Nähe der Enhancer-Bereiche konnte außerdem statisch das Protein CTCF nachgewiesen werden, meist in Assoziation mit Rad21.

5.7 Identifizierung IL-1 regulierter long intergenic non-coding (linc) RNAs als weitere mögliche TAK1-abhängige Chromatinregulatoren

Bis zu diesem Zeitpunkt der Dissertation wurden die genomischen Bereiche und daran bindende Proteinfaktoren als Regulatoren von IL-1 Wirkungen am Chromatin charakterisiert. Verschieden Klassen von nicht-kodierenden RNAs können aber ebenfalls vielfältigste

Wirkungen bei der transkriptionellen Regulation sowohl an Enhancern, als auch an Promotoren, haben (113, 156).

Zur Untersuchung der IL-1 abhängigen Genregulation in Epithelzellen wurde auch die Methode der RNA-Seq herangezogen. Diese Methode erlaubt im Gegensatz zu den ebenfalls angewandten „Microarray“-Analysen auch die Detektion von *de novo*-Transkripten. Da im Bereich der Genregulation auch sogenannte lincRNAs („long intergenic non-coding RNAs“) eine Rolle spielen können, wurden die gesammelten RNA-Seq Daten in KB-Zellen auch zur Suche nach solchen RNAs verwendet.

LincRNAs wurden als RNAs mit mehr als 200 Nukleotiden definiert, können aber auch deutlich länger sein (131). Sie können Transkriptionsfaktoren beeinflussen, selbst als Kofaktoren fungieren oder auch die Gentranskription über Interferenz mit der Polymerase oder der DNA selbst regulieren (61). Über die genauen Funktionen und die generelle Bedeutung der meisten lincRNAs im menschlichen Genom ist wenig bekannt. Die RNA-Seq Auswertung in unbehandelten und IL-1 behandelten KB-Zellen ergab die Detektion von 31 IL-1 induzierten, unbekanntem *de novo*-Transkripten mit typischen Längen von lincRNAs. Diese lagen zum Großteil recht nah an IL-1 induzierten Genen, einige aber auch in komplett intergenischen Bereichen. Die Gegenüberstellung der RNA-Seq und ChIP-Seq Daten an diesen lincRNAs zeigte zusätzlich nicht nur die IL-1 induzierte Rekrutierung der Polymerase II, sondern auch an 29 der 31 lincRNA-Bereichen die Bindung von p65. Am Locus auf Chromosom 6 war der p65 Peak konstitutiv, während an der lincRNA auf Chromosom 13 eine deutlich IL-1 induzierte Rekrutierung von p65 auftrat (Abb.5.41).

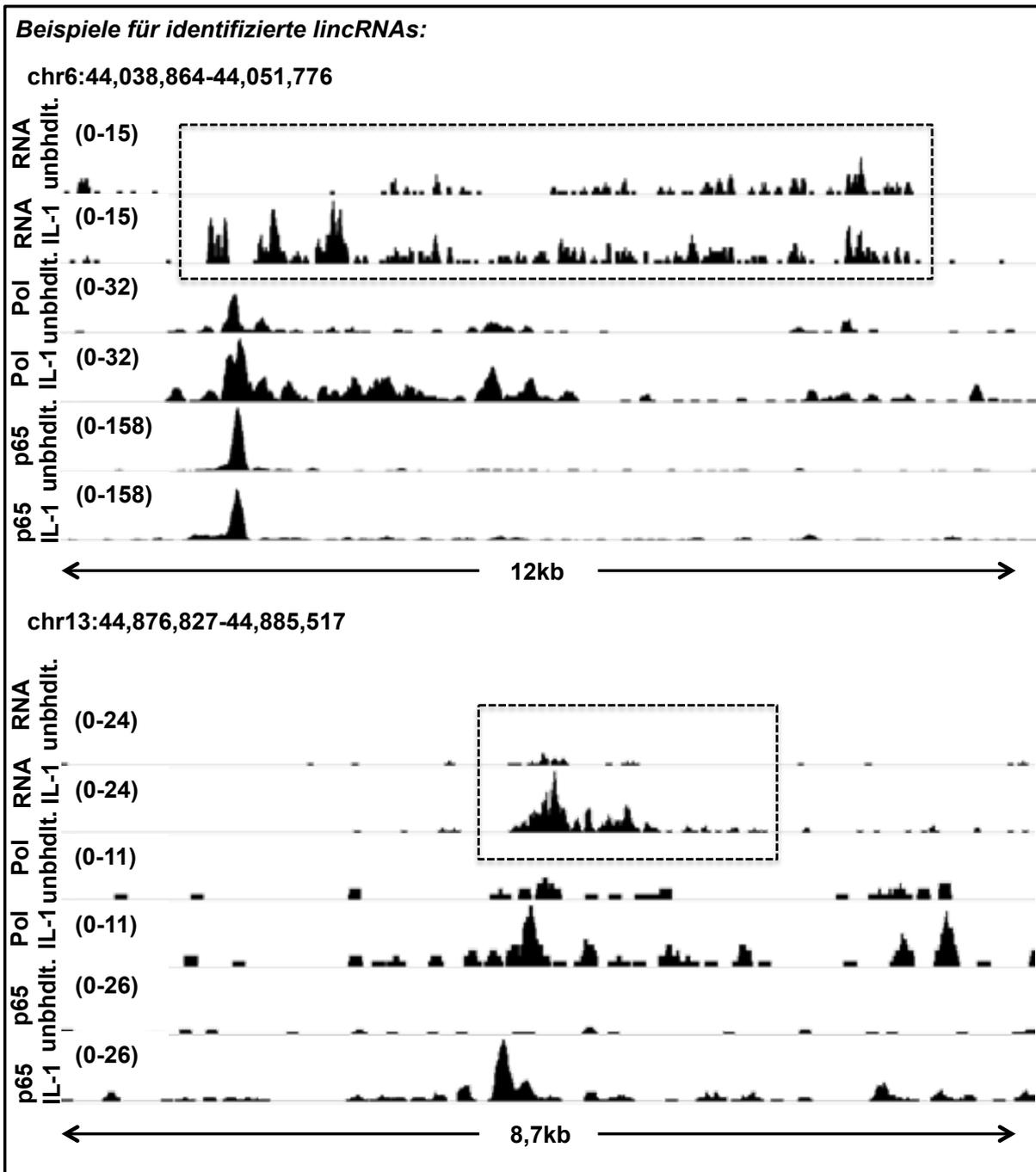


Abb. 5.41: Die Umgebung von IL-1 induzierten lincRNAs in Epithelzellen

Mittels RNA-Seq (Abschnitt 4.4.2) wurden intergenische *de novo*-Transkripte identifiziert und für diese Bereiche die Umgebung mit Hilfe von ChIP-Seq Profilen für Polymerase II und p65 dargestellt. Die Darstellung erfolgte mit dem *IGV Genome Browser*, die Zahlen in den Klammern geben die Skalierung der „read“ Dichten an. Die Daten wurden in unbehandelten und IL-1 behandelten (10 ng/ml, 60 min) KB-Zellen erhoben. Als Beispiele für die Abbildung dienen die lincRNAs auf Chromosom 6 (ChIP-Primer LINC RNA1, Abschnitt 3.12.3) und Chromosom 13 (ChIP-Primer LINC RNA2, Abschnitt 3.12.3). Die Bereiche der lincRNAs sind durch Boxen markiert.

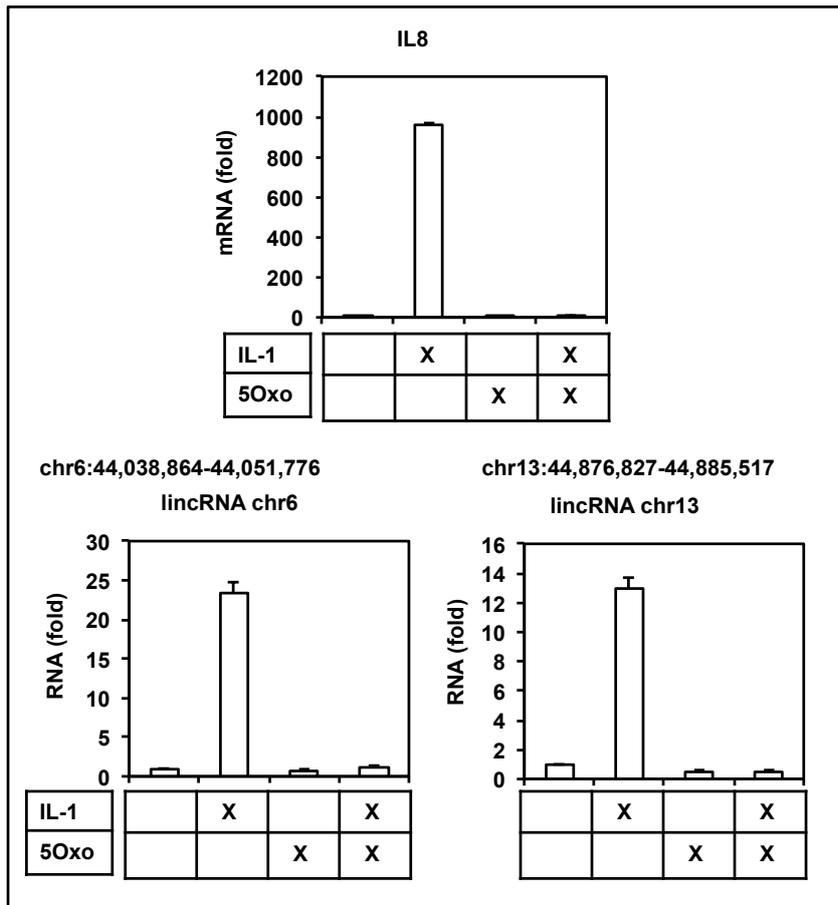


Abb. 5.42: IL-1 und TAK1 regulierte lincRNAs in Epithelzellen

Die Expression der identifizierten IL-1 induzierten lincRNAs wurde mit Real time PCR Primern für die RNAs von Chromosom 6 und 13 untersucht und mit der mRNA von *IL8* verglichen (n=2). Dazu wurden die KB-Zellen neben der IL-1 Gabe (10 ng/ml, 60 min) auch mit dem TAK1-Inhibitor behandelt (5Oxo: 5(Z)-7-Oxozeaenol, 1 μ M, 30 min vor IL-1 Behandlung), ihre RNA isoliert und mittels RT-PCR (Abschnitt 4.2.2) in cDNA umgeschrieben. Der Fehler entspricht der Standardabweichung (Abschnitt 4.10.4).

Die beiden in den RNA-Seq Profilen gezeigten lincRNAs wurden auch über RNA-Analyse mittels Real time PCR näher in ihrer Expression untersucht (Abb.5.42). Dazu wurden entsprechende Primer gegen die lincRNAs generiert und auf isolierte RNA aus KB-Zellen angewendet. Im Vergleich mit der mRNA von *IL8* zeigte sich für beide lincRNAs ein ähnliches Expressionsprofil. Beide waren deutlich IL-1 induziert und konnten durch Einsatz des TAK1-Inhibitors 5(Z)-7-Oxozeaenol in ihrer Induktion fast vollständig gehemmt werden. Zum Ende dieser Arbeit kam zusätzlich ein selektiver BET (Bromodomäne- und extraterminale Domäne-Familie)-Inhibitor zum Einsatz. Dieser „JQ1“ Inhibitor hemmt Brd4 („Bromodomain containing protein 4), das am Chromatin an acetylierte Lysinreste von Histonen binden kann und dort die Rekrutierung des Elongationsfaktors B und zusätzlicher Transkriptionsfaktoren reguliert (4). Wurden KB-Zellen mit diesem Inhibitor behandelt, war die Induktion des IL-1 Zielgens *IL8* nur schwach gehemmt, aber auf basalem Level ohne IL-1 deutlich reduziert (Abb.5.43). Diese basale Reduktion war auch für die lincRNA von Chromosom 13 zu beobachten, die zudem in ihrer IL-1 Induktion gehemmt war. Eine massiv

verringerte IL-1 Induzierbarkeit war auch für die lincRNA von Chromosom 6 zu beobachten, deren Basallevel kaum beeinflusst war. Die IL-1 Induktion der lincRNAs war in diesen Versuchen weniger ausgeprägt, was aber vermutlich auf die auch an *IL8* zu beobachtende niedrigere Induktion zurückzuführen ist. Insgesamt konnte für mehr als die Hälfte der untersuchten lincRNAs eine verringerte IL-1 Induzierbarkeit unter dem Inhibitor „JQ1“ festgestellt werden, wobei diese Experimente zukünftig noch ausgeweitet werden müssten um diese Beobachtung abzusichern.

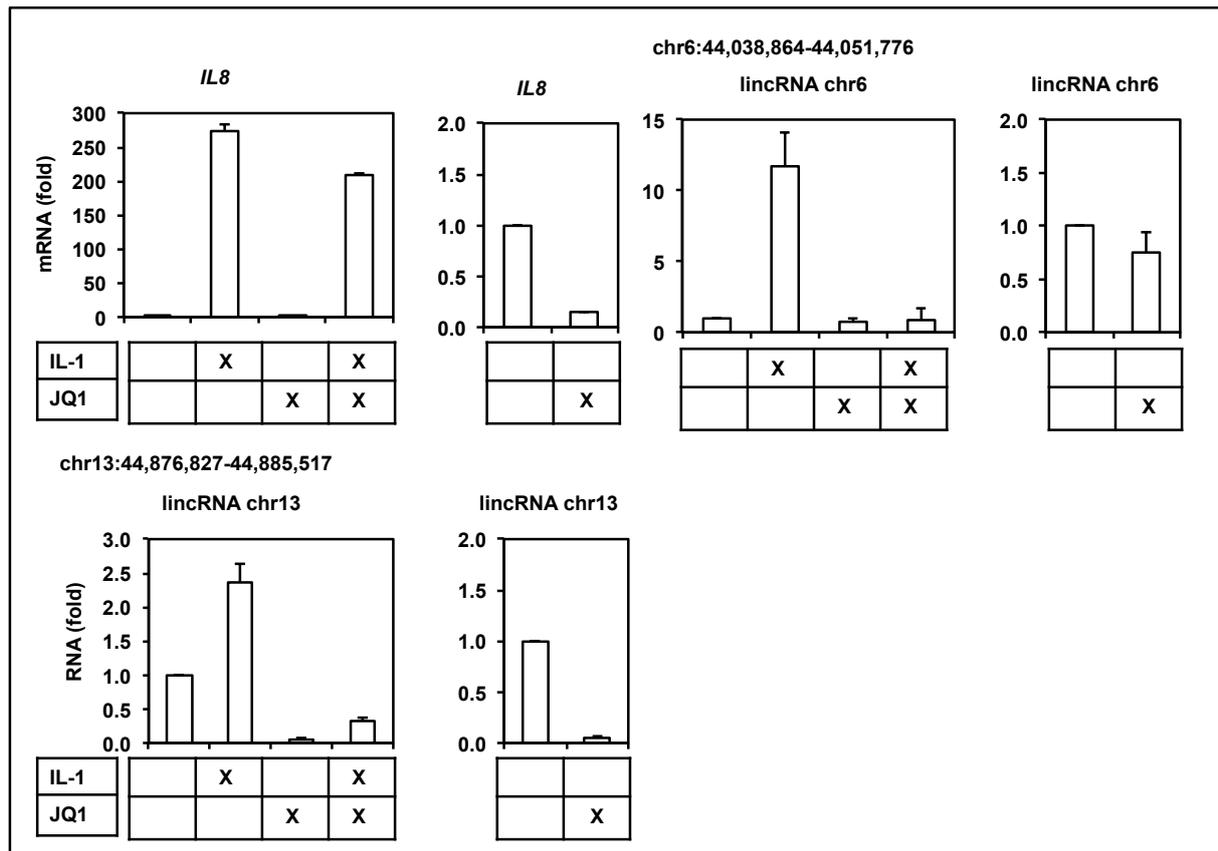


Abb. 5.43: Der Einfluss des Inhibitors „JQ1“ auf IL-1 induzierte lincRNAs

Die RNA aus unbehandelten, mit IL-1 (10 ng/ml, 60 min), mit dem „JQ1“ Inhibitor (2 μ M, 18 h, Mediumwechsel mit frischer Zugabe 2 μ M für 3 h) oder einer Kombination („JQ1“ wie beschrieben, nach 2 h Zugabe von IL-1 für 1 h) beider Stoffe behandelten KB-Zellen wurde isoliert und durch RT-PCR (Abschnitt 4.2.2) und anschließender Real-time PCR analysiert. Der Fehler entspricht der Standardabweichung (Abschnitt 4.10.4).

Der IL-1 Signalweg führt also in KB-Zellen nicht nur zur massiven Regulation proteinkodierender Gene, sondern beeinflusst auch intergenische Transkripte. Diese können wiederum selbst als Regulatoren wirken und sind damit Teil des komplexen nukleären IL-1 Signalwegs, dessen Analyse im Mittelpunkt dieser Arbeit stand (Abb. 5.44).

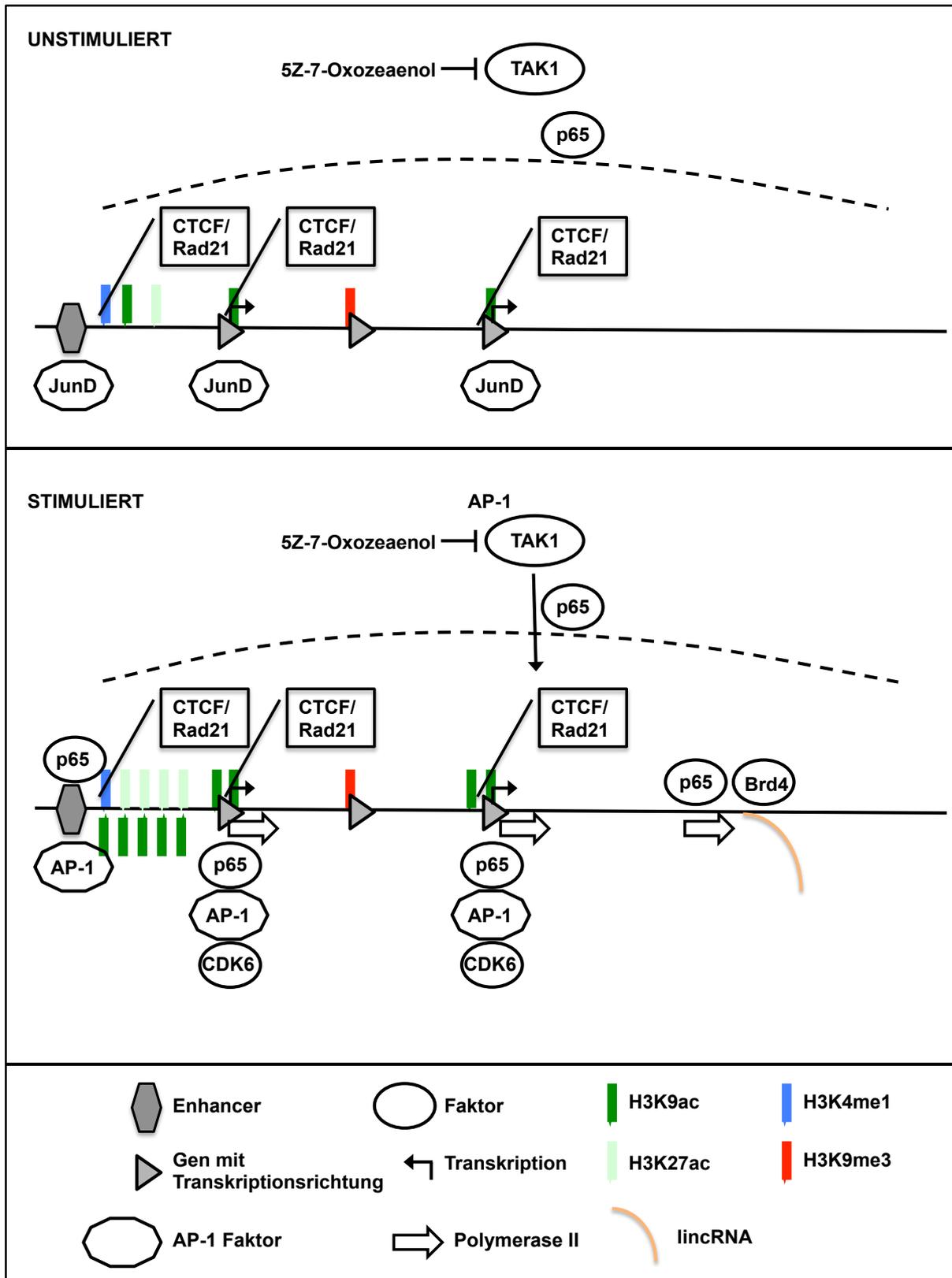


Abb. 5.44: Um lincRNAs komplementiertes Modell zur Veranschaulichung der nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort von Epithelzellen

Nach einer Stimulation von Epithelzellen durch IL-1 kam es nicht nur zur Induktion von IL-1 Zielgenen mit einem entsprechenden Chromatinstatus und vorgebundenen Faktoren und zur Aktivierung von Enhancern, sondern auch zur Induktion von lincRNAs. In diese Genombereiche wurde ebenfalls p65 rekrutiert und durch die hemmende Wirkung eines entsprechenden BET-Inhibitors auf diese lincRNAs kann über die Beteiligung des Proteins Brd4 an den Transkriptionsvorgängen spekuliert werden.

6 Diskussion

6.1 KB-Zellen als Modellsystem zur Untersuchung chromatin-basierter Mechanismen der inflammatorischen Signaltransduktion und Genexpression in humanen

Epithelzellen

Obwohl die proinflammatorischen Wirkungen von IL-1 sehr gut untersucht sind und bereits eine Reihe von systemischen humanen Erkrankungen mit anti-IL-1 Therapien erfolgreich behandelt werden können, sind die molekularen Mechanismen, über die das Cytokin die zelluläre Genantwort schnell, stark, synchronisiert und transient moduliert, nur unvollständig verstanden. Insbesondere fehlt eine systematische Kartierung der IL-1-regulierten Chromatinabschnitte und der dabei beteiligten Chromatinfaktoren und Mechanismen. Da die Regulation von Genen den Haupteffekt der zellulären IL-1 Wirkung darstellt, sollte ein vertieftes Verständnis der nukleären, durch IL-1-regulierten Prozesse langfristig auch Möglichkeiten der selektiven Hemmung IL-1-induzierter Gene ermöglichen.

Zur chromatin-basierten Analyse der nukleären, IL-1 abhängigen Genregulationsvorgänge in Epithelzellen wurde mit den KB Zellen ein Modellsystem gewählt, in welchem die meisten auch (patho)physiologischerweise regulierten IL-1 Zielgene aktiviert werden, was zu Beginn der Arbeit in einem umfangreichen Microarray Experiment noch einmal gezeigt wurde (Abschnitt 5.1.1). Die RNA-Microarray-Analyse machte nicht nur deutlich, dass es in KB-Zellen unter IL-1 zu einer massiven Genregulation kommt, sondern ermöglichte auch die Klassifizierung der betroffenen Gengruppen und Signalwege (Abb.5.1B). Die meisten hochregulierten Gene gehörten zum biologischen Prozess „Positive Regulation der Transkription vom RNA-Polymerase II Promotor“, was auf die stark gesteigerte Transkription vieler Gene zurückzuführen ist. Durch IL-1 wurden zudem viele weitere wichtige Zellprozesse und Signalwege in KB-Zellen beeinflusst. Dieses Ergebnis verdeutlicht noch einmal die in der Literatur bereits bekannte Schlüsselstellung von IL-1 im Immunsystem und die Vielfältigkeit der Zellreaktionen auf dieses Molekül in Epithelzellen (44-46).

Für Analysen am Chromatin sind ChIP und ChIP-Seq Experimente von großer Bedeutung. Dabei ist es wichtig, dass innerhalb der Zellpopulation eine möglichst einheitliche Antwort auf einen Stimulus zustande kommt, denn für diese Techniken wird das Chromatin aus einer großen Anzahl von Zellen gemeinsam analysiert. Verschiedene Zelllinien können sehr unterschiedlich auf IL-1 reagieren (8, 64, 80, 81, 190). Die RNA-Microarray-Experimente in den KB-Zellen zeigten zwar eine starke IL-1 Antwort, aber diese könnte auch durch wenige Zellen der Population zustande gekommen sein. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Experimenten konnte dies ausgeschlossen werden (Abschnitt 5.1.2). Der Transkriptionsfaktor c-Fos zeigte nach IL-1 Behandlung ein verstärktes Kernsignal und

Abnahme von Signalverdichtungen im Kernrandbereich. Damit bestätigte sich auch in KB-Zellen, dass bei c-Fos nach einem Stimulus die Verteilung, internukleäre Mobilität und Assoziation mit der nukleären Matrix beeinflusst werden kann (100). Anhand der beiden Faktoren p65 und c-Fos konnte in der IF die sehr einheitliche IL-1 Antwort innerhalb der Zellpopulation bei KB-Zellen festgestellt werden, was diese für ChIP und ChIP-Seq Experimente prädestiniert.

In KB-Zellen zeigte sich durch die RNA-Analyse außerdem, dass zu den zehn Genen mit der deutlichsten Induktion Chemokingene eines bestimmten CXC-Chemokingen-Clusters auf Chromosom 4 (Abb. 5.3) gehörten. *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3* und *IL8* wiesen nicht nur eine ausgeprägte IL-1 Induzierbarkeit auf, sondern ihre IL-1 Antwort war außerdem deutlich durch den TAK1-Inhibitor 5(Z)-7-Oxozeaenol hemmbar. Damit stellten sich KB-Zellen nicht nur als optimales Zellsystem zur Analyse nukleärer Regulationsvorgänge des IL-1 Signalwegs in Epithelzellen dar, sondern mit dem CXC-Chemokingen-Cluster auf Chromosom 4 wurde außerdem ein ideales Modell zur Untersuchung von Vorgängen am Chromatin bei der Regulation eines gesamten koregulierten Genclusters identifiziert. Mit dem am stärksten IL-1 induzierten Gen *IL8* innerhalb dieses Clusters stand auch ein einzelnes Gen zur genauen, tiefergehenden Analyse verschiedener Faktoren und Modifikationen zur Verfügung. Mittels Western Blot Experimenten wurde nicht nur der Einfluss von IL-1 auf verschiedene Signalweg-Komponenten in KB-Zellen erfasst, sondern auch die Wirkung des TAK1-Inhibitors 5(Z)-7-Oxozeaenol (Abschnitt 5.1.2). Dieser Inhibitor beeinflusste in den RNA-Microarray-Analysen deutlich die IL-1 Induzierbarkeit der meisten Zielgene und auch in den Western Blot Analysen die Aktivierung verschiedener Faktoren im IL-1 „Signaling“. Dies war zu erwarten, denn die Proteinkinase TAK1 koppelt alle drei Signalkaskaden (NF- κ B-, p38-MAPK-, JNK-MAPK-Signalweg) an den IL-1 Rezeptor und kann auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene wirken (71). So blockierte 5(Z)-7-Oxozeaenol auch die die Stimulus-abhängige subzelluläre Umverteilung von NF- κ B, da für diese die Aktivierung des IKK-Komplexes vonnöten ist. Diese Umverteilung wurde durch fraktionierte Lyse untersucht und es zeigte sich, dass bereits in unbehandelten Zellen NF- κ B p65 in der löslichen und zu einem geringen Anteil auch in der nicht löslichen Kernfraktion vorlag. Nach einem IL-1 Stimulus kam es zwar zur Translokation einer größeren Menge von p65 in den Zellkern, aber bereits im basalen Zustand ist ein „Pool“ an p65 im Nukleus vorhanden und wird offenbar regulatorisch daran gehindert an IL-1 Zielgene zu binden. Signale für p65 in der Chromatin-Fraktion unbehandelter KB-Zellen deuten zudem auf eine IL-1 unabhängige Assoziation dieses Faktors an das Chromatin hin. Ob es sich dabei um ein reines „Reservoir“ handelt oder ob p65 neben der Rekrutierung als Transkriptionsfaktor an die Promotoren von IL-1 Zielgenen weitere Funktionen am Chromatin erfüllt, wurde auch im Rahmen dieser Arbeit durch ChIP- und ChIP-Seq Experimente näher analysiert. Zusammenfassend ließ sich

feststellen, dass Western Blot-, Immunfluoreszenz- und RNA-Microarray-Experimente zeigten, dass die KB-Zelllinie ein sehr gut geeignetes Zellsystem darstellte und der TAK1-Inhibitor ein wichtiges Werkzeug um chromatin-basierten Mechanismen in der nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort von Epithelzellen aufzuklären.

6.2 Chromatin-basierte Mechanismen als Determinanten der IL-1abhängigen Signaltransduktion und Genexpression in humanen Epithelzellen

6.2.1 Charakterisierung von IL-1 regulierten Promotoren

Betrachtet man potentielle Bindestellen von NF- κ B p65 anhand ihrer Sequenz, so sind diese zahlreich im menschlichen Genom und auch an den Promotoren der Gene des Modellclusters der CXC-Chemokine auf Chromosom 4 vorhanden (112). Durch eine CHIP mit „Scanning Primern“ über den *IL8* Promotor (Abb. 5.6) und nachfolgende CHIP und CHIP-Seq Experimente am gesamten Gencluster (Abb. 5.7 und 5.12) konnte gezeigt werden, dass in diesem Modellcluster an jedem induzierbaren Promotor eines Zielgens nur eine p65 Bindestelle unter IL-1 tatsächlich genutzt wurde. Diese enthielt das bekannte Bindemotiv „GGAATTTCC“ und befand sich an den Genen *IL8* und *CXCL1* ca. 70 bp vor dem ersten Exon und an den Genen *CXCL2* und *CXCL3* innerhalb der ersten 30 bp des ersten Exons. Das gesamte verwendete Modellcluster gehört zwar zum centromerischen CXC-Chemokingen-Subcluster, lässt sich anhand der Transkriptionsrichtung aber in zwei Hälften aufteilen (18, Abschnitt 2.2.3). Da nebeneinander bzw. in gleichen Bereichen liegende Chemokingene vermutlich durch Genduplikationen evolviert sind, ähneln sie sich in ihrer Struktur (18). *CXCL1* und *IL8*, sowie *CXCL2* und *CXCL3*, liegen jeweils in der gleichen Gengruppe, was die unterschiedliche Lage der p65-Bindestelle in Bezug auf das erste Exon erklären könnte und vermutlich ebenfalls Genverwandtschaften reflektiert.

Bei der Charakterisierung von Promotoren ist auch der Chromatinstatus von großer Bedeutung und so wurden verschiedene typische, momentan zur Klassifizierung akzeptierte Histonmodifikationen an den IL-1 Zielgen Promotoren im Cluster überprüft. Dabei zeigten sich bereits in der Histon-dichte selbst deutliche Unterschiede. Für p65 zugängliche Promotoren des Clusters wiesen eine niedrigere Histon-dichte auf als reprimierte Gene (Abb. 5.7), was auf eine geöffnetere Nukleosomenstruktur hindeutet. Auch die Histonmodifikationen korrelierten mit der Induzierbarkeit der Chemokingene. So war an aktivierbaren Genen eine deutlich höhere H3K9ac feststellbar, während die Zielgene ohne p65-Rekrutierung nach IL-1 durch eine ausgeprägte H3K9me3 gekennzeichnet waren (Abb.5.8). Dies sind beides für die jeweilige Situation typische Histonmodifikationen, die somit mitentscheidend für das Expressionsmuster des Chemokingen-Clusters in der jeweiligen Zelllinie sind. Beide Modifikationen werden zu den eher dynamischen „Marks“ gezählt, während die im Cluster nicht nachweisbare, reprimierende H3K27me3 als deutlich

stabiler gilt (133). Sie reflektiert im „Histon-Code“ häufig heterochromatische Bereiche (133). An den für p65 zugänglichen Promotoren wurden außerdem niedrige Level an H3K4me1 und H3K27ac gemessen, die zwar typische Enhancer-Modifikationen sind, aber auch an Promotoren in schwächerer Ausprägung auftreten (38, 128). Insgesamt stellt das IL-1 Zielgencluster auf Chromosom 4 einen eher geöffneten, euchromatischen Bereich im Genom dar, wobei einzelne Gene durch einen reprimierenden Histonstatus von einer Aktivierung abgeschirmt bleiben. Diese Chromatinstruktur im Cluster erlaubt zum einen die sehr schnelle Aktivierung durch Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren wie p65, zum anderen ein individuelles Expressionsmuster durch Reprimierung einzelner Gene im sonst koregulierten Cluster.

6.2.2 Zelltypspezifische Expressionsmuster durch veränderte DNA-Methylierung

Die Promotoren der IL-1 Zielgene im Modellcluster ermöglichen über ihre „CpG islands“ theoretisch eine weitere epigenetische Regulation (Abschnitt 5.2.3). Durch Bisulfit-Sequenzierung und MS-PCRs wurde der DNA-Methylierungsstatus von „CpG island“ Promotoren im Cluster überprüft. Dabei konnte festgestellt werden, dass IL-1 induzierbare Gene des Clusters unmethyliert sind und dass eines der Chemokingene, *CXCL6*, zwischen verschiedenen Zelllinien in seinem Methylierungsstatus variiert. Dieses Gen ist in KB-Zellen reprimiert und methyliert, während es in A549 Zellen unmethyliert und induzierbar ist (Abb. 5.9). Der DNA-Methyltransferase-Inhibitor Decitabin steigerte in KB-Zellen deutlich die *CXCL6*-Induzierbarkeit, aber auch die von bereits vorher induzierbaren Genen wie *IL8* oder *CXCL1* (Abb. 5.10). Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen zu sein, dass diese Gene innerhalb der Zellpopulation zu einem gewissen Anteil im methylierten Zustand vorliegen, worauf zum Beispiel auch die leichten methylierten Signale der MS-PCR für *CXCL1* in KB-Zellen hindeuten (Abb. 5.9). Zum anderen könnte aber auch die Expression wichtiger Faktoren des IL-1 Signalwegs durch Decitabin beeinflusst werden und dieses so indirekt wirken. Für p65 selbst konnte hier aber nur ein leichter Effekt festgestellt werden, während die Expression des Inhibitors im Signalweg NFκBIA sogar etwas stärker gesteigert war. Durch weitere Bisulfit-Sequenzierungen unter Decitabin-Behandlung und an verschiedenen IL-1 Zielgenen würde man genauere Aussagen zu der Bedeutung der DNA-Methylierung an den „CpG islands“ von IL-1 Zielgen-Promotoren machen können. So aber beschränkt sich das Ergebnis zunächst auf die unterschiedliche DNA-Methylierung von *CXCL6* in zwei verschiedenen Tumor-Zelllinien.

In vielerlei Hinsicht spielen Chemokine eine wichtige Rolle beim Tumor-Wachstum. Die Expression von Chemokinen kann durch autokrine und parakrine Mechanismen das Tumor-Wachstum aufrecht erhalten, Angiogenese fördern und den Tumor selbst vor dem Immunsystem schützen (141). Bei vielen Tumoren tritt eine begleitete oder ursächliche Entzündung auf. So kommt es zum Beispiel bei „Morbus Crohn“ oder chronischer

Pankreatitis häufig zur Tumor-Bildung (7, 36, 37). Inflammatorische Infiltrate beinhalten zwar „natural killer cells“, T-Lymphozyten und Makrophagen, die initiale Tumorzellen vernichten können, sie fördern aber auch die Vermehrung von Tumorzellen (89). Es entsteht nach und nach eine tumorfördernde Mikro-Umgebung, an der auch ein Zusammenspiel verschiedener Chemokine und Cytokine sowie einwandernde stromale Zellen (carcinoma-assoziierte Fibroblasten, proinflammatorische Leukocaten und vaskuläre Zellen) beteiligt sind (22, , 83, 124, 125). Diese Entwicklung kommt, wie bei der Entstehung aller Tumore, letztlich durch zufällig erfolgende Mutationen zustande, die sich durch den jeweils vorliegenden Selektionsdruck manifestieren. Dadurch kann jeder Tumor auch ein unterschiedliches Set an exprimierten oder reprimierten Chemokingenen aufweisen, wie es in dieser Arbeit für *CXCL6* in den Tumorzelllinien A549 und KB der Fall war. Das Chemokin *CXCL6* ist ein Chemo-Attraktant für neutrophile Granulocyten (137), die an die Zelloberfläche von Tumorzellen binden und T-Zellen aktivieren können (50). Die Repression von *CXCL6* in KB-Zellen könnte also für diesen Tumor von Vorteil sein, wobei aber zum Beispiel aggressive, schnell metastasierende „Small cell lung cancer“ Zellen erhöhte *CXCL6* Level aufweisen und das Chemokin hier unter hypoxischen Bedingungen die Tumor Progression fördert (50). Auch bei den A549-Zellen handelt es sich um eine Tumor-Zelllinie aus Lungengewebe, was die nicht vorhandene DNA-Methylierung an *CXCL6* erklären könnte.

6.2.3 CTCF und Kohesin an IL-1 Zielgenen

Im „upstream“ Bereich der beiden entgegen gesetzt transkribierten Startgene im Modellcluster wurden in dieser Arbeit zusätzliche IL-1 regulierte p65-Bindestellen identifiziert (Abschnitt 5.3 und 6.4). Aufgrund dieser möglichen Enhancer-Regionen wäre eine komplexe dreidimensionale Struktur des Genclusters denkbar. Diese Überlegung und die spezifisch methylierten „CpG island“ Promotoren im Cluster machten eine Analyse des Clusters auf die Bindung von CTCF und Kohesin interessant. CTCF gilt als Insulator-Protein, kann mit Kohesin bei der Ausbildung von Chromatin-Loops interagieren und beeinflusst die Gentranskription (12, 13, 174). In erster Linie wird CTCF dabei eine Funktion als Repressor zugeschrieben, der an „Enhancer blocking“ Vorgängen beteiligt ist (12, 13). Eine CTCF ChIP-Seq ermöglichte die Auswertung aller CTCF-Bindestellen innerhalb des Modellclusters und es wurde IL-1 unabhängige CTCF Bindung an den Promotoren aller induzierbaren Zielgene des Clusters nachgewiesen (Abb. 5.32). Dies war überraschend, da CTCF oft mit transkriptioneller Repression in Verbindung gebracht wird und nicht mit der Markierung zugänglicher Genpromotoren. Durch die Analyse der CTCF-Bindung an *CXCL5*, das in A549 Zellen im Gegensatz zu KB-Zellen durch IL-1 aktivierbar ist, konnte gezeigt werden, dass die CTCF-Bindung tatsächlich mit der Aktivierbarkeit der Gene in Zusammenhang zu stehen scheint (Abb. 5.34). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass CTCF vor allem an nicht-methylierte DNA-Bereiche bindet (110). Somit kommt der zuvor untersuchten DNA-

Methylierung im Modellcluster weitere Bedeutung für die Induzierbarkeit der Zielgene zu. Ein induzierbarer IL-1 Zielgenpromotor im Cluster ist also nicht nur durch ein unmethyliertes „CpG island“, sondern auch durch die Bindung von CTCF gekennzeichnet. Es sind auch in der Literatur bereits Fälle bekannt, in denen CTCF nicht nur als typischer Insulator fungiert, sondern auch an Genpromotoren binden (72, 86) und als Transkriptionsaktivator wirken kann (54, 87). Dies ist allerdings in Zusammenhang mit dem IL-1 Signalweg bisher nur für das Gen *IRAK2* („interleukin 1 receptor-associated kinase 2“) beschrieben worden, wobei hier kein IL-1 Stimulus zum Einsatz kam und der Einfluss der CTCF Bindestelle im *IRAK2* Promotor allein durch Luciferase-Konstrukte analysiert wurde (91).

Ein Kohesin-ChIP gegen die Untereinheit Rad21 sollte Hinweise darauf geben, ob CTCF in diesem Zusammenhang als Organisator dreidimensionaler Strukturen fungierte oder ob die positive Wirkung auf die IL-1 Induzierbarkeit unabhängig von dieser Funktion auftrat. Die stärksten Rad21-Signale waren dabei an den CTCF „sites“ in den Enhancer Bereichen messbar, aber eine Detektion war auch an den Promotorbindestellen möglich (Abb. 5.33). Das Rad21-Signal war wie das von CTCF nicht stark IL-1 reguliert, meist waren leichte Zunahmen nach IL-1 detektierbar. Dass überhaupt eine Kohesin-Untereinheit in einer ChIP an CTCF-Bindestellen messbar war, macht die Beteiligung dreidimensionaler Strukturen an der Regulation des CXC-Chemokingen-Cluster wahrscheinlich. Die vorliegende Struktur könnte dabei aufgrund der vielen CTCF und Rad21 Bindestellen äußerst komplex sein und dient vermutlich der Kontaktaufnahme von Enhancern und Promotoren, wobei die Ausbildung von „transcription factories“ zur massiven und schnellen koregulierten Genaktivierung denkbar wäre. Solche „transcription factories“ sind Einheiten aktiver Gentranskription, die in einem engen Bereich im Nukleus zusammengefasst werden (126). Die genaue Rolle von CTCF und Kohesin innerhalb des Modellclusters könnte zukünftig durch „knockout“ und verschiedene „Chromosome Conformation Capture“-Analysen (3C, 4C, 5C, 6C) abschließend aufgeschlüsselt werden. Es könnten zudem auch Techniken wie die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (10) oder „Live Cell imaging“ angewandt werden, um zum Beispiel über markiertes CDK9 die Ausbildung von Strukturen wie „transcription factories“ sichtbar zu machen (58).

6.2.4 Der Faktor JunD kann bereits basal an Zielgen-Promotoren detektiert werden

Im Verlauf dieser Arbeit wurden neben p65 und CTCF viele weitere Faktoren auf eine Beteiligung an der nukleären IL-1 abhängigen Genregulation hin untersucht. Dazu gehörte auch das AP-1-Protein JunD, welches zum Beispiel mit dem Protein c-Fos Dimere ausbilden kann. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Transkriptions- und Kofaktoren konnte JunD in KB-Zellen bereits basal an den Promotoren der IL-1 Zielgene im Modellcluster detektiert werden (Abb. 5.17). Möglicherweise dient es so als Plattform für das unter IL-1 Behandlung rekrutierte c-Fos und erst der Dimer ist an der Transkriptionsaktivierung

beteiligt. JunD ähnelt in der Transaktivierung AP-1 responsiver Promotoren in Interaktion mit c-Fos anderen Jun-Proteinen, unterscheidet sich von diesen aber hinsichtlich seiner eigenen Expression (66). So ist die mRNA von AP-1 Proteinen in arretierten Zellen normalerweise nicht nachweisbar und durch Serum-Stimulation schnell induzierbar, während JunD konstitutiv in arretierten Zellen exprimiert wird und sich dies durch Serum-Stimulation nicht verändert (134). Die gleiche Beobachtung konnte auch in den in dieser Arbeit aufgeführten Microarrays in mit IL-1 stimulierten KB-Zellen gemacht werden (Abschnitt 5.1.1). In KB-Zellen wird JunD konstitutiv exprimiert und bindet auch basal bereits an Promotoren und Enhancer von IL-Zielgenen.

Somit zeichnen sich die Promotorbereiche von IL-1 induzierbaren Zielgenen bereits vor einer IL-1 Behandlung basal durch verschiedene Eigenschaften aus. Ein hoher Grad an H3K9ac und schwächere H3K27ac sowie H3K4me1 an aktivierbaren Genen stehen einer ausgeprägten H3K9me3 an reprimierten „sites“ gegenüber. Nur Gene mit unmethyliertem „CpG island“ und CTCF-Bindung im Cluster weisen nach einer IL-1 Behandlung die Rekrutierung von p65 an eine spezifische Bindestelle im Bereich des Transkriptionsstarts und Rekrutierung der Polymerase II auf. Somit prädestinieren viele Eigenschaften des Promotors bereits die IL-1 Induzierbarkeit eines Gens und die ebenfalls dazu zählende Verbindung von JunD rundet das charakteristische Bild eines aktivierbaren IL-1 Zielgen-Promotors ab.

6.3 IL-1 abhängige Veränderungen an koregulierten Genclustern

Wie bereits beschrieben, erfolgte im Modellcluster nach einer IL-1 Behandlung die Rekrutierung von p65 an eine Bindestelle im Bereich des Transkriptionsstarts des Zielgens. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aber auch die IL-1 abhängige Rekrutierung weiterer Transkriptions- und Kofaktoren untersucht. Der AP-1-Faktor c-Fos zeigte deutliche Signale nach IL-1 Gabe am Promotor von *IL8*, schwächere Signale waren außerdem für ATF2, FRA1, c-Jun, JunB und die Acetyltransferase CBP messbar (Abb.5.17). Dabei wiesen die Bindungsereignisse von c-Jun und CBP eine IL-1 Abhängigkeit auf, was die Spezifität der Signale wahrscheinlich macht. Durch auf diese Bindungsstellen abgestimmte Primer, CHIP-Seq Experimente oder „knockdown“ Versuche könnte die Bedeutung der Faktoren mit schwächeren CHIP Signalen genauer eingegrenzt werden.

Mit der Etablierung einer CHIP gegen die Cyclin-abhängige Kinase 6 (CDK6) wurde ein Faktor analysiert, der erst in dieser Arbeitsgruppe mit Chromatin-Rekrutierung und dem IL-1 Signalweg in Zusammenhang gebracht wurde (24, 64). Ein entsprechender CDK6 Antikörper erbrachte IL-1 abhängige Signale am Promotor von *IL8* und mittels ReChIP konnte gezeigt werden, dass p65 und CDK6 gleichzeitig an das selbe Allel in KB-Zellen rekrutiert werden (Abb. 5.20). Zeitgleich konnte CDK6 unter Verwendung des selben Antikörpers durch eine andere Gruppe als Teil eines Transkriptionskomplexes an den Promotoren der Gene

VEGFA und *INK4A* in einer ChIP nachgewiesen werden, wobei eine konstitutive Assoziation mit STAT3 und c-Jun stattfand (88). CDK6 selbst besitzt keine DNA-Bindedomäne und auch kein nukleäres Lokalisationssignal (NLS). Daher ist davon auszugehen, dass CDK6 möglicherweise über einen „Huckepack“-Mechanismus mit einem anderen Protein zusammen in den Kern transloziert und an der DNA mit DNA-bindenden Proteinen interagiert. Dafür kämen AP-1 Proteine wie das auch in dieser Arbeit an Zielgen-Promotoren rekrutierte c-Jun in Frage, aber auch der Transkriptionsfaktor FOXM1, der ein Substrat von CDK6/Cyclin D3-Komplexen ist (2), sowie das Protein Pax4, dessen DNA-Bindemotiv mit einem Teil der gefundenen CDK6 Peaks in KB-Zellen überlappte (64). Außerdem wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die transkriptionsaktivierende Wirkung von CDK6 von der Phosphorylierung des nukleären „scaffold“ Protein TRIP6, das mit p65 (41) und CDK6 interagieren kann (64), abhängt. Vermutlich ist CDK6 an den IL-1 Zielgenpromotoren Teil eines komplexen Netzwerks verschiedener Proteine, die gemeinsam an der Regulation der Transkription beteiligt sind.

ChIP-Seq Experimente ermöglichten den Nachweis von CDK6 an allen Promotoren des Modellclusters nach IL-1 und die globale Auswertung offenbarte die genomweite Korrelation der Bindestellen von CDK6 mit p65 und Polymerase II an Bereichen mit hoher H3K9ac (Abb. 5.21, 5.22 und 5.23). An den Genpromotoren von IL-1 induzierten Genen im Genom zeigte sich deutlich die gemeinsame Rekrutierung von p65 und CDK6 im Bereich des Transkriptionsstarts, aber auch in unbehandelten KB-Zellen überlappen die Bindungsprofile beider Faktoren (Abb.5.23). Daraus lässt sich schließen, dass auch basal in Epithelzellen p65-Bindestellen an aktiven Chromatinbereichen (H3K9ac, Pol II) existieren und das auch hier CDK6 Teil des Aktivierungskomplexes ist. Die basale p65-Aktivität müsste zukünftig weitergehend analysiert werden um mehr darüber zu erfahren.

Hier stand die nukleäre IL-1 abhängige Genregulation in Epithelzellen im Fokus und so wurde in ChIP Experimenten auch die Rekrutierung der Polymerase II an Zielgene verfolgt. Diese wird während der Ausbildung des Präinitiationskomplexes an Serin 5 phosphoryliert und im Endbereich der Transkription schließlich gesteigert an Serin 2 (Abb. 5.26). Die Verwendung einer HeLa-Zelllinie mit CDK6 „knockdown“ zeigte auf, dass dieses Protein für die Rekrutierung der Polymerase II von entscheidender Bedeutung ist (Abb. 5.24 und 5.26). Es wurde bereits in der Literatur gezeigt, dass zum Beispiel CDK9 Teil des Elongationskomplexes ist, der durch p65 und entsprechende Stimuli reguliert wird (11). Während also andere Cyclin-abhängige Kinasen wie CDK7 und 9 bekanntermaßen die Phosphorylierung der Polymerase II beeinflussen können (95), war unter einem CDK6 „knockdown“ nur die Phosphorylierung an Serin 5 leicht erhöht. Diese etwas verstärkten Signale könnten durch ein stärkeres Pausieren der Polymerase zustande gekommen sein, wodurch pro Zeiteinheit die Phosphorylierung an Serin 5 durch CTD-Kinasen wie CDK7

effizienter erfolgen kann (64, 95). Möglicherweise ist CDK6 also auch am Voranschreiten dieses Enzyms beteiligt, wobei es in erster Linie für die Rekrutierung selbst von großer Bedeutung ist.

Nach einem IL-1 Stimulus kam es in den KB-Zellen also zur Translokation von p65 und zur sehr schnellen Rekrutierung dieses Transkriptionsfaktors an die geöffneten Chromatinstrukturen der Zielgenpromotoren. Eine ChIP-Kinetik an *IL8* zeigte eine erste Erhöhung der p65-Signale bereits nach 10min, dicht gefolgt von der Rekrutierung der Polymerase II nach etwa 20min (Abb. 5.18). Frühere Signale waren nur beim bereits basal vorgebundenen JunD feststellbar. Auch CDK6 gehörte zu den schnellen Faktoren und zeigte bereits nach 20min IL-1 Behandlung das stärkste ChIP Signal (Abb. 5.25). Nachdem also die Bindung von p65, Pol II und CDK6 an den Promotor erfolgt war, wurde das AP-1-Protein c-Fos rekrutiert und bildete vermutlich mit dem bereits vorhandenen JunD einen Komplex aus. Der Aufbau des Aktivierungskomplexes ging außerdem, wie bereits beschrieben, mit einer Abnahme der Nukleosomendichte einher. Die Genpromotoren des Modellclusters wiesen in niedrigerem Grad die Histonmodifikationen H3K4me1 und H3K27ac auf und waren stark H3K9 acetyliert. Während die H3K4me1 und H3K9ac unter IL-1 hier relativ stabil blieben, stieg die H3K27ac deutlich an (Abb.5.29). IL-1 abhängige Veränderungen des Histonstatus spielten in den Bereichen „upstream“ der beiden Startgene eine noch größere Rolle, worauf im folgenden Kapitel näher eingegangen wird.

Alle beschriebenen IL-1 regulierten Veränderungen am koregulierten Gencluster auf Chromosom 4, ob Rekrutierung von Transkriptions- oder Kofaktoren des Aktivierungskomplexes oder Veränderungen der Chromatinstruktur, waren von der Kinase TAK1 abhängig (Abb.5.14). Der TAK1-Inhibitor 5(Z)-7-Oxozeaenol hemmte nicht nur die Bindung von p65 und der Polymerase II, sondern auch die Rekrutierung von CDK6, c-Fos, c-Jun oder CBP (Abb. 5.17, 5.20 und 5.21). Auch der Anstieg der H3K27ac war inhibiert, entweder durch die Hemmung der Acetyltransferase CBP oder auf einem anderem Weg (Abb. 5.29). Die Kinase TAK1 und die von ihr aktivierten Signalwege sind also essentiell für die Aktivierung der IL-1 Zielgene auf mehreren Ebenen. Dabei muss beachtet werden, dass die Inhibierung von TAK1 nicht nur den NF- κ B Weg, sondern auch IL-1 regulierte MAPK-Signalwege beeinflusst (104). Durch den Einsatz weiterer, spezifischer Inhibitoren und „knockdown“ Experimente an einzelnen Signalweg-Komponenten könnte das nukleäre Regulationsnetzwerk weiter aufgeschlüsselt werden. Diese tiefere Analyse wurde in „Jurida et al., 2015“ (81) mit einem Inhibitor gegen IKK2 (PHA-408) und „knockdown“ von JunD und cFos bereits begonnen. Der „knockdown“ von JunD und cFos führte zwar zu verringerter Rekrutierung dieser Faktoren an die Promotoren und Enhancer der IL-1 Zielgene, die Induktion der Transkription war aber nur wenig beeinflusst, genauso wie die Bindung von p65, was auf p65 als „master regulator“ hindeutet (Abb. 7, C und Abb. S7, C,

81). Der IKK2 Inhibitor PHA-408 (104) hemmte die IL-1 induzierte Phosphorylierung von I κ B α und p65, die p65 Translokation und die Induktion von *IL8* sowie *CXCL2* (Abb. 4, C, 81) und führte zu den gleichen Beobachtungen am Chromatin wie der TAK1-Inhibitor.

6.4 Identifikation IL-1 induzierter regulatorischer Elemente im Genom von Epithelzellen

Die im Rahmen dieser Arbeit mittels CHIP-Seq erstellten p65 Bindungsprofile ermöglichten die Entdeckung von zwei Enhancer-Regionen jeweils „upstream“ der beiden Startgene des CXC-Chemokinen-Clusters (Abb. 5.28). Hier befanden sich zusätzliche IL-1 abhängige p65 Peaks und für Enhancer typische Histonmodifikationen. Die hier detektierte H3K4me1 und H3K27ac markiert Enhancer, während ein Anstieg der H3K27ac neben der Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren auf eine Aktivierung des Enhancers hinweist (38, 128). Die Messung beider Modifikationen und die Normalisierung gegen die Histonmenge zeigte, dass die H3K27ac im Gegensatz zur konstitutiven H3K4me1 durch IL-1 Behandlung induziert wurde (Abb. 5.29). Die so identifizierten Enhancer wurden auch in ihrer Faktor-Zusammensetzung analysiert und wiesen die gleichen Proteine auf wie die IL-1 Zielgenpromotoren mit Ausnahme der hier fehlenden Polymerase II und CDK6. Dies weist möglicherweise erneut auf einen engen Zusammenhang zwischen CDK6 und der Polymerase-Rekrutierung hin. Die in dieser Arbeit charakterisierten IL-1 induzierten Enhancer des Modellclusters ermöglichten die Klassifizierung einer Gruppe von IL-1 abhängigen regulatorischen Elementen, deren Vorkommen innerhalb des gesamten Genoms anschließend überprüft wurde (81). Dabei wurden die Charakteristika der Cluster-Enhancer zugrunde gelegt. Im gesamten Genom der Epithelzellen konnten mehr als 46 000 p65 Bindestellen detektiert werden, von denen die meisten in intergenischen Bereichen lagen (Abb. 2, C, 81). In „deep sequencing“ Studien anderer Zelltypen wurden maximal bis zu etwa 21 000 p65 „sites“ beschrieben (78, 79, 84, 180, 181). Betrachtet man allerdings die Gesamtzahl aller Bindemotive für p65 im Genom von etwa 300 000, wird deutlich, dass nur etwa ein Fünftel davon tatsächlich gleichzeitig genutzt wird und dass das Potential großer Variabilität zwischen verschiedenen Zelltypen und Bedingungen besteht (78). Diese identifizierten p65 Bindestellen dienten als Ausgangspunkt zur Definition der IL-1 abhängigen Enhancer im Genom, wobei zur Klassifizierung die beiden Enhancer Histonmodifikationen herangezogen wurden. Regulierte Enhancer der Klasse I besaßen eine IL-1 regulierte p65-Bindung und H3K4me1 sowie eine konstitutive H3K27ac (Abb. 6.1, entspricht Abb. 3, A, 81). Dieser Klasse gehörten 46 Enhancer-Elemente im Genom an. Regulierte Enhancer der Klasse II, zu denen auch die Enhancer des Modellclusters gehörten und die deutlich zahlreicher vertreten waren, wurden durch eine IL-1 regulierte p65 Bindung und H3K27ac definiert und enthielten eine konstitutive H3K4me1, was zur Identifikation von 410 Enhancer dieser Klasse im Genom führte (Abb. 6.1, entspricht Abb. 3, A, 81). Sowohl RNA-Microarray als auch RNA-Seq Analysen ergaben, dass die benachbarten Gene dieser Enhancer zum Großteil

ebenfalls IL-1 reguliert waren (Abb. 3, D, 81). Am CXC-Chemokinen-Cluster zeigten die Enhancer ein „Spreading“ ihrer Histonmodifikationen H3K27ac und H3K9ac in Richtung der Zielgene. Eine solche Beobachtung bestätigte sich auch an den genomweit identifizierten Enhancern der gleichen Klasse (Abb. 3, G, 81). Die Enhancer-Regionen weiteten sich nach IL-1 Behandlung aus, entweder durch Erweiterung der Modifikationen auf zusätzliche Histone oder durch die Öffnung und damit Verbreiterung der gesamten Nukleosomenstruktur. Die am Modellcluster entdeckten Enhancer sind also kein Einzelphänomen, sondern stellen eine genomweit vorhandene, IL-1 regulierte Enhancer-Klasse mit genereller Bedeutung für die nukleäre Genregulation dar. Kürzlich konnten in der Literatur auch mögliche Enhancer in der Entzündungsvermittlung mit regulierter H3K27ac unter einer TNF-Stimulation in Fibroblasten beobachtet werden (79). Dabei kam es im CC-Chemokinen-Cluster auf Chromosom 17 unter TNF zur Aktivierung von Enhancern, wobei die dreidimensionale Struktur des Clusters, die aktive Gene in räumliche Nähe brachte und auch der Faktor CTCF, stabil waren. Dies stimmt mit den Beobachtungen bezüglich CTCF im CXC-Chemokinen-Cluster überein.

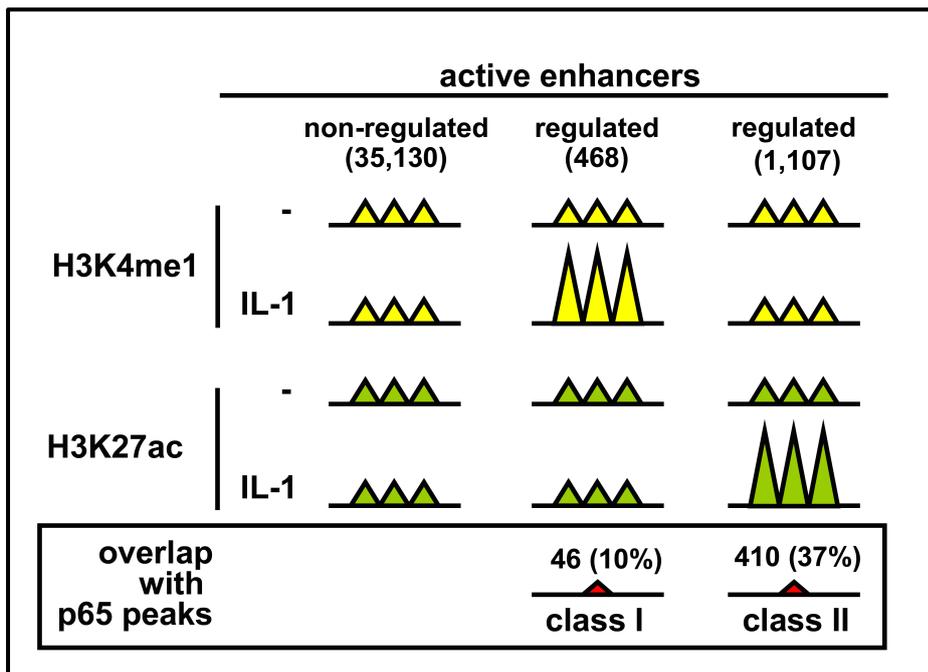


Abb. 6.1: Klassifizierung der genomweit identifizierten Enhancer in KB-Zellen

Schematische Darstellung der Klassifizierung aller aktiven Enhancer in KB-Zellen anhand von H3K4me1 (gelbe Dreiecke), H3K27ac (grüne Dreiecke) und p65-Bindung (rote Dreiecke). Dabei wird zwischen unbehandelten und IL-1 behandelten (10ng/ml, 60min) KB-Zellen unterschieden. Der Auswertung zugrunde liegen ChIP-Seq Daten für alle drei Eigenschaften. Abbildung aus 81, CC BY-NC-ND Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

Durch den Einsatz des Inhibitors 5(Z)-7-Oxozeaenol wurde auch der Einfluss der Kinase TAK1 auf die neu identifizierten Enhancer genomweit ermittelt. Dabei konnte gezeigt werden,

dass unter dem Einfluss des Inhibitors die Aktivierung der Enhancer durch den Anstieg der H3K27ac, wie auch am Modellcluster beobachtet, nicht mehr zustande kam (Abb. 4, 81). Damit ist TAK1 nicht nur für die direkte Genaktivierung an den Promotoren von Bedeutung, sondern spielt auch bei der Formierung der IL-1 abhängigen Enhancer-Regionen eine Rolle. Die Bedeutung von TAK1 für die H3K27ac bei der nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort ist dabei ein vollkommen neuer Befund, der Hinweise für die molekulare Koppelung von zytosolischen Effektoren und Chromatinprozesse liefert.

Die genaue Funktionsweise, mit der die Enhancer die Transkription ihrer Zielgene beeinflussen, konnte mit dieser Arbeit noch nicht vollständig aufgeklärt werden. An manchen Enhancern kommt es zur Transkription regulatorischer RNAs, die wiederum die Transkription ihrer Zielgene steigern (97, 156). RNA-Seq Analysen in KB-Zellen zeigten keine solchen RNAs an den so klassifizierten IL-1 abhängigen Enhancern, aber ermöglichten die Entdeckung anderer IL-1 und TAK1 abhängiger lincRNAs (Abb. 5.41 und 5.42). Diese wurden zum Großteil in ihrer IL-1 Induktion und, im Gegensatz zum Zielgen *IL8*, durch den Einsatz eines BET-Inhibitors (JQ1) gehemmt (Abb. 5.43). Dies deutet auf eine Beteiligung des Proteins Brd4 bei der Transkription dieser lincRNAs hin, möglicherweise beim Aufbau des Elongationskomplexes. Mit Hilfe dieses Inhibitors und des TAK1-Inhibitors könnten diese neu identifizierten, IL-1 abhängigen, regulatorischen Elemente im Genom von Epithelzellen weiter untersucht werden. Durch ChIP-Analysen könnte der hier vorliegende Proteinkomplex am Chromatin analysiert werden, zu dem meist auch p65 gehörte, wie die dazu bereits vorliegenden ChIP-Seq Daten zeigen. Durch RNAi-Experimente könnte die Bedeutung und Funktion dieser lincRNA-Klasse zukünftig untersucht und von den übrigen Enhancern abgegrenzt werden.

Innerhalb dieser Arbeit wurden allerdings auch bereits viele Hinweise gesammelt, die auf die Ausbildung komplexer dreidimensionaler Strukturen aus Enhancern und Zielgenen hindeuten. Dazu gehören unter anderem die durch ChIP ermittelte ähnliche Faktor-Zusammensetzung an Promotoren und Enhancern (Abb. 5.30) sowie die Detektion von CTCF und Kohesin innerhalb des Modellclusters (Abb. 5.40). Ein weiterer Hinweis besteht in der Detektion schwacher Polymerase II-Signale am Enhancer, die eine gleiche IL-1 Kinetik wie am Zielgen aufwies (Abb. 5.36). Solche Signale könnten durch einen indirekten ChIP detektierbar werden, wenn zum Zeitpunkt des Crosslinkings Promotor und Enhancer in enger räumlicher Nähe zueinander waren. Es könnte also zur Ausbildung von Chromatin „Loops“ für den Promotor-Kontakt kommen oder sogar zu komplexen dreidimensionalen Strukturen mit Kontakt zu anderen Chromosomen wie „enhancer archipelagos“ (106, 159). Letztlich liefert diese Arbeit genügend Anhaltspunkte um als Grundlage für die Studie solcher Strukturen zukünftig zu dienen und diese über 3C oder 4C Techniken genauer aufzuschlüsseln. Zusätzlich wäre es von großem Interesse, die Auswirkungen von

Sequenzveränderungen in den Enhancer-Regionen auf die IL-1 induzierte Genantwort zu analysieren, zum Beispiel mittels der neueren Methode des auf „CRISPR“ basierenden „genome editing“ (193). Auch ein Vergleich bezüglich Aufbau, Komponenten und Regulation mit den identifizierten TNF α -regulierten Enhancern wäre natürlich interessant (74).

Im Verlauf dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass nicht nur der cytosolische Teil des IL-1 Signalwegs von großer Komplexität ist. Die Mechanismen der nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort von Epithelzellen sind vielfältig und beschränken sich nicht nur auf die Zusammensetzung des Aktivator-Komplexes an den Promotoren der Zielgene, sondern beinhalten Prädetermination und Induktion durch spezifische Histonmodifikationen, nukleosomale Struktur, DNA-Methylierung, epigenetische Kofaktoren sowie regulatorische Elemente im Genom (zusammengefasst in Abb. 6.2). Die Entzündungsantwort von Epithelzellen ist im Rahmen verschiedenster entzündlicher Erkrankungen von großer Bedeutung und der IL-1 Signalweg spielt selbst bei onkogenen Ereignissen häufig eine Rolle (169). Die Komplexität der nukleären Genregulation bietet hier also nicht nur Herausforderungen in der weiteren Analyse der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, sondern kann auch Ansatzpunkte für neue therapeutische Strategien liefern und so genetische und epigenetische Faktoren als Ziele einer möglichen Behandlung in den Fokus stellen. Beispiele für solche „epigenetischen Inhibitoren“ kommen zum Beispiel mit Inhibitoren gegen DNA Methylierung und Histondeacetylasen bereits bei der Krebstherapie zum Einsatz (69). Die Inhibierung von BET Bromodomänen, wie in dieser Arbeit mit dem „JQ1“-Inhibitor erreicht, war erfolgreich bei der Hemmung von Enhancer-vermittelter Transkription und atherogener Endothelantwort bei Entzündungen sowie der Behandlung von Atherosklerose (23). In dieser neueren Studie wurde auch gezeigt, dass eine Stimulation mit TNF zur Formierung großer „Super-Enhancer“ mit Histon-Hyperacetylierung führt, die den Übergang zum inflammatorischen Zellstatus initiieren. Das Wissen über die entzündlichen Ereignisse im Nukleus von Epithelzellen und weiteren Zielzellen könnte also beim Verstehen vieler Krankheitsbilder eine Rolle spielen und im Gegensatz zu cytosolischen Komponenten des IL-1 Signalwegs die Nebenwirkungen bei der Therapie solcher Erkrankungen deutlich reduzieren.

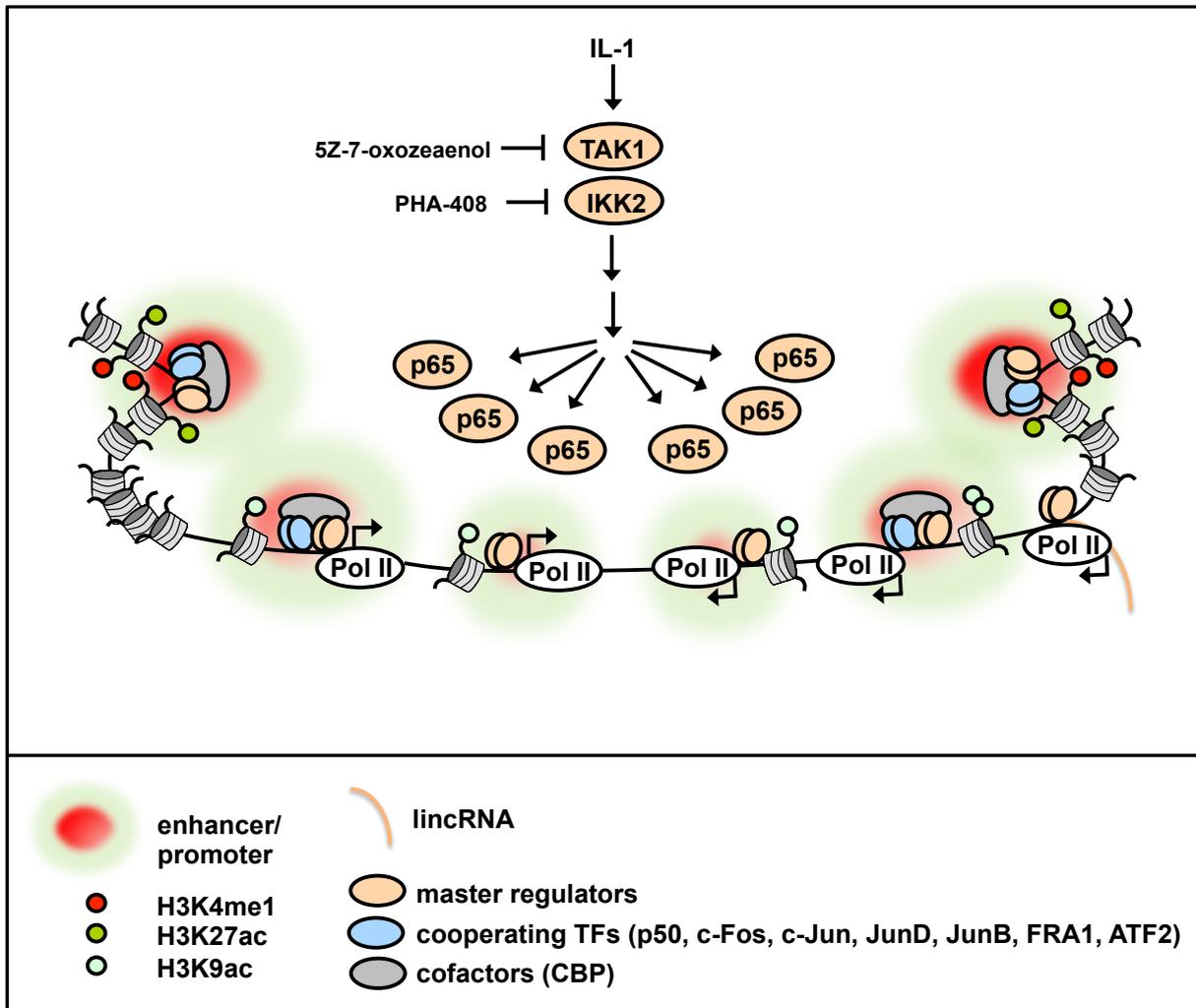


Abb. 6.2: Zusammenfassung der Erkenntnisse zur nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort von humanen Epithelzellen

Wie im CXC-Chemokingen-Cluster beobachtet werden konnte, koordinieren die „master regulators“ TAK1 und p65 nach einem IL-1 Stimulus die Formierung von Enhancer und Promotor assoziierten Multiproteinkomplexen, deren Dynamik durch einen entsprechenden Chromatinstatus determiniert werden kann. Das komplexe Zusammenspiel aller Faktoren führt zur Anlagerung der Polymerase II an die Promotoren der IL-1 Zielgene und zur schnellen und massiven Transkription der Genprodukte. Zusätzlich kommt es in intergenischen Bereichen im Genom auch zur Transkription IL-1 induzierter lincRNAs. Die Manipulation dieses Systems durch Proteinkinasehemmstoffe (5(Z)-7-Oxozeaenol, PHA-408) blockiert alle in dieser Arbeit untersuchten, regulierbaren und IL-1 abhängigen Chromatinvorgänge mit Ausnahme der H3K4me1 und definiert damit einen „Schlüsselsignalweg“ der inflammatorischen Gentranskription. Abbildung aus 81, CC BY-NC-ND Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

1. Aksentijevich, I., Masters, S.L., Ferguson, P.J., et al. (2009). An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist. *N. Engl. J. Med.* 360, 2426-2437.
2. Anders, L., Ke, N., Hydrbring, P. et al. (2011). A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer. *Cancer Cell* 20, 620-634.
3. Anders, S., Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology* 11(10), R106.
4. Asangani, I.A. et al. (2014). Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration-resistant prostate cancer. *Nature* 510(7504), 278-282.
5. Ashburner, B.P., Westerheide, S.D., Baldwin, A.S. Jr (2001). The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, 21, 7065–7077.
6. Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565–8.
7. Balkwill, F., Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow. *Lancet.* 357, 539–45.
8. Bandman, O., Coleman, R.T., Loring, J.F., Seilhamer, J.J., Cocks, B.G. (2002). Complexity of inflammatory responses in endothelial cells and vascular smooth muscle cells determined by microarray analysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 975, 77–90.
9. Bannister, A.J., Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* 21, 381-395.
10. Bartlett, J.M.S. (2004). Fluorescence *In Situ* Hybridization. *Molecular Diagnosis of Cancer, Methods in Molecular Medicine* 97, 77-87.
11. Bedford, M.T., Clarke, S.G. (2009). Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* 33, 1-13.
12. Bell, A.C., West, A.G., Felsenfeld, G. (1999). The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* 98, 387–96.
13. Bell, A.C., Felsenfeld, G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* 405, 482–85.
14. Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., Moses, H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332–337.
15. Bird, A.P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209–213.
16. Bird, A.P. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6–21.

17. Birney E. (2007). Double Dutch for duplications. *Nature Genetics* 39(11), 1303-1304.
18. Bizzarri, C., Beccari ,A.R., Allegretti, M. et al. (2006). ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets. *Pharmacol Ther* 112, 139-49.
19. Blackwood, E.M., Kadonaga, J.T. (1998). Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281, 60–63.
20. Blech, M., Peter, D., Fischer, P. et al. (2013). One Target – Two Different Binding Modes: Structural Insights into Gevokizumab und Canakinumab. Interactions to Interleukin-1 β . *Journal of molecular biology* 425(1), 94-111.
21. Bogdanović, O., Veenstra, G.J. (2009). DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* 118, 549–565.
22. Brikos, C., Wait, R., Begum, S., O'Neill, L.A., Saklatvala ,J, (2007). Mass spectrometric analysis of the endogenous type I interleukin-1 (IL-1) receptor signaling complex formed after IL-1 binding identifies IL-1RacP, MyD88, and IRAK-4 as the stable components. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1551–1559.
23. Brown, J.D., Lin, C.Y., Duan, Q. et al. (2014). NF- κ B Directs Dynamic Super Enhancer Formation in Inflammation and Atherogenesis. *Molecular Cell* 56(2), 219-231.
24. Buss, H., Handschick, K., Jurrmann, N. et al. (2012). Cyclin-Dependent Kinase 6 Phosphorylates NF- κ B P65 at Serine 536 and Contributes to the Regulation of Inflammatory Gene Expression. *PLoS One* 7(12), e51847.
25. Carmona-Saez, P., Chagoyen, M., Tirado, F., et al. (2007). GENECODIS: A web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biology* 8(1), R3.
26. Casadio, R., Frigimelica, E., et al. (2001). Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RacP with the IL-1 β / IL-1R(I) complex. *FEBS Lett.* 499, 65–68.
27. Casson, C.N., Sunny, S. (2013). Inflammasome-mediated cell death in response to bacterial pathogens that access the host cell cytosol: lessons from legionella pneumophila. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* v.3, doi: 10.3389/fcimb.2013.00111.
28. Chinenov, Y., Kerppola, T. K. (2001). Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* 20, 2438-2452.
29. Chen,L.F., Greene,W.C. (2003). Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation. *J. Mol. Med.*, 81, 549–557.
30. Chen,L.F., Williams,S.A., et al. (2005). NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Mol. Cell. Biol.*, 25, 7966–7975.
31. Christman, J.K. (2002).5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21(35), 5483-5495.
32. Cirillo, G., Casalino, L., et al. (1999). Role of distinct mitogen-activated protein kinase pathways and cooperation between Ets-2, ATF-2, and Jun family members in human

urokinase-type plasminogen activator gene induction by interleukin-1 and tetradecanoyl phorbol acetate. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6240–6252.

33. Cirillo, L.A., Lin, F.R., Zaret, K.S. et al. (2002). Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Molecular Cell* 9 (2), 279–89.

34. Colobran, R., Pujol-Borrell, R., Armengol, P., Juan, M. (2007). The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity. *Clinical and Experimental Immunology* 148, 208-217.

35. Consortium IHGS (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931–945.

36. Coussens, L.M., Werb, Z. (2001). Inflammatory cells and cancer: think different! *Journal of Exp. Med* 193, F23–6.

37. Coussens, L.M., Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.

38. Creighton, M.P., Cheng, A.W. et al. (2010). H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental stage. *PNAS* 107 (50), 21931-21936.

39. Defossez, P.A., Kelly, K.F., Filion, G.J., Perez-Torrado, R., Magdinier, F., et al. (2005). The human enhancer blocker CTC-binding factor interacts with the transcription factor Kaiso. *J. Biol.Chem.* 280, 43017–43023.

40. DiDonato, J.A., Mercurio, F., und Karin, M. (2012). NF-kappaB and the link between inflammation and cancer. *Immunol. Rev.* 246, 379-400.

41. Diefenbacher, M., Sekula, S., Heilbock, C. et al. (2008). Restriction to Fos family members of Trip6-dependent coactivation and glucocorticoid receptor-dependent trans-repression of activator protein-1. *Mol. Endocrinol.* 22, 1767-1780.

42. Dinarello, C.A., (2000). Proinflammatory Cytokines. *Chest* 118 (2), 503-508.

43. Dinarello, C.A. (2003). Setting the cytokine trap for autoimmunity. *Nature medicine* 9, 20-22.

44. Dinarello, C.A., (2009). Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology* 27, 519-550.

45. Dinarello, C.A (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117(14), 3720-3732.

46. Dinarello, C.A., Simon, A., van der Meer, J.W. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 11(8), 633-652.

47. Dorman, E.R., Bushey, A.M., Corces, V.G. (2007). The role of insulator elements in large-scale chromatin structure in interphase. *Seminars in cell and developmental biology* 18(5), 682-690.

48. Duperray, A., Mantovani, A. Introna, M., Dejana, E. (1995). Endothelial cell regulation of leukocyte infiltration in inflammatory tissues. *Mediators of inflammation* 4, 322-330.

-
49. Eferl, R., Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* 3, 859-868.
50. Eruslanov, E.B., Bhojnagarwala, P.S., Quatromoni, J.G. (2014). Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *Journal of Clinical Invest.* 124(12), 5466-5480.
51. Fang, L., Choudhary, S., Zhao, Y. et al. (2014). ATM regulates NF- κ B-dependent immediate-early genes via RelA Ser 276 phosphorylation coupled to CDK9 promoter recruitment. *Nucl. Acids Res.* (2014) doi: 10.1093/nar/gku529.
52. Feng, X., Grossmann, R., Stein, L. (2011). PeakRanger: a cloud-enabled peak caller for ChIP-seq data. *BMC Bioinformatics* 9, 12:139.
54. Filippova, G.N., Fagerlie, S., Klenova, E.M. et al. (1996). An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2802–2813.
55. Fronsdal, K., Engedal, N., Slagvold, T., Saatcioglu, F. (1998). CREB Binding Protein Is a Coactivator for the Androgen Receptor and Mediates Cross-talk with AP-1. *Journal of Biological Chemistry* 273, 31853-31859.
56. Furia, B., Deng, L., et al. (2002). Enhancement of nuclear factor-kappa B acetylation by coactivator p300 and HIV-1 Tat proteins. *J. Biol. Chem.*, 277, 4973–4980.
57. Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., et al. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology* 5(10), R80.
58. Ghamari, A., van de Corput, M.P., Thongjuea, S. (2013). In vivo live imaging of RNA polymerase II transcription factories in primary cells. *Genes and Development* 27(7), 767-777.
59. Ghisletti, S., Natoli, G. (2013). Deciphering cis-regulatory control in inflammatory cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 368, 20120370.
60. Goldberg, A.D., Allis, C.D., Bernstein, E. (2007). Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* 128 (4), 635-638.
61. Goodrich, J.A., Kugel, J.F. (2006). "Non-coding RNA regulators of RNA polymerase II transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(8), 612-616.
62. Gowrishankar, G., Winzen, R., Dittrich-Breiholz, O., Redich, N., Kracht, M., Holtmann, H. (2006). Inhibition of mRNA deadenylation and degradation by different types of cell stress. *Biol. Chem.* 387, 323–327.
63. Grivennikov, S., Karin, M. (2011). Inflammatory cytokines in cancer: tumor necrosis factor and interleukin 6 take the stage. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 104-108.
64. Handschick, K., Beuerlein, K., Jurida, L. et al. (2014). Cyclin-dependent kinase 6 is a chromatin-bound cofactor for NF- κ B-dependent gene expression. *Molecular Cell* 23, 53(2), 193-208.

-
65. Hargreaves, D.C., Horng, T., and Medzhitov, R. (2009). Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation. *Cell* 138, 129-145.
66. Hernandez, J.M., Floyd, D.H., Weilbaecher, K.N., Green, P.L., Boris-Lawrie, K. (2008). Multiple facets of junD gene expression are atypical among AP-1 family members. *Oncogene* 27(35), 4757-4767.
67. Hodawadekar, S.C., Marmorstein, R. (2007). Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene* 26, 5528-5540.
68. Hoffmann, E., Thiefes, A., Buhrow, D., Dittrich-Breiholz, O., Schneider, H., Resch, K., Kracht, M. (2005). MEK1-dependent delayed expression of Fos related antigen-1 counteracts c-Fos and p65 NF-kappaB-mediated interleukin-8 transcription in response to cytokines or growth factors. *J. Biol. Chem.* 280, 9706–9718.
69. Hojfeldt, J.W., Agger, K., Helin, K. (2013). Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 12, 917-930.
70. Holtmann, H., Winzen, R., Holland, P., et al. (1999). Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol. Cell Biol.* 19, 6742–6753.
71. Holtmann, H., Enninga, J., et al. (2001). The MAPK Kinase Kinase TAK1 Plays a Central Role in Coupling the Interleukin-1 Receptor to Both Transcriptional and RNA-targeted Mechanisms of Gene Regulation. *J. Biol. Chem.* 276, 3508-3516.
72. Holwerda, S.J., de Laat, W. (2013). CTCF: the protein, the binding partners, the binding sites and their chromatin loops. *Philosophical Transactions of the R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368(1620), 20120369.
73. Huang, Q., Yang, J., Lin, Y., et al. (2004). Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3. *Nat. Immunol.* 5, 98–103.
74. Illingworth, R.S., Bird, A. P. (2009). CpG islands – ‘A rough guide’. *FEBS Letters* 583, 1713–1720.
75. Ioshikhes, I.P., Zhang, M.Q. (2000). Large-scale human promoter mapping using CpG islands. *Nat. Genet.* 26, 61–63.
76. Jakovcsek, M., Akbarian, S. (2012). Epigenetic mechanisms in neurological disease. *Nature medicine* 18, 1194-1204.
77. Jeltsch, A. (2006). Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol* 301, 203–225.
78. Jin, F., Li, Y., Ren, B., Natarajan, R. (2011). PU.1 and C/EBP(alpha) synergistically program distinct response to NF-kappaB activation through establishing monocyte specific enhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, 5290-5295.
79. Jin, F., Li, Y., Dixon, J.R., Selvaraj, S., et al. (2013). A high-resolution map of the three-dimensional chromatin interactome in human cells. *Nature* 503, 290-294.

-
80. Jura, J., Wegrzyn, P., Korostynski M., et al. (2008). Identification of interleukin-1 and interleukin-6-responsive genes in human monocyte-derived macrophages using microarrays. *Biochim. Biophys. Acta* 1779, 383–389.
81. Jurida, L., Soelch, J., Bartkuhn, M., Kracht, M. et al. (2015). The Activation of IL-1-Induced Enhancers Depends on TAK1 Kinase Activity and NF- κ B p65. *Cell reports* 10, 1-14.
82. Kadauke, S., Blobel, G.A. (2009). Chromatin loops in gene regulation. *Biochim Biophys Acta*. 1789(1), 17–25.
83. Kalluri, R., Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 6, 392–401.
84. Kasowski, M., Grubert, F., Heffelfinger, C., et al. (2010). Variation in transcription factor binding among humans. *Science* 328, 232-235.
85. Kiernan, R., Bres, V., et al. (2003). Post-activation turn-off of NF- κ B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *J. Biol. Chem.*, 278, 2758–2766.
86. Kim, T.H., Abdullaev, Z.K., Smith, A.D. et al. (2007). Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell* 128, 1231–1245.
87. Klenova, E.M., Nicolas, R.H., Paterson, H.F. et al. (1993). CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken c-myc gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms. *Mol. Cell. Biol.* 13, 7612–7624.
88. Kollmann, K., Heller, G., Schneckenleithner, C. et al. (2013). A Kinase-Independent Function of CDK6 Links the Cell Cycle to Tumor Angiogenesis. *Cancer Cell* 24, 167-181.
89. Knudson, A.G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*. 1, 157–62.
90. Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128, 693–705.
91. Kuzmin, I., Geil, L., Gibson, L. et al. (2005). Transcriptional regulator CTCF controls human interleukin 1 receptor-associated kinase 2 promoter. *Journal of Molecular Biology* 346(2), 411-422.
92. Lan, F., Shi, Y. (2009). Epigenetic regulation: methylation of histone and non-histone proteins. *Sci China C Life Sci* 52, 311-322.
93. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology* 10(3), R25.
94. Langmead, B. (2010). Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Current protocols in bioinformatics*, Chapter 11, Unit 11.7.
95. Larochelle, S., Amat, R., Glover-Cutter, K. et al. (2012). Cyclin-dependent kinase control of the initiation-to- elongation switch of RNA polymerase II. *Nature structural & molecular biology* 19(11), 1108-1116).
96. Liu, Y., Ding, J., Reynolds, L.M. (2013). Methylomics of gene expression in human monocytes. *Human Molecular Genetics*, doi: 10.1093/hmg/ddt356.
97. Li, W., Notani, D., Ma, Q., Tanasa, B., et al. (2013). Functional roles of enhancer RNAs

for oestrogen-dependent transcriptional activation. *Nature* 498, 516-520.

98. Luster, A.D. (1998). Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338, 436-45.

99. Machanick, P., Bailey, T.L. (2011). MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics* 27(12), 1696-1697.

100. Malnou, C.E., Brockly, F., Favard, C. (2010). Heterodimerization with Different Jun Proteins Controls c-Fos Intranuclear Dynamics and Distribution. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (9), 6552–6562.

101. Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome biology* 15(6), 122.

102. Maston, G.A., Evans, S.K., Green, M.R. (2006). Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7, 29-59.

103. Matouk, C.C., Marsden, P.A. (2008). Epigenetic Regulation of Vascular Endothelial Gene Expression. *Circ Res.* 102, 873-887.

104. Mbalaviele, G., Sommers, C.D., Bonar, S.L. et al. (2009). A novel, highly selective, tight binding I κ B kinase-2 (IKK-2) inhibitor: a tool to correlate IKK-2 activity to the fate and functions of the components of the nuclear factor-kappaB pathway in arthritis-relevant cells and animal models. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 329, 14-25.

105. Moltó, E., Fernández, A., Montoliu, L. (2009). Boundaries in vertebrate genomes: different solutions to adequately insulate gene expression domains. *Briefings in functional genomics & proteomics* 8(4), 283-296.

106. Montavon, T., Soshnikova, N., Mascrez, B., et al.. (2011). A regulatory archipelago controls Hox genes transcription in digits. *Cell* 147, 1132-1145.

107. Mosammaparast, N., Shi, Y. (2010). Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annu Rev Biochem* 79, 155-179.

108. Mukaida, N., Mahe, Y., Matsushima, K. (1990). Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *Journal of Biol. Chem.* 265, 21128-21133.

109. Mukaida, N., Okamoto, S., Ishikawa, Y., Matsushima, K. (1994). Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol.* 56(5), 554-558.

110. Mukhopadhyay, R., Yu, W., Whitehead, J., et al. (2004). The Binding Sites for the Chromatin Insulator Protein CTCF Map to DNA Methylation-Free Domains Genome-Wide. *Genome Research* 14, 1594-1602.

111. Murphy, P.M. (1994). The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 12, 593-633.

112. Natoli, G., Sacconi, S., Bosisio, D., Marazzi, I. (2005). Interactions of NF- κ B with chromatin: the art of being at the right place at the right time. *Nature immunology* 6(5), 439-445.

-
113. Natoli, G., Andrau, J.-C. (2012). Noncoding Transcription at Enhancers: General Principles and Functional Models. *Annual Review of Genetics* 46, 1-19.
114. Ng, S.S., Yue, W.W., Oppermann, U., Klose, R.J. (2009). Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell Mol Life Sci* 66, 407-422.
115. Nguyen, D.Q., Webber, C., Hehir-Kwa, J. et al. (2008). Reduced purifying selection prevails over positive selection in human copy number variant evolution. *Genome Research* 18(11), 1711-1723.
116. Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., Matsumoto, K. (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398, 252-256.
117. Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, et al. (2001). Interleukin-1 (IL-1) Receptor-Associated Kinase Leads to Activation of TAK1 by Inducing TAB2 Translocation in the IL-1 Signaling Pathway *Nature* 398, 252–256.
118. Ninomiya-Tsuji, J. et al. (2003). A resorcylic acid lactone, 5Z-7-oxozeaenol, prevents inflammation by inhibiting the catalytic activity of TAK1 MAPK kinase kinase. *J. Biol. Chem.* 278, 18485–18490.
119. Nogales-Cadenas, R., Carmona-Saez, P., Vazquez, M., et al. (2009). GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Research* 2009, doi: 10.1093/nar/gkp416.
120. Nold, F.M., Nold-Petry, C.A., Dinarello, C.A. et al. (2010). IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nature immunology* 11(11), 1014-1022.
121. Ogbourne, S., Antalis, T.M. (1998). Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem. J.* 331(Pt. 1), 1–14.
122. Ohlsson, R., Bartkuhn, M., Renkawitz, R. (2010). CTCF shapes chromatin by multiple mechanisms: the impact of 20 years of CTCF research on understanding the workings of chromatin. *Chromosoma* 119, 351-360.
123. Oki, M., Aihara, H., Ito, T. (2007). Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases. *Subcell Biochem* 41, 319-336.
124. Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., et al.(2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell.* 121, 335–348.
125. Orimo, A., Weinberg, R.A. (2006). Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 5, 1597–1601.
126. Osborne, C.S., Chakalova, L., Brown, K.E. (2004).). Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nature Genetics* 36 (10), 1065–1071.
127. O’Shea, J.M., Perkins, N.D. (2008). Regulation of the RelA (p65) transactivation domain. *Biochem. Soc. Trans.*, 36, 603–608.
128. Ostuni, R., Piccolo, V., Natoli, G. et al. (2013). Latent Enhancers Activated by Stimulation in Differentiated Cells. *Cell* 152, 157-171.

-
129. Parelho, V., Hadjur, S., Spivakov, M., Merckenschlager, M., et al. (2008). Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell* 132, 422–433.
130. Pennacchio, L.A., Ahituv, N., Moses, A.M. et al. (2006). In vivo enhancer analysis of human conserved non-coding sequences. *Nature* 444(7118), 499-502.
131. Perkel, J. (2013). Visiting “Noncodarnia”. *Bio Techniques* 54(6), 301-304.
132. Perkins, N.D. (2012). The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 12, 121–132.
133. Peterson, C.L., Laniel, M.-A. (2004). Histones and histone modifications. *Current biology* 14(14), R546-551.
134. Pfarr, C.M., Mechta, F., Spyrou, G. et al. (1994). Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell* 76(4), 747-760.
135. Pizarro, T.T., Cominelli, F. (2007). Cloning IL-1 and the birth of a new era in cytokine biology. *J. Immunol.* 178, 5411–5412.
136. Premack, B.A., Schall, T.J. (1996). Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat Med* 2, 1174-8.
137. Proost, P., Wuyts, A., Conings, R. et al. (1993). "Human and bovine granulocyte chemotactic protein-2: complete amino acid sequence and functional characterization as chemokines". *Biochemistry* 32 (38), 10170–10177.
138. Quinlan, A.R., Hall, I.M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26(6), 841-842.
139. Raab, J.R., Kamakaka, R.T. (2010). Insulators and promoters: closer than we think. *Nature Reviews Genetics* 11, 439–446.
140. Rada-Iglesias, A., Bajpai, R., Swigut, T. et al. (2011). A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature* 470(7333), 279-83.
141. Raman, D., Baugher, P.J., Thu, Y.M., Richmond, A. (2008). Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Letters* 256(2), 137-165.
142. Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., et al. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593-599.
143. Remeseiro, S., Losada, A. (2013). Cohesin, a chromatin engagement ring. *Current opinion in cell biology* 25(1), 63-71.
144. Rubio, E.D., Reiss, D.J., Welcsh, P.L., Krumm, A., et al. (2008). CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 8309–8314.
145. Saeed, A.I., et al. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* 34, 374–378.
146. Saeed, A.I., et al. (2006). TM4 microarray software suite. *Methods Enzymology* 411, 134–193.

-
147. Sakurai, H. et al. (1999). Functional interactions of transforming growth factor b-activated kinase 1 with I κ B kinases to stimulate NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* 274, 10641–10648.
148. Sakurai, H. (2012). Targeting of TAK1 in inflammatory disorders and cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* 33(10), 522-530.
149. Schmidt, C., Peng, B., Li, Z., et al. (2003). Mechanisms of proinflammatory cytokine-induced biphasic NF- κ B activation. *Mol. Cell* 12, 1287–1300.
150. Schmitz, M.L., Baeuerle, P.A. (1991). The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF- κ B. *EMBO J* 10, 3805-17.
151. Schmitz, M.L., Mattioli, I., Buss, H., Kracht, M. (2004). NF- κ B: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chembiochem* 5, 1348-58.
152. Schmitz, M.L., Weber, A., Roxlau, T., Gaestel, M., und Kracht, M. (2011). Signal integration, crosstalk mechanisms and networks in the function of inflammatory cytokines. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 2165-2175.
153. Shaulian, E., Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 4, 131-136.
154. Shibuya, H., et al. (1996). TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF- β signal transduction. *Science* 272, 1179–1182.
155. Shim, J.H., Xiao, C., Paschal, A.E., et al. (2005). TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev.* 19, 2668-2681.
156. Simonatto, M., Barozzi, I., Natoli, G. (2013). Non-coding transcription at cis-regulatory elements: computational and experimental approaches. *Methods* 63, 66-75.
157. Smale, S.T., Kadonaga, J.T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 449–479.
158. Smale, S.T. (2012). Transcriptional regulation in the innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 51-57.
159. Spitz, F., Furlong, E.E. (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat. Rev. Genet.* 13, 613-626.
160. Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-14.
161. Stedman, W., Kang, H., Lin, S., Lieberman, P., et al. (2008). Cohesins localize with CTCF at the KSHV latency control region and at cellular c-myc and H19/Igf2 insulators. *Embo J.* 27, 654–666.
162. Tabas-Madrid, D., Nogales-Cadenas, R., Pascual-Montano, A. (2012). GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Research* 2012, doi: 10.1093/nar/gks402.

-
163. Takaesu, G., et al. (2000). TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol. Cell* 5, 649–658.
164. Trapnell, C., Pachter, L., Salzberg, S.L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25(9), 1105-1111.
165. van de Veerdonk, F.L., Stoeckman, A.K., Dinarello, C.A et al. (2012). IL-38 binds to the IL-36 receptor and has biological effects on immune cells similar to IL-36 receptor antagonist. *PNAS* 109(8), 3001-3005.
166. Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304–1351.
167. Visel, A., Prabhakar, S., Akiyama, J.A. et al. (2008). Ultraconservation identifies a small subset of extremely constrained developmental enhancers. *Nature Genetics* 40(2), 158-160.
168. Visel, A., Rubin, E.M., Pennacchio, L.A. (2009). Genomic views of distant-acting enhancers. *Nature* 461(17261), 199-205.
169. Voronov, E., Carmi, Y., Apte, R.N. (2014). The role of IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. *Frontiers in physiology* 5, 114.
170. Weber, A., Wasiliew, P., Kracht, M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal*. 3(105), cm1.
171. Wendt, K.S., Yoshida, K., Itoh, T., Peters, J.M., et al. (2008). Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* 451, 796–801.
172. Wesche, H., Korherr, C., Kracht, M. et al. (1997). The Interleukin-1 Receptor Accessory Protein (IL-1RAcP) Is Essential for IL-1-induced Activation of Interleukin-1 Receptor-associated Kinase (IRAK) and Stress-activated Protein Kinases (SAP Kinases). *The Journal of Biological Chemistry* 272, 7727-7731.
173. West, A.G., Gaszner, M., Felsenfeld, G. (2002). Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev.* 16, 271–88.
174. West, A.G., Fraser, P. (2005). Remote control of gene transcription. *Hum. Mol. Genet.* 14 (Spec. No. 1), R101–11.
175. Wietek, C., O'Neill, L.A. (2007). Diversity and regulation in the NF-kappaB system. *Trends Biochem. Sci.*, 32, 311–319.
176. Wolf A., Beuerlein K., et al. (2011). Identification and functional characterization of novel phosphorylation sites in TAK1-binding protein (TAB) 1. *PLoS One*. 6(12):e29256, doi:10.1371/journal.pone.0029256.
177. Wolf, S.S. (2009). The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cell Mol Life Sci* 66, 2109-2121.
178. Wu, J., Powell, F., Larsen, N.A., et al. (2013). Mechanism and in vitro pharmacology of TAK1 inhibition by (5Z)-7-Oxozeaenol. *ACS Chem. Biol.* 8, 643-650.

-
179. Xiao, B., Jing C, Wilson, J.R., et al. (2003). Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9. *Nature* 421, 652-656.
180. Xing, Y., Yang, Y., Zhou, F., Wang, J. (2013). Characterization of genome-wide binding of NF-kappaB in TNFalpha-stimulated HeLa cells. *Gene* 526, 142-149.
181. Yang, J., Mitra, A., Dojer, N., Fu, S., Rowicka, M., Brasier, A.R. (2013). A probabilistic approach to learn chromatin architecture and accurate inference of the NF-kappaB/RelA regulatory network using ChIP-Seq. *Nucleic Acids Res.* 41, 7240-7259.
182. Yang, X.J., Seto, E. (2007). HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* 26, 5310-5318.
183. Yamaguchi, K. et al. (1995). Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-b signal transduction. *Science* 270, 2008–2011.
184. Yamazaki, K., Gohda, J., Kanayama, A., et al. (2009). Two mechanistically and temporally distinct NF-kappaB activation pathways in IL-1 signaling. *Sci. Signal.* 2, ra66.
185. Zandi, E., Karin, M. (1999). Bridging the gap: Composition, regulation, and physiological function of the IkappaB kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4547–4551.
186. Zhang, X., Yang, Z., Khan, S.I., et al. (2003). Structural basis for the product specificity of histone lysine methyltransferases. *Mol Cell* 12, 177-185.
187. Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., et al. (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome biology* 9(9), R137.
188. Zhong, H., Voll, R.E., Ghosh, S. (1998). Phosphorylation of NF- κ B p65 by PKA Stimulates Transcriptional Activity by Promoting a Novel Bivalent Interaction with the Coactivator CBP/p300. *Molecular Cell* 1(5): 661-671.
189. Zhong, H., May, M.J., Jimi, E., Ghosh, S. (2002) The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell.*, 9, 625–636.
190. Ziesché, E., Kettner-Buhrow, D., Weber A., Wittwer, T., Jurida, L., et al. (2012). The coactivator role of histone deacetylase 3 in IL-1-signaling involves deacetylation of p65 NF- κ B. *Nucleic Acids Research* 41 (1), 90-109.
191. Zlotnik, A., Morales, J., Hedrick, J.A. (1999). Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol* 19, 1-47.
192. Zlotnik, A., Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-7.
193. Cain, C. (2013). CRISPR genome editing. *SciBX* 6(4); doi:10.1038/scibx.2013.77.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Kapitel 2 – Einleitung:

- Abb. 2.1:** Übersicht über den IL-1 Signalweg (12)
- Abb. 2.2:** Kristallstruktur von 5(Z)-7-Oxozeaenol gebunden an TAK1-TAB1
- Abb. 2.3:** Anordnung der Chemokingene im menschlichen Genom
- Abb. 2.4:** Übersicht zum IL-1/IL-8 regulierten Leukozyten-Infiltrationsweges (5)
- Abb. 2.5:** Epigenetische Mechanismen der Genregulation
- Abb. 2.6:** Mögliche Ursachen der „CpG island“ Hypomethylierung
- Abb. 2.7:** Möglicher Aufbau einer genregulatorischen Region
- Abb. 2.8:** Potentielle Interaktionen zwischen verschiedenen regulatorischen Elementen und Genpromotoren

Kapitel 5 – Ergebnisse:

- Abb. 5.1:** Effekte von IL-1 und dem TAK1-Inhibitor 5(Z)-7-Oxozeaenol auf die Genexpression in Epithelzellen
- Abb. 5.2:** Heatmap-Darstellung der veränderten Genexpression erlaubt die Auflistung aller unter IL-1 und dem TAK1-Inhibitor regulierten Gene
- Abb. 5.3:** Die in Epithelzellen am stärksten IL-1 induzierten Gene gehören zu einem gemeinsamen Gencluster
- Abb. 5.4:** Immunfluoreszenzanalysen in KB Zellen zeigen den IL-1 Effekt auf die Verteilung von NFκB p65 und c-Fos in der Zelle
- Abb. 5.5:** Einfluss des TAK1-Inhibitors auf die subzelluläre Verteilung von NF-κB
- Abb. 5.6:** Einfluss des TAK1-Inhibitors auf wichtige Proteine der IL-1 und MAPK Signalwege
- Abb. 5.7:** Putative NF-κB und AP-1 Bindungsstellen in den Promotorbereichen der Gene des CXC-Chemokingen-Clusters auf Chromosom 4
- Abb. 5.8:** Identifizierung der p65-Bindestelle am *IL8* Promotor durch „Scanning ChIP Primer“
- Abb. 5.9:** Identifizierung der p65-Bindestellen im CXC-Chemokingen-Cluster auf Chromosom 4
- Abb. 5.10:** Charakterisierung des Histonstatus an p65-Bindemotiven im CXC-Chemokingen-Cluster
- Abb. 5.11:** Vergleich des DNA-Methylierungsstatus an *CXCL1* und *CXCL6*
- Abb. 5.12:** Der Einfluss des DNA-Methyltransferase-Inhibitors Decitabin auf die IL-1 Induzierbarkeit verschiedener Zielgene
- Abb. 5.13:** Charakterisierung von NF-κB p65-Bindestellen im CXC-Chemokingen-Cluster
- Abb. 5.14:** ChIP-Seq Analyse von p65 und Polymerase II an *IL8* und im gesamten CXC-Chemokingen-Cluster
- Abb. 5.15:** ChIP-Seq Profile verschiedener Histonmodifikationen im CXC-Chemokingen-Cluster
- Abb. 5.16:** Analyse der TAK1-Abhängigkeit der unter IL-1 Behandlung im CXC-Chemokingen-Cluster beobachteten Ereignisse
- Abb. 5.17:** ChIP-Seq Profile der TAK1-unabhängigen H3K4me1 im CXC-Chemokingen-Cluster
- Abb. 5.18:** Vergleich der Bindungsereignisse im CXC-Chemokingen-Cluster unter verschiedenen Bedingungen
- Abb. 5.19:** Modell zur Veranschaulichung der nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort von Epithelzellen
- Abb. 5.20:** ChIP-Analyse kooperierender Proteine an der p65-Bindestelle des *IL8* Promotors
- Abb. 5.21:** Bindungskinetiken der identifizierten AP-1-Faktoren am *IL8* Promotor
- Abb. 5.22:** Um Kofaktoren erweitertes Modell zur Veranschaulichung der nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort von Epithelzellen
- Abb. 5.23:** Detektion von CDK6 am Chromatin des *IL8* Promotors durch ChIP und ReChIP
- Abb. 5.24:** CDK6 ChIP-Seq Profile am CXC-Chemokingen-Cluster

- Abb. 5.25:** Das Bindungsverhalten von CDK6, p65 und Pol II an IL-1 Zielgenen
- Abb. 5.26:** Genomweite Analyse der Bindungsereignisse von p65, Pol II und CDK6, deren Korrelation untereinander und mit der Histonmodifikation H3K9ac
- Abb. 5.27:** Einfluss eines p65 bzw. CDK6 „knockdowns“ auf die gegenseitige Rekrutierung beider Faktoren sowie auf die Bindung von Polymerase II
- Abb. 5.28:** Zeitabhängige Rekrutierung von CDK6 im Vergleich zu p65 und Polymerase II am Promotor von *CXCL2*
- Abb. 5.29:** Aktivierung und Verteilung der Polymerase II über dem gesamten *IL8* Locus in Abhängigkeit von CDK6
- Abb. 5.30:** Integration von CDK6 als neuem Kofaktor in das Modell zur Veranschaulichung der nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort von Epithelzellen
- Abb. 5.31:** ChIP-Seq Profile wichtiger Enhancer-Histonmodifikationen im Bereich zwischen „Startgenen“ und „upstream“ liegenden p65 Peaks
- Abb. 5.32:** Die Histonmodifikationen K27ac und K4me1 am *GAPDH* Locus
- Abb. 5.33:** ChIP-PCR-basierte Validierung und weitere Analyse der IL-1 und TAK1-abhängigen Veränderungen der Enhancer-typischen Histonmodifikationen
- Abb. 5.34:** Vergleich der Faktor-Zusammensetzung an Promotor und Enhancer von *IL8* und *CXCL2*
- Abb. 5.35:** Bindungskinetik der an Promotor und Enhancer von *IL8* und *CXCL2* detektierten Faktoren
- Abb. 5.36:** Analyse möglicher Bindung von CDK6 und Polymerase II an den Enhancer von *CXCL2*
- Abb. 5.37:** CTCF ChIP-Seq Profile im CXC-Chemokingen-Cluster
- Abb. 5.38:** Überprüfung von CTCF-Bindestellen auf die Assoziation mit Rad21
- Abb. 5.39:** Korrelation von CTCF-Bindung und Induzierbarkeit von IL-1 Zielgenen
- Abb. 5.40:** Zusammenfassendes Modell zu Faktoren an Enhancer- und Promotorbereichen in der nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort von Epithelzellen
- Abb. 5.41:** Die Umgebung von IL-1 induzierten lincRNAs in Epithelzellen
- Abb. 5.42:** IL-1 und TAK1 regulierte lincRNAs in Epithelzellen
- Abb. 5.43:** Der Einfluss des Inhibitors „JQ1“ auf IL-1 induzierte lincRNAs
- Abb. 5.44:** Um lincRNAs komplementiertes Modell zur Veranschaulichung der nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort von Epithelzellen

Kapitel 6 – Diskussion:

- Abb. 6.1:** Klassifizierung der genomweit identifizierten Enhancer in KB-Zellen
- Abb. 6.2:** Zusammenfassung der Erkenntnisse zur nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort von Epithelzellen

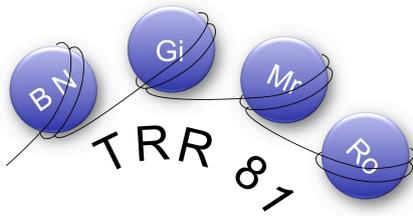
7.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
as	„antisense“
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	„complementary“ DNA
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
ChIP-Seq	ChIP-Sequenzierung
DMEM	„ <i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i> “
DMSO	Dimethylsulfoxid
dd H ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	„desoxyribonucleic acid“
DNMT	<i>de novo</i> Methyltransferase
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphate
ECL	„Enhanced chemiluminescence“
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fötales Kälberserum
f.c.	„final concentration“
g	Gramm
h	Stunde
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
H3K9ac	Acetylierung des Lysins K9 am Histon H3
H3K27ac	Acetylierung des Lysins K27 am Histon H3
H3K4me1	Monomethylierung des Lysins K4 am Histon H3

H3K9me3	Trimethylierung des Lysins K9 am Histon H3
H3K27me3	Trimethylierung des Lysins K27 am Histon H3
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
IL-1 RAcP	Interleukin 1 Rezeptor-akzessorisches Protein
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
l	Liter
LB	„lysogeny broth“
lincRNA	„long intergenic RNA“
M	Molar (mol/l)
m	mol
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	„messenger RNA“
MS-PCR	methylierungsspezifische PCR
n	nano
NP40	<i>Nonidet P-40</i>
OD	optische Dichte
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“
pH	„potentia hydrogenii“
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	„ribonucleic acid“
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
rpm	„rounds per minute“
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR

SAM	S-Adenosylmethionin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
Se	„sense“
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tab.	Tabelle
TBS	„Tris buffered saline“
TBST	TBS mit Tween 20
TE	Tris mit EDTA
TEMED	N, N', N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U	Units; Enzymeinheit
UV	ultraviolett
V	Volt
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
x g	Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
μ	Mikro

7.4 PhD Portfolio



PhD Portfolio - MGK

Summary of PhD training

Name of PhD student: Liane Moana Jurida

Affiliation:

Rudolf-Buchheim-Institut

Justus Liebig Universität Gießen

Schubertstraße 31

D-35392 Gießen

tel: 0641/9939666

e-mail: Liane.M.Jurida@pharma.med.uni-giessen.de

Start of PhD work: December 2009

Topic of PhD thesis work:

Mechanismen der nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort von Epithelzellen

Thesis committee:

1. Prof. Rainer Renkawitz
2. Prof. Michael Kracht

Meetings of the thesis committee:

- 07.04.2011
- 05.04.2012
- 04.04.2013

PhD training

General courses

Leica Microscopy Workshop, Marburg, 09.10.-11.10.12

Seminars and workshops

“Progress report” 15.03.10

“DNA methylation” RBI Seminar 06.05.10

“Progress report” 21.06.10

“Progress report” 18.11.10

“Regulation of chemokine genes and chemokine gene clusters” RBI Seminar 02.12.10

“Progress report” 17.01.11

“Progress report” 15.04.11

“Analysis of nuclear mechanisms of co-regulation of chemokine genes” RBI Seminar 19.05.11

“Progress report” 04.07.11

“Nuclear co-regulation of IL1-induced genes” RBI Seminar 22.09.11

“Progress report” 23.01.12

“Nuclear regulation in the NFkB pathway” RBI Seminar 09.02.12

“Progress report” 16.04.12

“Progress report” 26.06.12

“Chromatin looping” RBI Seminar 20.09.12

“Progress report” 30.11.12

“DNA methylation and the regulation of CXC chemokine genes” RBI Seminar 07.02.13

“Progress report” 18.02.13

“Progress report” 13.05.13

“Regulation of IL1 target genes at the stage of chromatin” RBI Seminar 13.06.13

Presentations:Chromatin Methods Club:

“ChIP” 08.03.11

TRR81 meeting:

“Analysis of nuclear mechanisms of co-regulation of chemokine genes” 07.04.11

“Cooperative assembly of transcriptional regulators and cofactors at IL-1- and NF-κB target genes” 05.04.12

“Cooperative assembly of nuclear regulators at IL-1- and NF-κB target genes” 04.04.2013

Joint lab meeting:

“Nuclear regulation of chemokine genes in IL1 signalling – ChIP Seq and 3C Assay”
15.02.2013

Retreats:

“Ganymed pharmaceuticals” Mainz 22.06.11

(Inter)national conferences:

Jahrestagung der DGPT Frankfurt am Main 30.03.-01.04.11

International Symposium „Chromatin Changes in Differentiation and Malignancies“ in Gießen, 12.-14.09.2011

„NF-κB subunit workshop“ in Rauschholzhausen 01.-03.10.12

Organisation of student workshops/minisymposia on specific topics

Workshop on Chromatin immunoprecipitation for PhD students (22.03.-28.03.2013).

Others

Supervising Master thesis on “Investigations of NF-κB p65 recruitment to chromatin and the chromatin status of p65 dependent genes in mouse embryonic fibroblasts” (2012/2013, Juliane Kums).

Publications

1.) Ziesché, E., Kettner-Buhrow, D., Weber, A., Wittwer, T., **Jurida, L.**, Soelch, J., Müller, H., Newel, D., Kronich, P., Schneider, H., Dittrich-Breiholz, O., Bhaskara, S., Hiebert, S.W., Hottiger, M.O., Li, H., Burstein, E., Schmitz, M.L., Kracht, M. (2013). *The coactivator role of histone deacetylase 3 in IL-1-signaling involves deacetylation of p65 NF- κ B*. Nucleic Acids Research 41(1), 90-109.

Abbildung 6C: ChIP-Experiment zur Rekrutierung von p65, HDAC3 und P(S5)-Pol II sowie H3K9ac an den Promotor von *IL8* und die Kontrollregion.

Weitere nicht gezeigte ChIP-Analysen zu einer möglichen HDAC3-Rekrutierung an verschiedene IL-1 Zielgenregionen.

2.) Handschick, K.¹, Beuerlein, K.¹, **Jurida, L.¹**, Bartkuhn, M., Müller, H., Soelch, J., Weber, A., Dittrich-Breiholz, O., Schneider, H., Scharfe, M., Jarek, M., Stellzig, J., Schmitz, M.L., Kracht, M. (2014). *Cyclin-Dependent Kinase 6 is a Chromatin-Bound Cofactor for NF- κ B-Dependent Gene Expression*. Mol Cell. 53(2):193-208. ¹gleichwertige Autorenschaft.

Abbildung 5: Durchführung der ChIP-Seq Experimente, die die Grundlage für alle gezeigten Analysen bilden.

Abbildung 6: Durchführung und Auswertung aller gezeigten ChIP-Experimente.

Abbildung 7: Durchführung und Auswertung aller gezeigten ChIP-Experimente.

Allgemeine Mitwirkung bei der Analyse und dem Design der Experimente zur Rekrutierung von CDK6 an Chromatin.

3.) Liane Jurida¹, Johanna Soelch¹, Marek Bartkuhn¹, Helmut Müller, Katja Handschick, Doris Newel, Axel Weber, Oliver Dittrich-Breiholz, Heike Schneider, Sabin Bhujju, Vera V. Saul, M. Lienhard Schmitz, Michael Kracht (2015). *The activation of IL-1-induced enhancers depends on TAK1 kinase activity and NF- κ B p65*. Cell Reports 10, 1-14. ¹gleichwertige Autorenschaft.

Abbildung 1: Durchführung der ChIP-Seq Experimente für die gezeigten Profile und Mitwirkung bei der Analyse.

Abbildung 2, B-D: Durchführung der ChIP-Seq Experimente, die die Grundlage für alle gezeigten Analysen bilden.

Abbildung 3: Durchführung der ChIP-Seq Experimente, die die Grundlage für alle gezeigten Analysen bilden. Durchführung des RNA-Seq Experimentes.

Abbildung 4 A,B: Durchführung der ChIP-Seq Experimente für die gezeigten Profile und Mitwirkung bei der Analyse.

Abbildung 5, 6 und 7: Design von drei der verwendeten Primer.

Abbildung 6C und 7B: Mitwirkung bei der Etablierung der gezeigten ChIPs mit Antikörpern gegen verschiedene Kofaktoren.

Abbildung S1: Generierung des Materials für die durchgeführten RNA-Microarrays.

Abbildung S2: Durchführung der ChIP-Seq Experimente für die gezeigten Profile und Mitwirkung bei der Analyse.

Abbildung S3: Generierung des Materials für die durchgeführten RNA-Microarrays.

Abbildung S6: Design von drei der verwendeten Primer.

Abbildung S7: Design von drei der verwendeten Primer, Mitwirkung bei der Etablierung der gezeigten ChIPs mit Antikörpern gegen verschiedene Kofaktoren.

Allgemeine Mitwirkung bei der Analyse der Ergebnisse.

7.5 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Professor Kracht bedanken, der mich auf meine Initiative hin gerne in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir die Möglichkeit gegeben hat sehr frei und selbstständig meine Doktorarbeit dort anzufertigen und immer mit Anregungen, Theorien und kritischen Fragen zur Verfügung stand.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Renkawitz, der sofort bereit war meine fachbereichsinterne Betreuung während der Doktorarbeit zu übernehmen und bereits während meiner Diplomarbeit die Grundlagen für mein wissenschaftliches Denken und Arbeiten gelegt hat.

Meine Doktorarbeit wäre aber auch nicht ohne alle meine lieben Kollegen zustande gekommen, die mich herzlich im Institut aufgenommen und unterstützt haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei Johanna, die mir in dieser Zeit nicht nur bei wissenschaftlichen Problemen zugehört hat, in Leben und Labor zur Seite stand und eine gute Freundin geworden ist. Auch Elisabeth und Katja teilten mit mir mehr als nur das Büro und ihre ständige Hilfsbereitschaft machte den Arbeitsalltag zur Freude. Daneben gab es natürlich noch viele andere hilfsbereite Kollegen, wie zum Beispiel unsere erfahrenen TAs Doris Newel und Helmut Müller, die mich bei vielen Experimenten mit Rat und Tat unterstützten. Oder Daniela, die mir bei meinen ersten Schritten in der Arbeitsgruppe sehr geholfen hat. Vielen Dank an die gesamte AG Kracht, bei der ich mich immer sehr wohl gefühlt habe!

Da eine Doktorarbeit letztlich nicht nur in Labor und Büro stattfindet, möchte ich mich auch gerne bei Freunden und Familie bedanken. Gute Freunde hören zu, bieten Ausgleich und springen bei Engpässen ein und das traf bei mir zum Glück alles zu. Bei meinen Eltern möchte ich mich für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt auf meinem Weg bedanken, aber auch für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre Bereitschaft mir in allen Lebenslagen zu helfen. Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Mann, der mich ebenso bedingungslos unterstützt, mir stets zur Seite steht und mein Zuhause ist. Und bei meinem kleinen Sohn, der mir jeden Tag neue Kraft gibt und mir die Schönheit der Welt immer wieder neu vor Augen führt. Danke.

7.6 Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung:

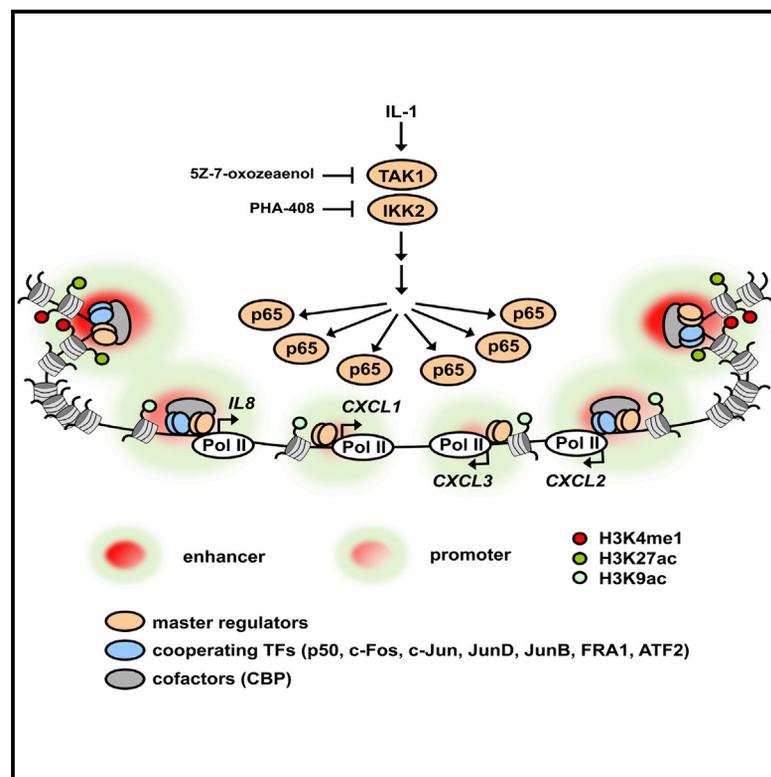
Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Schon veröffentlichte Abbildungen wurden mit Erlaubnis des Journals/Verlages in die Arbeit eingefügt. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

(Liane Jurida)

The Activation of IL-1-Induced Enhancers Depends on TAK1 Kinase Activity and NF- κ B p65

Graphical Abstract



Authors

Liane Jurida, Johanna Soelch, ...,
M. Lienhard Schmitz, Michael Kracht

Correspondence

michael.kracht@pharma.med.
uni-giessen.de

In Brief

Jurida et al. identify the protein kinases TAK1 and IKK2 and the transcription factor NF- κ B p65 as master regulators that prime and control the genome-wide activation of interleukin 1-induced enhancers and promoters of inflammatory genes at the level of chromatin.

Highlights

- IL-1 induces recruitment of NF- κ B p65 to >1,000 mostly intergenic sites
- IL-1 activates more than 400 enhancers that show inducible p65 binding and H3K27ac
- At these enhancers, the TAK1-IKK2-p65 pathway regulates H3K27ac but not H3K4me1
- TAK1-p65 control genomic recruitment of Pol II, P(S5)-Pol II, AP-1, CBP, and p50 NF- κ B

Accession Numbers

GSE64224
GSE52470

The Activation of IL-1-Induced Enhancers Depends on TAK1 Kinase Activity and NF- κ B p65

Liane Jurida,^{1,6} Johanna Soelch,^{1,6} Marek Bartkuhn,^{2,6} Katja Handschick,¹ Helmut Müller,¹ Doris Newel,¹ Axel Weber,¹ Oliver Dittrich-Breiholz,³ Heike Schneider,³ Sabin Bhujra,⁴ Vera V. Saul,⁵ M. Lienhard Schmitz,⁵ and Michael Kracht^{1,*}

¹Rudolf-Buchheim-Institute of Pharmacology, Justus-Liebig-University Giessen, 35392 Giessen, Germany

²Institute for Genetics, Justus-Liebig-University Giessen, 35392 Giessen, Germany

³Institute of Physiological Chemistry, Medical School Hannover, 30625 Hannover, Germany

⁴Helmholtz Centre for Infection Research, 38124 Braunschweig, Germany

⁵Institute of Biochemistry, Justus-Liebig-University Giessen, 35392 Giessen, Germany

⁶Co-first author

*Correspondence: michael.kracht@pharma.med.uni-giessen.de

<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.001>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

SUMMARY

The inflammatory gene response requires activation of the protein kinase TAK1, but it is currently unknown how TAK1-derived signals coordinate transcriptional programs in the genome. We determined the genome-wide binding of the TAK1-controlled NF- κ B subunit p65 in relation to active enhancers and promoters of transcribed genes by chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) experiments. Out of 35,000 active enhancer regions, 410 H3K4me1-positive enhancers show interleukin 1 (IL-1)-induced H3K27ac and p65 binding. Inhibition of TAK1 or IKK2 or depletion of p65 blocked inducible enhancer activation and gene expression. As exemplified by the CXC chemokine cluster located on chromosome 4, the TAK1-p65 pathway also regulates the recruitment kinetics of the histone acetyltransferase CBP, of NF- κ B p50, and of AP-1 transcription factors to both promoters and enhancers. This study provides a high-resolution view of epigenetic changes occurring during the IL-1 response and allows the genome-wide identification of a distinct class of inducible p65 NF- κ B-dependent enhancers in epithelial cells.

INTRODUCTION

Interleukin 1 (IL-1) is a prototypic pleiotropic cytokine that strongly induces local and systemic inflammation (Dinarello et al., 2012). Evidence in humans shows that dysregulation of IL-1 is sufficient to drive the entire systemic inflammatory response, thus demonstrating that this cytokine is at the apex of inflammatory cascades (Aksentjevich et al., 2009). At the cellular level, the main effect of IL-1 is the rapid reprogramming of inflammatory gene expression (Schmitz et al., 2011; Weber et al., 2010).

A central regulator of this gene response in the cytoplasm is the protein kinase TAK1, which is activated by proinflammatory cytokines (IL-1, tumor necrosis factor [TNF]), transforming growth factor- β (TGF- β), stressors, and by various toll-like receptors (TLRs) (Sakurai, 2012). One major role of TAK1 is to phosphorylate mitogen-activated protein kinases (MAPKs), which then activate individual p38 and JNK MAPK pathways (Ninomiya-Tsuji et al., 1999). Hence, the kinase is upstream of several transcription factors (TFs) such as Jun or ATF family members, which are all substrates of MAPKs (Shaulian and Karin, 2002). Also, the TF NF- κ B is activated by TAK1-mediated signals on a pathway involving TAK1-mediating activation of I κ B kinases (IKKs) (Sakurai et al., 1999). These, in turn, phosphorylate the cytosolic inhibitor I κ B α and enable its ubiquitin/proteasome-dependent destruction, thus allowing nuclear translocation of NF- κ B (Hayden and Ghosh, 2008). The NF- κ B p65 subunit has the strongest transactivation potential and its activity is also controlled by many posttranslational modifications including IKK-mediated phosphorylation of the p65 C-terminal transactivation domain at S536, thereby providing an additional mechanism for fine-tuning NF- κ B transcriptional activity (Perkins, 2012). Thus, TAK1 is an apical and global regulator of multiple AP-1 family members and of the NF- κ B pathway, but the consequences of TAK1 activity on nuclear events and chromatin binding of TFs have not yet been defined.

Enhancers are gene regulatory elements that control the activity of promoters independent from location, distance, or orientation (Pennacchio et al., 2013). Enhancers are vital for lineage determination and maintenance of cell types by organizing the recruitment of lineage-specific transcription factors, which provide crucial control of cell-specific genes (Ghisletti and Natoli, 2013). Accordingly, enhancers are characterized by specific chromatin states and nucleosomal depletion. Recent evidence shows that active enhancers are associated with characteristic chromatin signatures, most importantly H3K4me1, p300 acetyltransferase occupancy, and H3K27 acetylation (Flintoft, 2013). High-resolution studies of these marks revealed that enhancers are highly abundant gene regulatory elements with recent estimates ranging from 25,000 to several hundreds of thousands (Zhu et al., 2013; Shen et al.,

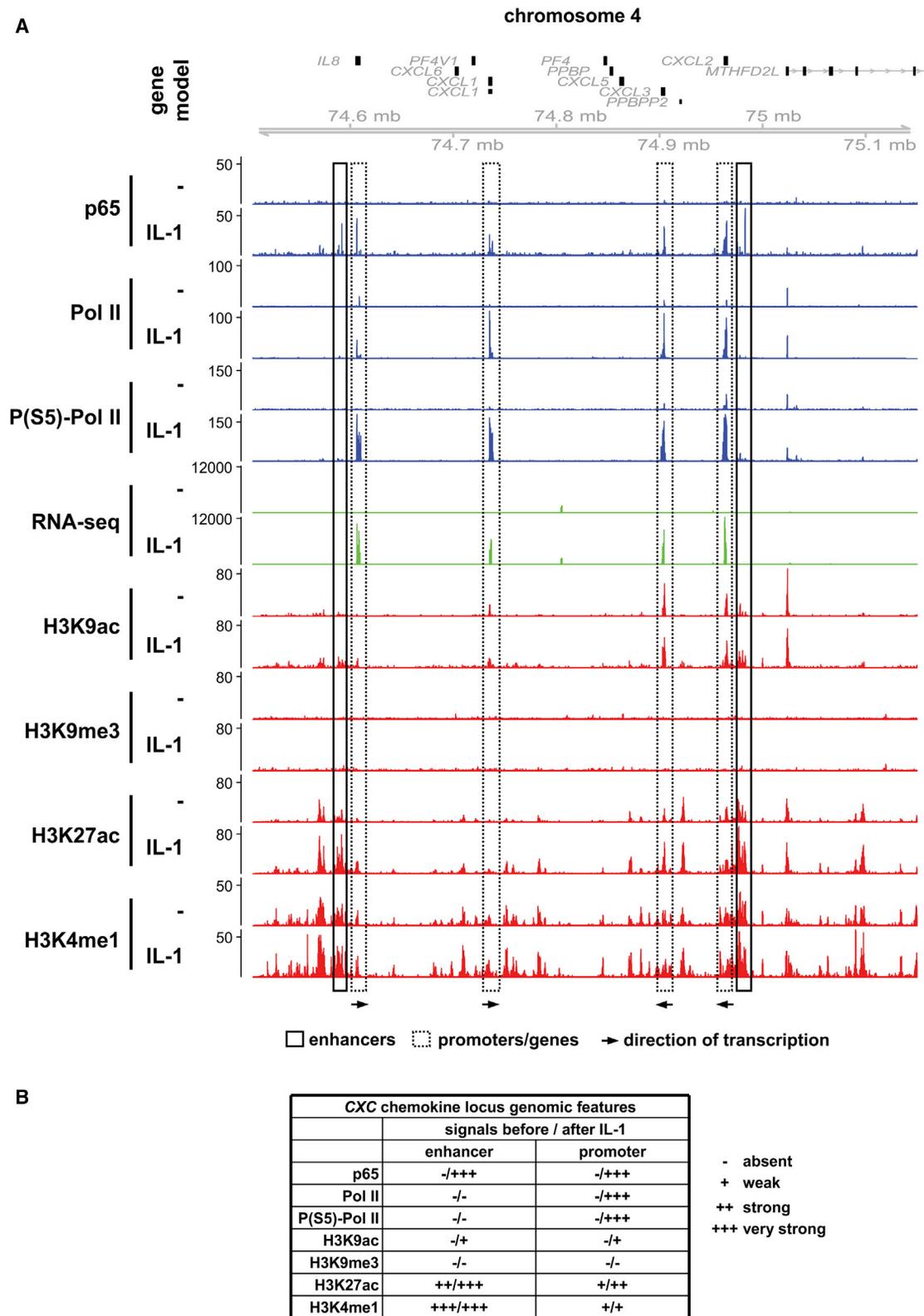


Figure 1. Identification of IL-1-Regulated Intergenic Enhancers Flanking the CXC Chemokine Cluster Located at Chromosome 4

(A) Human epithelial KB cells were stimulated with IL-1 for 1 hr or were left untreated. Then chromatin or total RNA was prepared, and RNA-seq or ChIP-seq experiments were performed using the indicated antibodies, and read coverage was determined. Shown are coverage profiles across the human CXC chemokine (legend continued on next page)

2012). Recent work in murine macrophages unraveled PU.1-dependent lipopolysaccharide (LPS)-regulated enhancers, providing support for the dynamic nature of the enhancer repertoire in innate immune cells (Ostuni et al., 2013). Comparable information on enhancer regulation by inflammatory cytokines, which are vital executors of innate immune functions in most tissues, is lacking.

Because the nuclear signaling network utilized by IL-1 is largely unexplored, we analyzed IL-1-induced chromatin signatures and TF binding at the genome-wide level. We identified 47,609 p65 peaks of which 1,264 were regulated by IL-1. The majority of p65 recruitment occurred at intergenic regions of unknown function. Additionally, we discovered 35,130 enhancers including 1,575 IL-1-inducible enhancers. A subgroup of 410 enhancers shows IL-1-inducible H3K27ac and p65 recruitment and is found upstream of cytokine-induced genes. The activation of this type of IL-1-induced enhancers was fully dependent on the kinase activity of TAK1 and IKK2 and on the presence of NF- κ B p65. The TAK1-p65 pathway also regulates the recruitment kinetics of a number of AP-1 factors to both promoters and enhancers. The concerted and synchronized activation of IL-1-driven enhancers provides a unifying molecular mechanism for the rapid and strong upregulation of inflammatory genes evoked by this cytokine.

RESULTS

Identification of IL-1-Regulated Intergenic Enhancers Flanking the CXC Chemokine Cluster on Chromosome 4

To identify the number of IL-1-induced genes in epithelial cells, KB cells were stimulated for various periods of time with IL-1, followed by the analysis of gene expression by microarrays. These experiments showed the IL-1-inducible and time-dependent mRNA expression of 241 genes (Figure S1A; Table S1) and thus indicate that this cell line is well suited to study IL-1-dependent transcription and chromatin regulation. To address the question of which chromatin-based processes accompany IL-1-induced and p65-dependent gene expression, we performed chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) experiments with antibodies recognizing the NF- κ B p65 protein and chromatin marks typical for active promoters or enhancers as described above (H3K9ac, H3K4me1, and H3K27ac). In addition, genome-wide localization of IL-1-triggered transcripts and ongoing transcription were determined by RNA sequencing (RNA-seq), or by ChIP-seq using antibodies directed at RNA polymerase II (Pol II) and by measuring the serine 5 phosphorylated form of Pol II (P(S5)-Pol II), which occurs during transcription initiation (Figure 1A).

For the analysis of ChIP-seq data, we initially focused on a gene cluster containing the highly regulated chemokine genes *IL8* (*CXCL8*), *CXCL1*, 2, and 3 (Figure S1B). These chemokines lie within a genomic region spanning 0.4 Mb of chromosome 4. This region showed strongly regulated p65 binding immediately

upstream of the transcriptional start sites (TSSs) of *IL8*, *CXCL1*, 2, and 3, reflecting p65 recruitment to canonical NF- κ B sites within the promoters of these genes (Figure 1A, marked by dotted boxes). In addition, we found strongly induced p65 peaks located in two intergenic regions flanking the *IL8* and *CXCL2* genes (Figure 1A, marked by solid boxes). RNA-seq and Pol II ChIP-seq analyses showed no signs of ongoing transcription of these intergenic regions (Figure 1A). Repressive chromatin marks such as H3K9me3 were absent, in agreement with the biological need to immediately express these chemokine genes in precarious situations. The histone mark H3K9ac was already seen in unstimulated cells and IL-1 treatment augmented this modification at all p65 sites (Figure 1A). Small peaks of basal H3K27ac were found at the promoters of transcribed genes (Figure 1A, dotted boxes). Significantly stronger basal H3K27ac marks were found in the regions surrounding the intergenic p65 peaks (Figure 1A, solid boxes). After IL-1 stimulation of cells, H3K27ac levels at these regions increased even further (Figure 1A, solid boxes). Small areas of basal H3K4me1 were found at promoters (Figure 1A, dotted boxes), whereas very strong signals occurred at intergenic regions occupied by p65 (Figure 1A, solid boxes). However, H3K4me1 marks were not regulated by IL-1 (Figure 1A, solid boxes). In comparison, inspection of an unrelated genomic region that did not contain IL-1-regulated genes showed strong but comparable H3K9ac, H3K27ac, and H3K4me1 signals as well as many nonregulated p65 peaks (Figure S2A). These data show that IL-1-induced gene regulation involves a specific pattern of regulated chromatin marks in association with p65 binding whose major features are summarized in Figure 1B. Moreover, these data suggest that IL-1 specifically operates through a dual mechanism, which involves p65 binding to individual gene promoters and additionally p65 association with putative intergenic enhancers marked by strong H3K4me1 and regulated H3K27ac signals flanking clusters of highly coregulated genes.

High-Resolution Mapping of Intergenic and TSS-Associated p65 NF- κ B Binding Sites

To find out whether the patterns of p65 binding and chromatin modifications described above are restricted to the particularly strongly regulated chemokine locus on chromosome 4 or whether they also occur for other IL-1-regulated genes, we further analyzed the nuclear and genomic distribution of p65. In KB cells, about 15%–20% of total p65 protein is present constitutively within the nucleus whereby the insoluble fraction (N2) that is stably associated with chromatin accounts for only about 5% (Figure 2A). In line with its capacity to activate the canonical TAK1-IKK2-NF- κ B pathway, IL-1 treatment strongly increased the amount of p65 in both the soluble (36%) and the insoluble (15%) fractions resulting in a redistribution of about 50% of total p65 to the nucleus within 1 hr of cytokine exposure (Figure 2A). IL-1 also induced phosphorylation of p65 at S536 and nuclear translocation of the p50 subunit indicating that the

locus on chromosome 4. Black dotted frames indicate positions of promoters/transcribed genes. Black solid frames indicate positions of two p65-binding enhancer regions flanking the *IL8* and *CXCL2* loci. The top shows a schematic representation of the exons of all transcribed and nontranscribed genes.

(B) Summary of basal and IL-1-regulated chromatin changes within the CXC chemokine cluster.

See also Figures S1 and S2 and Table S1.

Genome-wide Identification of IL-1- and p65-Regulated Enhancers

Because most p65 peaks were far away from the next gene, we then thought to further characterize the p65 associated enhancer repertoire. High-resolution mapping across all conditions (basal and IL-1-stimulated) revealed 48,133 H3K27ac and 70,225 H3K4me1 peaks. From these data, we derived 35,130 regions as active enhancers, as defined by the presence of both H3K27ac and H3K4me1 marks (Figure 3A). IL-1 did not affect both marks simultaneously but did enhance histone marks individually. Specifically, we found 468 DNA regions showing IL-1-inducible H3K4me1 and 1,107 regions showing inducible H3K27ac (Figures 3A and 3B). Forty-six out of the 468 active enhancers were associated with p65 peaks, and we designated them as regulated class I enhancers (Figures 3A and 3C). Of the 1,107 enhancers, 410 were associated with 469 p65 peaks and were called class II enhancers (Figures 3A and 3C). The class II enhancers showed low basal but highly IL-1-inducible p65 recruitment and thus most closely resembled the enhancer regions associated with the chemokine cluster shown in Figure 1 (Figure 3C). We therefore focused all further analysis on this subgroup of 410 IL-1-responsive enhancers. Compared to all expressed genes within the data set, the genes next to class II enhancers were regulated by IL-1 as assessed from our microarray and RNA-seq data sets (Figure 3D). Motif searches revealed that class II enhancers were enriched for binding sites for NF- κ B, E1f3/5, FEV, STAT3, SPI1, JunDM2, GCN4, and Fos (Figure 3E). Meta-profiles of the class II enhancers showed that basal and inducible H3K27ac was strongly enriched and was peaking symmetrically at regions immediately adjacent to inducible p65 binding sites (Figure 3F). Regions of p65 binding showed dips of H3K27ac and H3K4me1 marks, indicating the reduction in nucleosome density after p65 recruitment (Figure 3F). H3K27ac enhancer marks covered larger genomic regions after IL-1 stimulation, either due to reduced chromatin compaction or to increased spreading of histone modifications. In unstimulated cells the 410 class II enhancers extended from 400 to 1,500 bp (median of 644 bp), whereas IL-1 stimulation resulted in a further increase in median enhancer width to 1,109 bp (Figure 3G). Collectively, the data shown in Figures 2 and 3 identify a class of several hundred cytokine-inducible enhancers that are located upstream of the majority of all IL-1-regulated genes. Moreover, the data suggest that p65, in addition to its classical role in activating promoter-dependent transcription, plays a prominent role in the formation or regulation of these enhancer structures.

Genome-wide Regulation of IL-1-Inducible Enhancers by a TAK1-*IKK2*-Dependent Pathway

To identify the upstream signals involved in gene- and enhancer-specific recruitment of p65 NF- κ B, a central part of the IL-1-triggered signals was blocked by the cell-permeable ATP-competitive kinase inhibitor 5Z-7-oxozeaenol. This compound covalently binds to C174 within the ATP-binding pocket of TAK1, allowing fast inhibition of TAK1 enzymatic activity in cultured cells (Wu et al., 2013). 5Z-7-oxozeaenol blocked the vast majority of IL-1-inducible genes (Figure S3A; Table S2). The inhibitory effect on gene expression was almost complete,

as exemplified by heatmaps of the top-ranking IL-1-regulated genes (Figure S3B) and shown in Table S2. At the global chromatin level, 5Z-7-oxozeaenol affected only the recruitment of the IL-1-inducible group, but not the constitutive group of p65 peaks (Figure S3C). In line with this result, 5Z-7-oxozeaenol suppressed IL-1-inducible I κ B α phosphorylation as well as the inducible p65 nuclear translocation and S536 phosphorylation (Figures S4A and S4B, top). Accordingly, 5Z-7-oxozeaenol completely inhibited IL-1-inducible *IL8* and *CXCL2* mRNA expression, demonstrating the relevance of the TAK1 pathway for the regulation of the CXC chemokine locus (Figure S4C). Additionally, TAK1 controls further MAPK signaling. Thus, 5Z-7-oxozeaenol also suppressed inducible phosphorylation of JNK, p38, and c-Jun and the expression of c-Jun and c-Fos in a dose- and time-dependent manner (Figures S4D and S4E). Under these conditions, little effect of 5Z-7-oxozeaenol was seen on protein levels of ATF2, JunD, and JunB (Figures S4D and S4E). 5Z-7-oxozeaenol also inhibited autophosphorylation of TAK1 (Figures S4D and S4E), further indicating its specificity and suitability for suppression of TAK1-mediated signaling in human KB cells. ChIP-seq profiles illustrate that 5Z-7-oxozeaenol suppressed IL-1-inducible p65 recruitment, Pol II loading, and Pol II S5 phosphorylation and H3K27ac at all regions of the *IL8* and *CXCL2* loci, whereas no effects on H3K4me1 were seen (Figure 4A). Moreover, 5Z-7-oxozeaenol inhibited IL-1-inducible p65 recruitment and H3K27ac across the 410 class II enhancers but had no effect on all 35,130 enhancers (Figure 4B). Because TAK1 is an upstream regulator of *IKK2* (Zhang et al., 2014), it was interesting to test the consequences of *IKK2* inhibition for IL-1-induced global p65-dependent enhancer activation. The specific *IKK2* inhibitor PHA-408 (Mbalaviele et al., 2009) inhibited IL-1-inducible I κ B α phosphorylation and *IL8* and *CXCL2* mRNA induction in both HeLa cells (data not shown) and KB cells (Figure 4C). Similar to 5Z-7-oxozeaenol, the compound inhibited inducible phosphorylation and nuclear translocation of p65 (Figures S4A and S4B, bottom). Under these conditions, PHA-408 suppressed inducible H3K27ac across the 410 class enhancers (Figure 4D). Collectively, these data therefore suggest that a TAK1-*IKK2* pathway plays a direct and specific role in IL-1-inducible enhancer activation.

Identification of p65 as a Cytokine-Inducible Priming Factor for Enhancer Activation Downstream of TAK1 and *IKK2*

These results raised the question whether, downstream of TAK1 and *IKK2*, p65 recruitment was a cause or consequence of enhancer activation. Small hairpin RNA (shRNA)-mediated depletion of p65 in HeLa cells, which are closely related to KB cells, prevented IL-1-induced expression of *IL8* and *CXCL2*, the two genes flanking the chemokine cluster on chromosome 4 (Figure 5A). Based on the ChIP-seq profiles, we then designed primer pairs to accurately cover the *IL8* and *CXCL2* flanking enhancers and promoters as well as negative control regions of both genes as shown schematically in Figure 5B. Three enhancer primer pairs per gene were used to detect the p65 peak or the adjacent maxima of H3K27ac or H3K4me1. Quantitative ChIP-PCR experiments were performed to determine p65 recruitment, deposition of constitutive and IL-1-inducible H3K27ac and H3K4me1

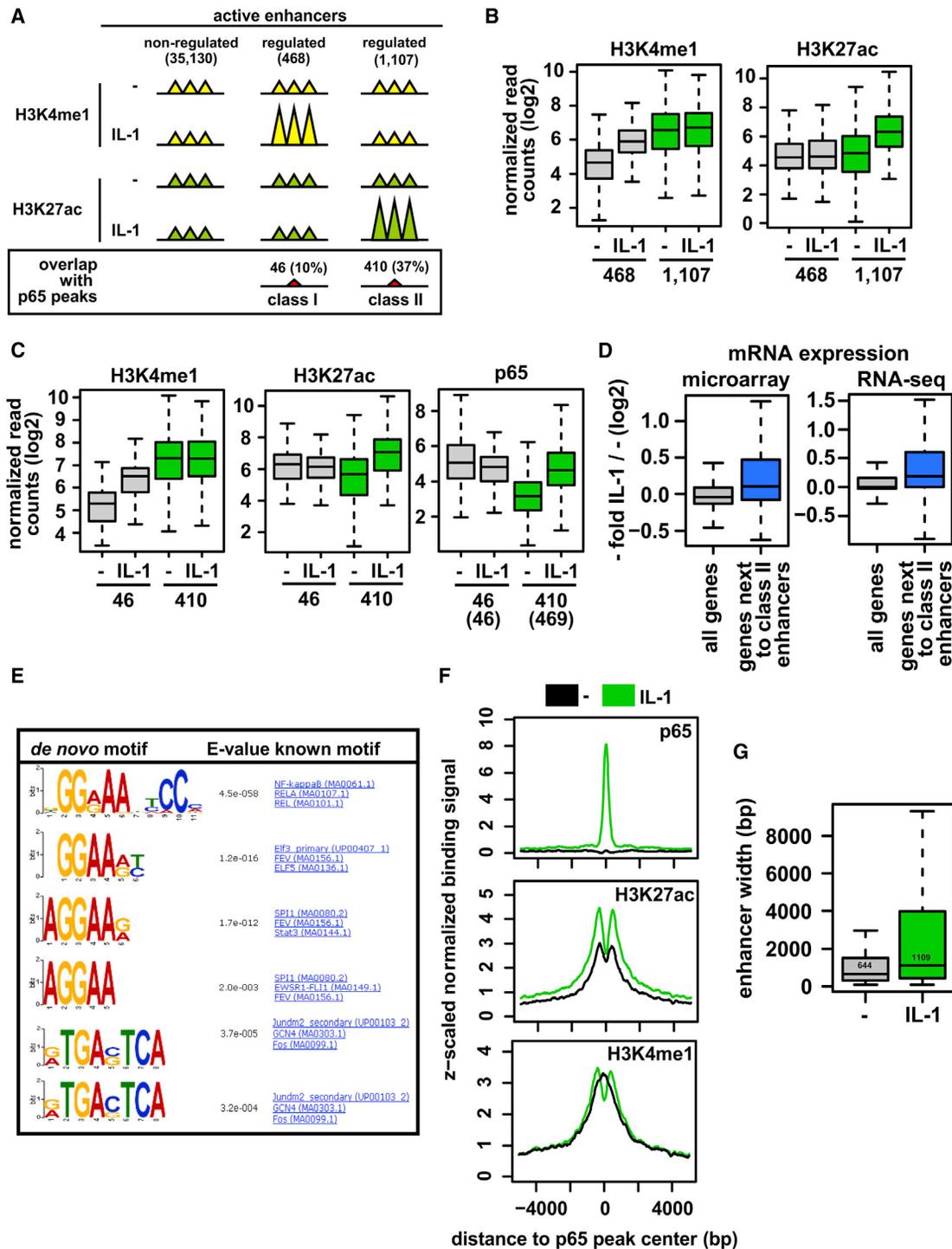


Figure 3. Genome-wide Identification of IL-1-Regulated Enhancers

(A) Schematic display of three types of active enhancers identified in KB cells by parallel occurrence of H3K4me1 and H3K27ac marks. The 46 class I and 410 class II enhancers differ by their IL-1-mediated regulation of H3K4me1 or H3K27ac, respectively, and by the additional presence of p65 binding sites.

(B and C) ChIP-seq data were used to calculate the signals for IL-1-regulated enhancers (B) or for the class I and class II enhancers (C). Numbers in brackets indicate the total number of p65 peaks detected in class I or class II enhancers (C).

(D) The mean regulation of gene expression by IL-1 for all genes and for genes next to the 410 class II enhancers is shown. Data were calculated from microarray data ($p = 1.29 \times 10^{-24}$) and from RNA-seq experiments ($p = 1.51 \times 10^{-17}$).

(E) De novo motif searches and correlation with known motifs for all 410 class II enhancers.

(legend continued on next page)

histone marks, histone H3 density, and Pol II recruitment at the enhancers and promoters of *IL8* and *CXCL2* (Figure 5C, top). Depletion of p65 not only resulted in the absence of enhancer and promoter recruitment of this factor, but also prevented RNA Pol II loading (Figure 5C, top). Moreover, basal and IL-1-inducible H3K27 acetylation was strongly impaired in the absence of p65, whereas H3K4me1 remained largely unchanged (Figure 5C, top). IL-1 treatment also resulted in a reduction of H3 density at the *IL8* and *CXCL2* promoters, which is an indication of reduced chromatin compaction (Figure 5C, top). Suppression of p65 counteracted IL-1 triggered chromatin decompaction (Figure 5C, top), indicating that p65 is controlling not only histone modifications, but also nucleosome density. The relevance of p65 for inducible H3K27ac was also seen for other arbitrarily selected class II enhancers (Figures S5A and S5B), showing the general contribution of this transcription factor for IL-1-regulated H3K27ac. By qPCR, the importance of IKK2 and TAK1 for IL-1-induced p65 recruitment and H3K27ac at the *IL8* and *CXCL2* loci was also revealed in KB cells pretreated either with PHA-408 (Figure 5C, bottom) or 5Z-7-oxozeaenol (Figure S6A). The critical contribution of TAK1 to inducible p65 binding, H3K27ac, and chemokine gene expression was confirmed in an independent experimental approach after shRNA-mediated downregulation of TAK1 expression (Figures S6B and S6C). Collectively, the results displayed in Figures 4 and 5 show how the TAK1-IKK2-p65 pathway relays cytosolic signals to chromatin modifications in order to mediate coordinated enhancer and promoter activation of IL-1 target genes.

The TAK1-p65 Pathway Primes and Coordinates Recruitment of Additional Factors at IL-1-Inducible Enhancers and Promoters

We then thought to unravel the kinetics of proteins assembling in addition to p65 at enhancers and promoters of the *IL8* and *CXCL2* loci downstream of TAK1 in more detail. We determined the recruitment kinetics of the TFs c-Fos, JunD, c-Jun, ATF2, and FRA1 that are known to recognize AP-1 sites as those found by the motif searches and of the histone acetyl transferase cofactor CBP. Several of these factors had already been implicated in *IL8* or *CXCL2* gene regulation (Hoffmann et al., 2005). All TFs and CBP bound to *IL8* and *CXCL2* at promoters but also to the enhancers (Figures 6A and 6B). These recruitments were specific according to the low signals in immunoglobulin G controls (Figures 6A and 6B) and to lack of binding of any of these factors to the negative control region upstream of the *IL8* promoter (Figures S7A and S7B), which as shown in Figure 5B lacks H3K27ac and H3K4me1 histone modifications. According to their kinetics of recruitment, we assigned these factors to three groups. Group 1 comprises p65, c-Fos, and CBP, because they showed no significant constitutive binding, a peak of recruitment at 1 hr, and an almost complete removal from promoters and enhancers after 6 hr of stimulation (Figures 6A and 6B). Group 2 consists of JunD and c-Jun, which showed consti-

tutive binding that was increased after 1 hr of IL-1 treatment and incomplete removal from chromatin at later time points (Figures 6A and 6B). Group 3 contains ATF2 and FRA1, which showed constitutive binding that was further increased with a delayed kinetics at 3 hr of stimulation and also incomplete removal from promoters and enhancers after prolonged IL-1 stimulation (Figures 6A and 6B). Additional experiments showed that P(S5)-Pol II binding most closely mirrored the sharp recruitment profile of p65 and occurred only at *IL8* and *CXCL2* promoters but not at the enhancers (Figures 6A and 6B). Interestingly, p65 recruitment was already detectable between 10 and 20 min at *IL8* and *CXCL2* promoters and occurred with a delay at both chemokine enhancers (Figures 6A and 6B). In contrast, there was no difference in the kinetics of p65 removal from the *IL8* and *CXCL2* promoters/enhancers (Figures 6A and 6B). Although this effect is relatively small, this observation would be consistent with a model where p65 binds first to the promoter regions of both chemokine loci and subsequently coordinates additional formation of the promoter/enhancer platforms, perhaps by CBP-mediated progressive acetylation at H3K27. Then, we asked which of these events were under control of TAK1. As shown in Figures 6C and 6D, 5Z-7-oxozeaenol blocked in all cases the IL-1-inducible recruitment of p65 and AP-1 factors and had little if any effect on constitutive chromatin binding of these transcription factors. To investigate a possible role of p65 for IL-1-triggered recruitment of AP-1 family members, p65 knockdown cells were used. Between 15 and 60 min of IL-1-stimulation, p65 knockdown did not affect activation of p38, JNK, or the total expression levels of c-Fos and JunD, two AP-1 proteins that bind to promoters and enhancers of *IL8* and *CXCL2* loci in KB and HeLa cells (Figure 7A). Like in KB cells, c-Fos protein expression and chromatin loading was highly IL-1-inducible, whereas the constitutively expressed JunD protein displayed basal but also IL-1-inducible recruitment to the *IL8* and *CXCL2* loci (Figures 7A and 7B). Knockdown of p65 prevented the inducible recruitment of c-Fos, JunD, CBP, and P(S5)-Pol II to the *IL8* and *CXCL2* loci (Figure 7B). In addition, interference with p65 expression also resulted in impaired recruitment of its heterodimeric partner p50 NF- κ B (Figure 7B). In contrast, knockdown of c-Fos or JunD, which was sufficient to suppress their own chromatin recruitment had no effect on inducible p65 binding (Figure S7C), thus identifying p65 as a master transcription factor of inflammatory enhancer activation. Furthermore, knockdown of c-Fos or JunD resulted only in slightly impaired IL-1-induced expression of *IL8* or *CXCL2* mRNAs (Figure 7C). These data indicate that p65 is essential for the assembly of TF collectives and additional cofactors at both promoters and enhancers. The data obtained by the quantitative ChIP-PCR analyses of the *IL8* and *CXCL2* genomic loci in the various knockdown cells or in cells treated with kinase inhibitors were then normalized and integrated to obtain a comprehensive view on the IL-1-triggered signaling events at the chromatin level. These summarizing analyses corroborate the conclusion that IL-1-inducible H3K27ac is primarily regulated through the

(F) p65 peaks of all 410 class II enhancers were centered and meta-profiles for H3K27ac and H3K4me1 were compiled from IL-1-treated cells or from untreated cells across 8 kb of adjacent genomic sequences.

(G) The distribution of enhancer widths of untreated and IL-1-induced class II enhancers was calculated ($p = 0.002$).

See Table S3 for statistics for Figures 3B and 3C.

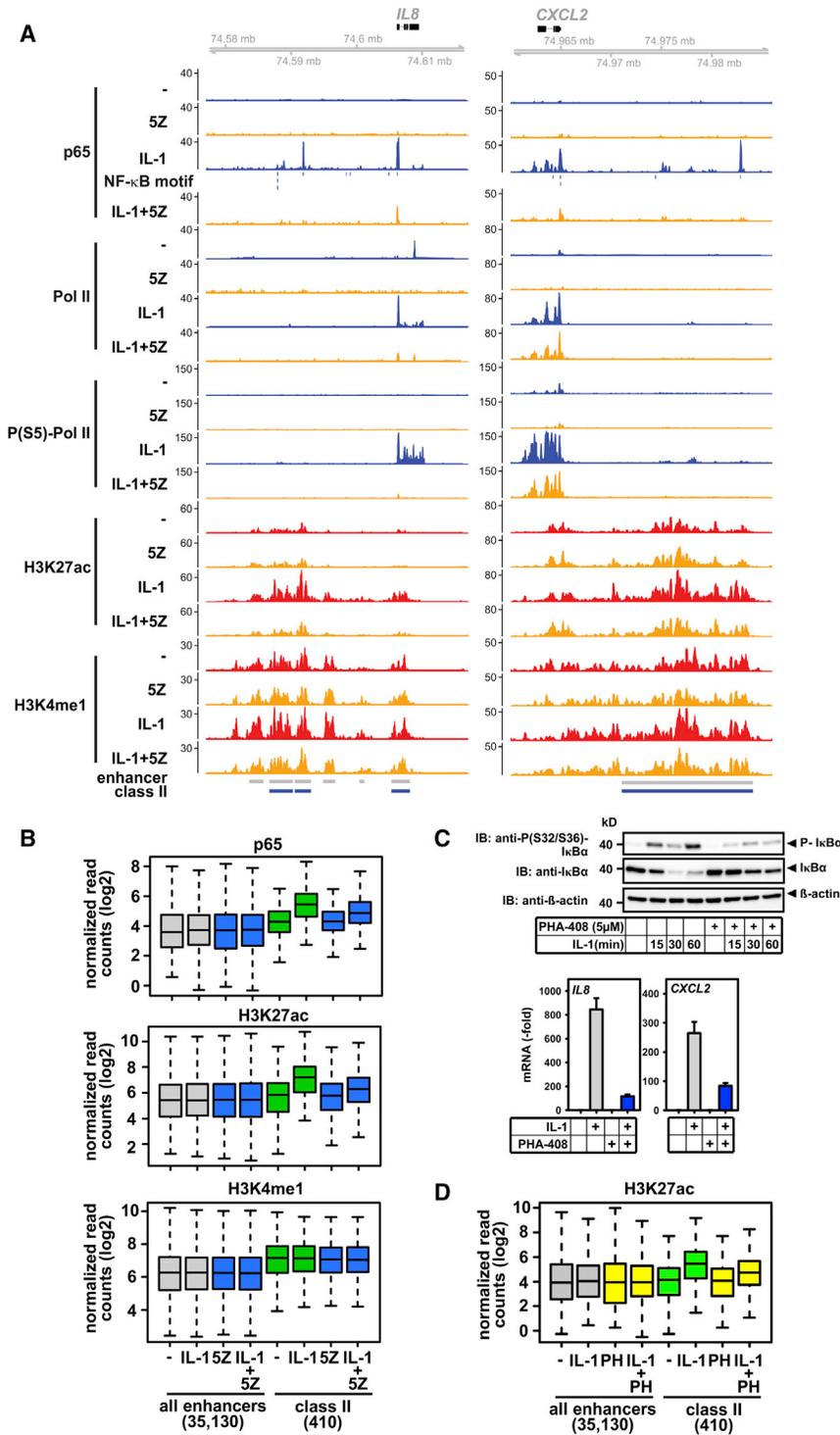


Figure 4. The Activation of IL-1-Regulated Enhancers Is TAK1 and IKK2 Dependent

(A) KB cells were left untreated or were treated for 30 min with the TAK1 inhibitor 5Z-7-oxozeaenol (5Z, 1 μ M), with IL-1 for 1 hr or with 5Z-7-oxozeaenol followed by IL-1 (IL-1 + 5Z). Then ChIP-seq experiments were performed using the antibodies shown in Figure 1. Profiles for the *IL8* and *CXCL2* loci are shown; yellow colors indicate samples from cells treated with 5Z-7-oxozeaenol. The presence of NF- κ B motifs is indicated by vertical lines underneath the p65 panels. Gray or blue bars indicate genomic areas comprising H3K4me1 and H3K27ac-positive enhancers or class II enhancers, respectively.

(B) The mean signal intensities of p65 binding and histone modifications for all 35,130 enhancers and all 410 class II enhancers were calculated for all conditions described in (A).

(C) KB cells were treated for the indicated times with the IKK2 inhibitor PHA-408 (5 μ M) or with IL-1 in the indicated combinations. Top: the suppressive effects of PHA-408 on IKK activity and I κ B α breakdown were assessed by immunoblotting of whole-cell extracts using antibodies against the phosphorylated and unphosphorylated forms of I κ B α . β -actin amounts were determined to control for equal loading. Bottom: in parallel, cells were treated with IL-1 for 1 hr or with PHA-408 (5 μ M) as indicated and mRNA expression of *IL8* or *CXCL2* was quantified by RT-qPCR. Shown is the mean fold regulation \pm SEM from three independent experiments.

(D) KB cells were treated with vehicle (-, DMSO), IL-1 for 1 hr, or PHA-408 (PH, 5 μ M) or combinations of IL-1 and PHA-408 as indicated, and ChIP-seq experiments were performed and analyzed as described in (B) using antibodies against H3K27ac. See Table S3 for statistics for Figures 4B and 4D. See also Figures S3 and S4 and Table S2.

DISCUSSION

Sterile, cytokine-driven inflammation is the underlying cause of numerous diseases such as rheumatoid arthritis, psoriasis, or gout (Chen and Nuñez, 2010). It has long been known that deregulated gene expression is a hallmark of all inflammatory processes (Bhatt et al., 2012; Medzhitov and Horng, 2009; Hao and Baltimore, 2009). The receptors and cytosolic pathways orchestrating inflammatory gene expression have been studied in considerable detail (Gaestel et al.,

2009). However, how these pathways transduce their information to chromatin is not well understood. Here, we identify a large number of IL-1-inducible enhancers and their signal-mediated regulation in epithelial cells. The starting point of our study was the discovery of two enhancer regions flanking a cluster of four highly regulated CXC chemokine genes.

2009). However, how these pathways transduce their information to chromatin is not well understood.

Here, we identify a large number of IL-1-inducible enhancers and their signal-mediated regulation in epithelial cells. The starting point of our study was the discovery of two enhancer regions flanking a cluster of four highly regulated CXC chemokine genes.

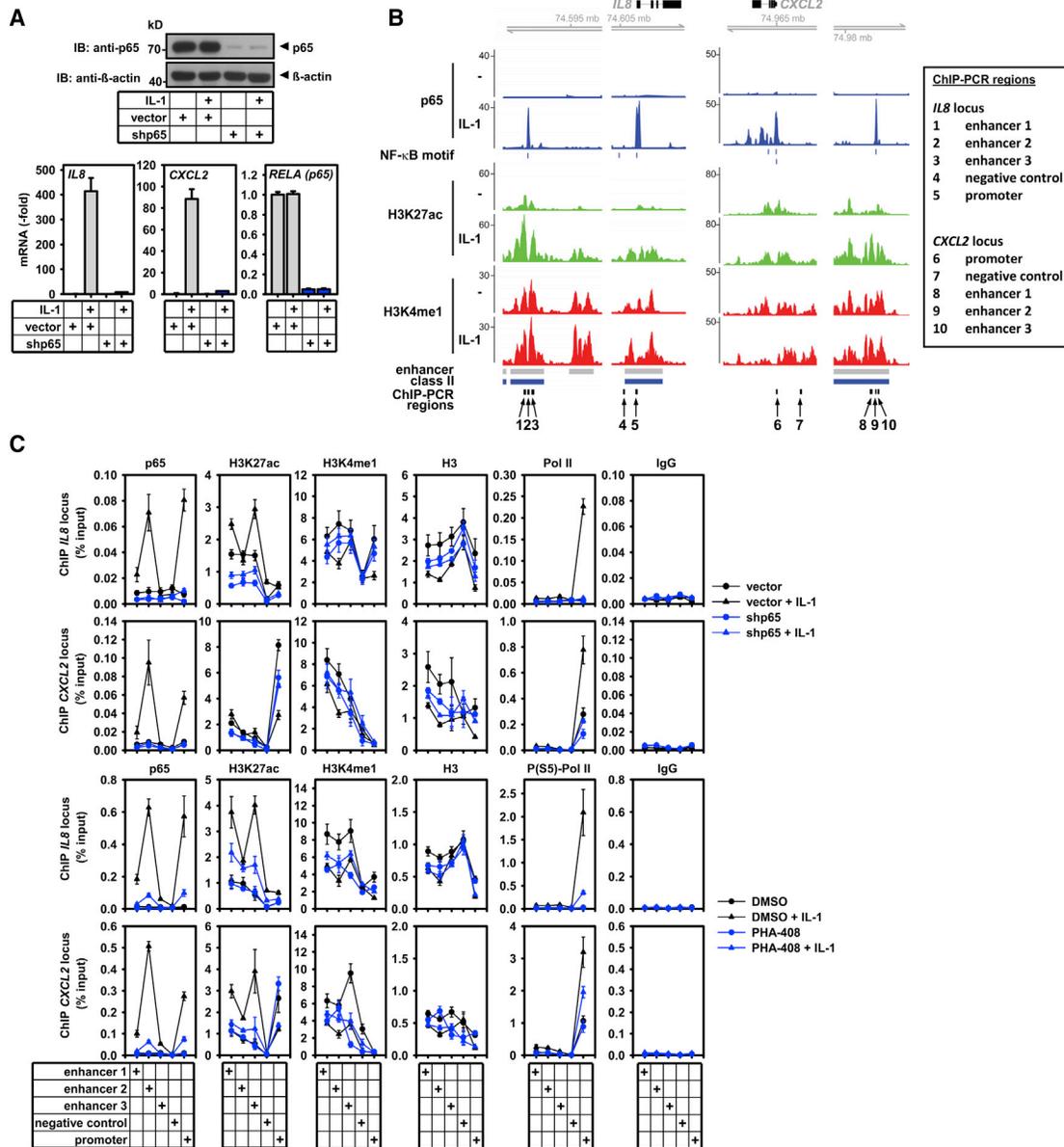


Figure 5. Essential Role of the NF- κ B p65 Pathway in Enhancer Acetylation and Transcription of CXC Chemokine Genes

(A) HeLa cells were transfected with a plasmid vector directing the expression of a shRNA targeting p65 (shp65) or with empty pSuper-Puro. After 2 day selection in puromycin, cells were stimulated with IL-1 for 1 hr or were left untreated. Protein expression of p65 was examined by immunoblots (top) and mRNA expression of *IL8*, *CXCL2*, and *RELA* (p65) by RT-qPCR (bottom). Shown are mean fold changes \pm SEM from two independent experiments performed in duplicates.

(B) Zoomed-in ChIP-seq profiles for IL-1 regulated chromatin modifications at H3K27ac and H3K4me1 as well as for p65 binding of the *IL8* and *CXCL2* loci. NF- κ B motifs, enhancer regions, and class II enhancers are shown by vertical lines or gray or blue bars, respectively. Numbers 1–10 and black bars indicate six enhancer regions, two promoter regions, and two negative control regions, which were analyzed in detail by subsequent quantitative ChIP-PCRs.

(C) Top: vector-transfected or p65 knockdown cells were stimulated for 1 hr with IL-1 or were left untreated. ChIP experiments across the enhancers (primer pairs, 1, 2, 3 for *IL8* and 8, 9, 10 for *CXCL2*) or promoters (primer pairs 5 and 6) or negative control regions (primer pairs 4 and 7) as shown in (B) were performed using the indicated antibodies. Bottom: the same analysis was performed using chromatin from KB cells treated with vehicle (DMSO), PHA-408 (5 μ M), or IL-1 (1 hr) in the indicated combinations. Shown are the mean values (% input) \pm SEM from at least two independent experiments performed in duplicates. See also Figures S4, S5, and S6.

In accordance with concurrent studies, we classified these enhancers as active genomic regions due to the simultaneous occurrence of H3K4me1 and H3K27ac marks and to the presence of CBP (Cao and Wysocka, 2013). However, there were

also specific features, in particular, the further, IL-1-dependent upregulation of H3K27ac but not H3K4me1 and the rapid, regulated recruitment of the p65 NF- κ B subunit. At the genome-wide level, we report more than 45,000 mostly intergenic p65 binding

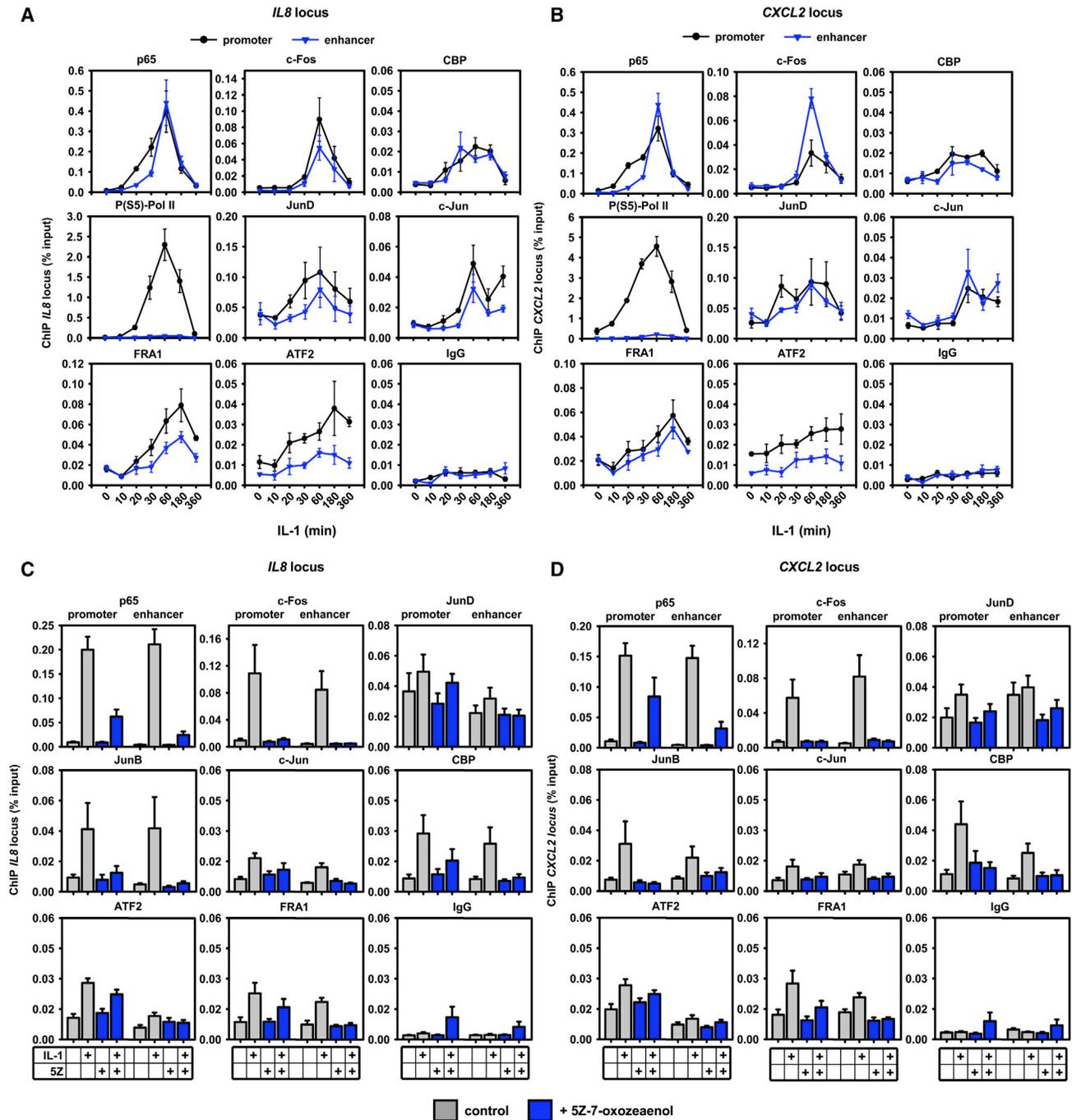


Figure 6. Kinetics and TAK1-Dependent Recruitment of p65 and AP-1 Factors to IL-1-Inducible Enhancers and Promoters

(A and B) KB cells were stimulated for the indicated times with IL-1 or were left untreated. ChIP-PCR experiments were performed using the indicated antibodies with primers covering the promoter or enhancer regions of the *IL8* locus (A) or the *CXCL2* locus (B) as schematically shown in Figure 5B.

(C and D) KB cells were treated for 30 min with the TAK1 inhibitor 5Z-7-oxozeanol (1 μ M) or with IL-1 for 1 hr at the indicated combinations. ChIP experiments were performed as in (A) and (B). The bars show the mean enrichment (% input) \pm SEM from at least two experiments performed in duplicates.

See also Figures S4 and S7.

sites. So far, p65 binding events have been mapped in several other cell types in response to TNF- α or LPS. Using lower resolution ChIP-Chip or ChIP-Pet techniques, 348 or 489 promoter-near p65 sites and 209 sites distributed at intergenic regions

across chromosome 22 were reported (Lim et al., 2007; Schreiber et al., 2006; Martone et al., 2003). In more recent deep sequencing studies, the numbers of p65 peaks ranged from 12,250 (dendritic cells) to 20,733 (A549 cells) (Jin et al.,

2013; Yang et al., 2013; Xing et al., 2013; Garber et al., 2012; Jin et al., 2011; Kasowski et al., 2010). Collectively, these data confirm initial estimates that occupied p65 NF- κ B sites are within a range of four orders of magnitude (Natoli et al., 2005). Thus, in these conditions less than 20% of the 300,000 κ B consensus motifs in the human genome are occupied by p65 (Jin et al., 2011). Our study describes one of the largest arrays of p65 sites currently available. The majority of p65 binding events occur constitutively in line with various studies reporting constitutively occurring nuclear p65 protein (Adli and Baldwin, 2006; Nelson et al., 2004; Birbach et al., 2002). Accordingly, a recent study mapped >20,000 constitutive and mainly intergenic p65 peaks in transformed B cells (Zhao et al., 2014). Our subcellular fractionation and high-resolution mapping experiments indicate that most of the nuclear p65 protein is contained within the soluble fraction and only small amounts are stably associated with chromatin. These observations indicate that not only the nuclear entry of p65 is a regulated event, but also the balance between free nuclear versus chromatin-associated p65. These mechanisms are likely to be locus specific and accordingly the p65 protein resides at constitutively occupied and IL-1-induced sites. The majority of p65 binding events occur at intergenic regions devoid of RNA polymerase II because two-thirds of 1,264 IL-1-regulated p65 peaks were localized >20 kb upstream of the next annotated gene. By combining these data with further ChIP-seq and mRNA expression analyses, we identified 410 enhancers, which were regulated by IL-1 at the level of p65 recruitment, H3K27 acetylation, enhancer width, and mRNA expression of neighboring genes. Thus, the genome-wide results resemble all of the features of the CXC chemokine cluster shown in Figure 1 and suggest that this group of enhancers has general relevance for IL-1-mediated gene regulation. Enhancers that display TNF- α -inducible H3K27ac have also been noted recently in fibroblasts, and it will be interesting to analyze if they overlap with class II enhancers described in our study (Jin et al., 2013). Because the correlation of enhancer marks with p65 occupancy does not prove the functional relevance of the enhancer structures for gene expression, we used kinase inhibitor and p65 knockdown experiments to reveal an essential role for the p65 subunit in enhancer activation and subsequent mRNA transcription at the CXC locus. These data provide strong evidence for p65 as a master regulator of IL-1-inducible H3K27ac. Occurrence of H3K4me1 was independent of p65, suggesting that IL-1-regulated signaling pathways recognize genomic regions that are already premarked as enhancers.

The molecular events connecting cytosolic signaling pathways with enhancer regulation are still incompletely understood (Calo and Wysocka, 2013; Pennacchio et al., 2013). Here, we identify the kinase TAK1 and its downstream kinase IKK2 as important regulators allowing cytokine-triggered chromatin modification. TAK1 and also IKK2 are essential components of the canonical NF- κ B pathway (Häcker and Karin, 2006). Inhibition of TAK1 or IKK2 kinase activities with specific small molecule inhibitors suppressed IL-1-induced p65 recruitment and H3K27ac at class II enhancers and accordingly also the IL-1-gene response. In-depth quantitative ChIP-PCR analyses of the CXC loci confirmed the genome-wide data and together with the p65 knockdown effects on enhancer acetylation place

a TAK1-IKK2-p65 pathway at the center of signal-mediated enhancer acetylation.

However, TAK1 inhibition will also interfere with IL-1-triggered MAPK signaling (Ninomiya-Tsuji et al., 1999). At the level of chromatin, 5Z-7-oxozeaenol impaired the IL-1-inducible and (to a lesser extent) the basal enhancer recruitment of c-Jun, JunD, JunB, ATF2, c-Fos, and FRA1 to the CXC chemokine locus. These data define a transcription factor collective that employs TAK1-derived signals to assemble at inflammatory enhancers. Motif searches within IL-1-inducible class II enhancers suggest that they are enriched for NF- κ B and AP-1 sites, whereby the motif arrangements; i.e., their relative order, orientation, and spacing, are relatively flexible (M.K. and M.B., unpublished data). Our experiments identify p65 as an essential component governing further TF binding events to these *cis* elements, because its absence precludes c-Fos and JunD binding as well as CBP recruitment and H3K27 acetylation. In contrast, suppression of JunD and c-Fos expression had little effect on p65-mediated enhancer activation, thus identifying a hierarchy among the transcription factors. Because AP-1 subunits do not serve as pioneering transcription factors, they presumably exert further functions such as the resolution of enhancer activation or shaping the kinetics of IL-1-mediated gene expression. Thus, the relative contribution of the individual AP-1 subunits downstream of TAK1 to enhancer activity and downstream gene activation remains to be determined.

These results raise the question on the mechanisms employed by the enhancer complexes to support inflammatory gene expression. Some enhancers transcribe regulatory RNAs that promote transcription from downstream protein-coding genes (Li et al., 2013; Simonatto et al., 2013). However, based on RNA-seq we did not detect RNA at the enhancers, and we also found only spurious amounts of RNA Pol II associated with the *IL8* and *CXCL2* enhancers. The enhancers of these two genes are located more than 400 kb apart, and their function might be to promote physical interactions by chromatin loopings. They may extend to the promoter regions of individual genes within the cluster, as suggested by the observation that the NF- κ B and AP-1 TF collective is also found at the *IL8* and *CXCL2* promoters. Additionally, they may contact regions on other chromosomes to form regulatory enhancer archipelagos by multiple long-range chromatin interactions (Spitz and Furlong, 2012; Montavon et al., 2011). Such inflammatory enhancer landscapes may synergize to provide the very robust and synchronized expression of canonical inflammatory genes as shown in Figure S1. Indeed, a recent study identified over a million long-range chromatin interactions at 5–10 kb resolution in TNF-stimulated cells (Jin et al., 2013). Thus, our data provide important clues for further studies directed toward the identification of signals that determine the 3D architecture of chromatin during IL-1-driven inflammation.

In summary, we report a time-dependent IL-1-inducible formation of enhancers, which can be viewed as an epigenetic amplifying or feedforward mechanism by which cells achieve the particularly strong and rapid gene expression responses that are typically observed in cytokine-stimulated cells. In the future, it will therefore be interesting to examine possible polymorphisms within the DNA-binding motifs or in the TF collective that we have identified within the enhancer peaks and subsequent alterations in the enhancer architecture. These changes

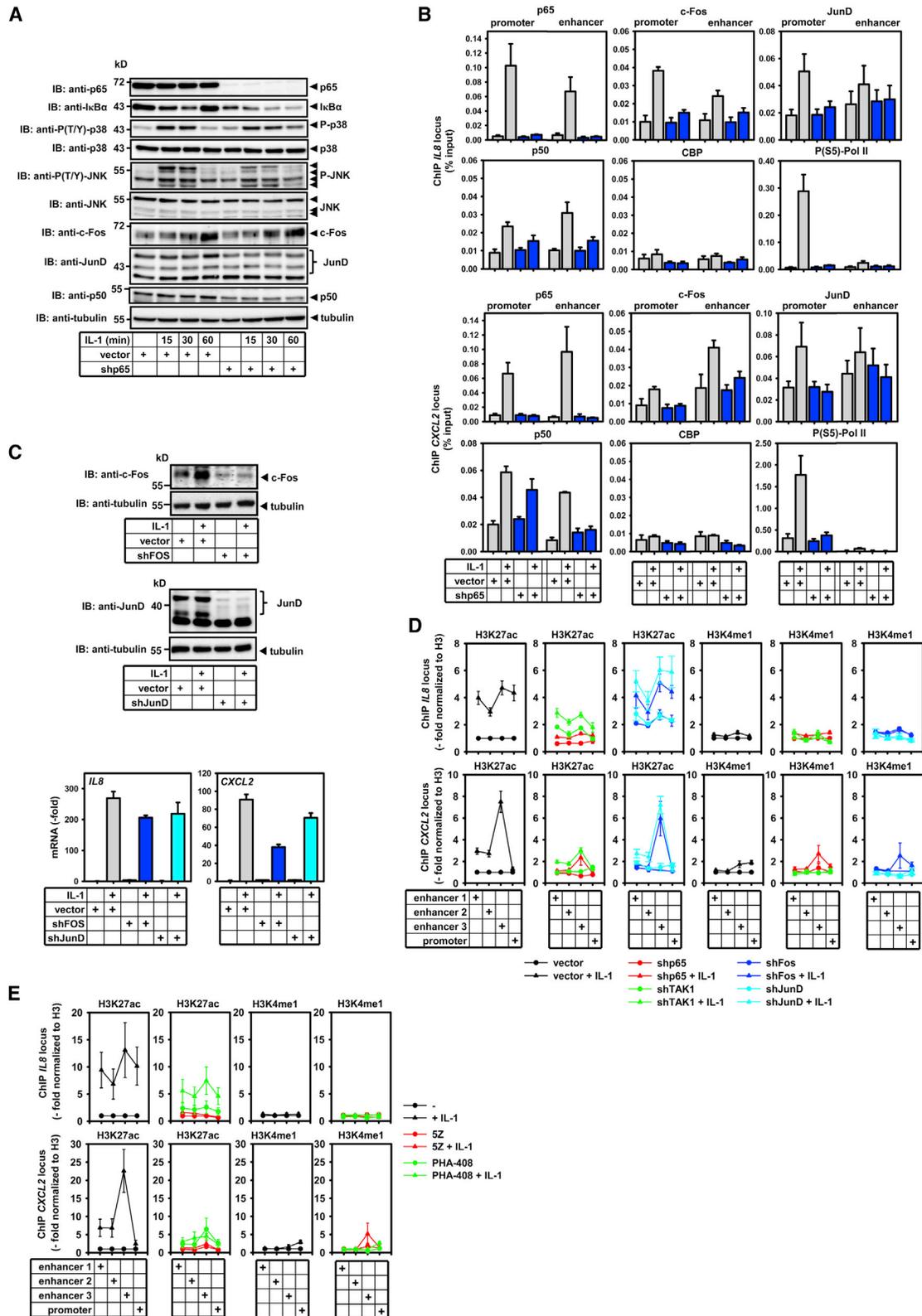


Figure 7. p65 Is Required for Recruitment of AP-1 Factors to Enhancers and Promoters

(A–C) HeLa cells were transfected with plasmids directing the expression of shRNAs targeting p65 (shp65), JunD (shJunD), c-Fos (shFos), or with empty pSuper-Puro (vector) as indicated. After 2 day selection in puromycin, cells were stimulated with IL-1 for 1 hr or were left untreated. (A) Activation of NF- κ B, JNK, and p38 (legend continued on next page)

could also account for chronically ongoing expression of proinflammatory genes in inflammatory diseases.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Lines and Materials

HeLa and KB human epithelial carcinoma cell lines have been described (Handschock et al., 2014; Hoffmann et al., 2005). Recombinant human IL-1 α was used at 10 ng/ml in all experiments. 5Z-7-oxozeaenol was from Tocris Bioscience; PHA-408 was from Axon Medchem.

Plasmids and Transfections of Cell Lines

shRNA constructs for p65 (Handschock et al., 2014), JunD, c-Fos, and TAK1 were prepared in pSuper-Puro or pLKO.1 (shTAK1) backbones. HeLa cells were transiently transfected by the calcium phosphate method and were selected for 48–96 hr with 1 μ g/ml puromycin.

Cell Lysis and Immunodetection of Proteins

Whole-cell extracts, cytosolic, soluble nuclear, and insoluble nuclear extracts were prepared and used for immunoblotting as described (Handschock et al., 2014).

Gene Expression Measurements

All mRNA measurements were performed by RT-qPCR, by Agilent microarrays or by RNA-seq with total RNA as described (Handschock et al., 2014).

Chromatin Immunoprecipitation and PCR

ChIP was performed from formaldehyde crosslinked cells, and DNA was quantified by real-time PCR with SYBR Green as described previously in detail (Handschock et al., 2014).

Deep Sequencing of Nucleic Acids

Sequencing libraries were prepared and analyzed using Illumina reagents and an Illumina HiSeq2500 machine.

ChIP-Seq, RNA-Seq, and Microarray Analyses and Data Visualization

Conversion and alignment of ChIP-seq and RNA-seq reads to the hg19 reference genome followed standard procedures. Visualization of binding profiles, enhancer analyses, motif searches, and data analyses of microarray experiments are described in the Supplemental Information. Statistics for all meta-analyses were calculated using the Wilcoxon signed rank test. In all box plots, black lines indicate medians, boxes the lower and upper quartiles (25% and 75%), and whiskers the minimum and maximum values.

ACCESSION NUMBERS

Microarray, RNA-seq, and ChIP-seq data have been deposited in the NCBI GEO under accession number GSE64224. All ChIP-seq experiments were per-

formed from cell-culture samples generated in parallel, but selected H3K9ac, Pol II, and p65 ChIP-seq data from untreated and IL-1-treated KB cells have been previously published, and the data sets have been deposited to the GEO under accession number GSE52470.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, seven figures, and three tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.001>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.J., J.S., and K.H. designed and performed experiments and analyzed the data. M.B. analyzed ChIP-seq and RNA-seq data. H.M., D.N., H.S., and V.V.S. performed experiments. A.W. O.D.-B. supervised and analyzed microarray experiments. S.B. performed Illumina sequencing. M.L.S. wrote the manuscript. M.K. supervised the project, designed experiments, analyzed data, conceived, and wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Michael Jarek at the Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany for support with the ChIP-seq and RNA-seq services. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft Kr1143/7-1, SCHM 1417/8-1, TRR81 (B2), and TRR81 (Z01).

Received: May 30, 2014

Revised: November 13, 2014

Accepted: December 26, 2014

Published: February 5, 2015

REFERENCES

- Adli, M., and Baldwin, A.S. (2006). IKK- ϵ /IKK ζ controls constitutive, cancer cell-associated NF- κ B activity via regulation of Ser-536 p65/RelA phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 281, 26976–26984.
- Aksentijevich, I., Masters, S.L., Ferguson, P.J., Dancy, P., Frenkel, J., van Royen-Kerkhoff, A., Laxer, R., Tedgård, U., Cowen, E.W., Pham, T.H., et al. (2009). An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist. *N. Engl. J. Med.* 360, 2426–2437.
- Bhatt, D.M., Pandya-Jones, A., Tong, A.J., Barozzi, I., Lissner, M.M., Natoli, G., Black, D.L., and Smale, S.T. (2012). Transcript dynamics of proinflammatory genes revealed by sequence analysis of subcellular RNA fractions. *Cell* 150, 279–290.
- Birbach, A., Gold, P., Binder, B.R., Hofer, E., de Martin, R., and Schmid, J.A. (2002). Signaling molecules of the NF- κ B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.* 277, 10842–10851.

MAPK pathways or expression of NF- κ B subunits or AP-1 proteins was analyzed in p65 knockdown or control cells stimulated for various times with IL-1 by immunoblotting of whole-cell extracts using the indicated antibodies. Equal loading was confirmed using antibodies against tubulin. Shown is one out of three experiments. (B) Control cells or p65 knockdown cells (shp65) were stimulated for 1 hr with IL-1 or were left untreated. ChIP-PCR experiments were performed using the indicated antibodies with primers covering the promoter or enhancer regions of the *IL8* locus (top) or the *CXCL2* locus (bottom) as schematically shown in Figure 5B. The bars show the mean enrichment (% input) \pm SEM from at least two experiments performed in duplicates. (C) c-Fos or JunD knockdown or control cells were stimulated with IL-1 for 1 hr or were left untreated. Knockdowns were validated by immunoblotting (top) and mRNA expression of *IL8* or *CXCL2* was determined by RT-qPCR (bottom). Shown are mean fold changes \pm SEM from three (JunD) or two (c-Fos) independent experiments performed in duplicates. (D) ChIP-PCR data covering the *IL8* and *CXCL2* enhancer and promoter regions from all HeLa cell knockdown experiments (Figures 5C, S6C, and S7C) were pooled, measurements of H3K27ac and H3K4me1 were normalized to H3 levels, and IL-1-regulated changes were calculated as fold changes relative to vector-transfected control cells. One data point for the *CXCL2* locus shown in Figure S7C (shFos ChIP-PCR 3) was omitted due to very low H3 signals, which resulted in misleadingly high ratio values. Shown are the mean changes \pm SEM from ten (vector controls), three (shTAK1 and shJunD), or two (shp65 and shFos) independent experiments.

(E) Changes in H3 modifications were calculated as in (D) for all experiments using TAK1 (5Z) or IKK2 (PHA-408) inhibitors in KB cells as shown in Figure 5C (bottom) and in Figure S6A. Shown are the mean changes \pm SEM from combining four independent experiments for controls and two experiments for each inhibitor.

See also Figure S7.

- Calo, E., and Wysocka, J. (2013). Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Mol. Cell* 49, 825–837.
- Chen, G.Y., and Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 826–837.
- Dinarello, C.A., Simon, A., and van der Meer, J.W. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 633–652.
- Flintoft, L. (2013). Gene regulation: Enhancing the hunt for enhancers. *Nat. Rev. Genet.* 14, 151.
- Gaestel, M., Kotlyarov, A., and Kracht, M. (2009). Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 480–499.
- Garber, M., Yosef, N., Goren, A., Raychowdhury, R., Thielke, A., Guttman, M., Robinson, J., Minie, B., Chevrier, N., Itzhaki, Z., et al. (2012). A high-throughput chromatin immunoprecipitation approach reveals principles of dynamic gene regulation in mammals. *Mol. Cell* 47, 810–822.
- Ghisletti, S., and Natoli, G. (2013). Deciphering cis-regulatory control in inflammatory cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 368, 20120370.
- Häcker, H., and Karin, M. (2006). Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci. STKE* 2006, re13.
- Handschiek, K., Beuerlein, K., Jurida, L., Bartkuhn, M., Müller, H., Soelch, J., Weber, A., Dittrich-Breiholz, O., Schneider, H., Scharfe, M., et al. (2014). Cyclin-dependent kinase 6 is a chromatin-bound cofactor for NF- κ B-dependent gene expression. *Mol. Cell* 53, 193–208.
- Hao, S., and Baltimore, D. (2009). The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Nat. Immunol.* 10, 281–288.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* 132, 344–362.
- Hoffmann, E., Thiefes, A., Buhrow, D., Dittrich-Breiholz, O., Schneider, H., Resch, K., and Kracht, M. (2005). MEK1-dependent delayed expression of Fos-related antigen-1 counteracts c-Fos and p65 NF- κ B-mediated interleukin-8 transcription in response to cytokines or growth factors. *J. Biol. Chem.* 280, 9706–9718.
- Jin, F., Li, Y., Ren, B., and Natarajan, R. (2011). PU.1 and C/EBP(alpha) synergistically program distinct response to NF- κ B activation through establishing monocyte specific enhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 5290–5295.
- Jin, F., Li, Y., Dixon, J.R., Selvaraj, S., Ye, Z., Lee, A.Y., Yen, C.A., Schmitt, A.D., Espinoza, C.A., and Ren, B. (2013). A high-resolution map of the three-dimensional chromatin interactome in human cells. *Nature* 503, 290–294.
- Kasowski, M., Grubert, F., Heffelfinger, C., Hariharan, M., Asabere, A., Waszak, S.M., Habegger, L., Rozowsky, J., Shi, M., Urban, A.E., et al. (2010). Variation in transcription factor binding among humans. *Science* 328, 232–235.
- Li, W., Notani, D., Ma, Q., Tanasa, B., Nunez, E., Chen, A.Y., Merkurjev, D., Zhang, J., Ohgi, K., Song, X., et al. (2013). Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation. *Nature* 498, 516–520.
- Lim, C.A., Yao, F., Wong, J.J., George, J., Xu, H., Chiu, K.P., Sung, W.K., Lipovich, L., Vega, V.B., Chen, J., et al. (2007). Genome-wide mapping of RELA(p65) binding identifies E2F1 as a transcriptional activator recruited by NF- κ B upon TLR4 activation. *Mol. Cell* 27, 622–635.
- Martone, R., Euskirchen, G., Bertone, P., Hartman, S., Royce, T.E., Luscombe, N.M., Rinn, J.L., Nelson, F.K., Miller, P., Gerstein, M., et al. (2003). Distribution of NF- κ B-binding sites across human chromosome 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 12247–12252.
- Mbalaviele, G., Sommers, C.D., Bonar, S.L., Mathialagan, S., Schindler, J.F., Guzova, J.A., Shaffer, A.F., Melton, M.A., Christine, L.J., Tripp, C.S., et al. (2009). A novel, highly selective, tight binding I κ B kinase-2 (IKK-2) inhibitor: a tool to correlate IKK-2 activity to the fate and functions of the components of the nuclear factor- κ B pathway in arthritis-relevant cells and animal models. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 329, 14–25.
- Medzhitov, R., and Horng, T. (2009). Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 692–703.
- Montavon, T., Soshnikova, N., Mascrez, B., Joye, E., Thevenet, L., Splinter, E., de Laat, W., Spitz, F., and Duboule, D. (2011). A regulatory archipelago controls Hox genes transcription in digits. *Cell* 147, 1132–1145.
- Natoli, G., Saccani, S., Bosisio, D., and Marazzi, I. (2005). Interactions of NF- κ B with chromatin: the art of being at the right place at the right time. *Nat. Immunol.* 6, 439–445.
- Nelson, D.E., Ihekwaba, A.E., Elliott, M., Johnson, J.R., Gibney, C.A., Foreman, B.E., Nelson, G., See, V., Horton, C.A., Spiller, D.G., et al. (2004). Oscillations in NF- κ B signaling control the dynamics of gene expression. *Science* 306, 704–708.
- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., and Matsumoto, K. (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I κ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398, 252–256.
- Ostuni, R., Piccolo, V., Barozzi, I., Polletti, S., Termanini, A., Bonifacio, S., Curina, A., Prosperini, E., Ghisletti, S., and Natoli, G. (2013). Latent enhancers activated by stimulation in differentiated cells. *Cell* 152, 157–171.
- Pennacchio, L.A., Bickmore, W., Dean, A., Nobrega, M.A., and Bejerano, G. (2013). Enhancers: five essential questions. *Nat. Rev. Genet.* 14, 288–295.
- Perkins, N.D. (2012). The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12, 121–132.
- Sakurai, H. (2012). Targeting of TAK1 in inflammatory disorders and cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 522–530.
- Sakurai, H., Miyoshi, H., Toriumi, W., and Sugita, T. (1999). Functional interactions of transforming growth factor beta-activated kinase 1 with I κ B kinases to stimulate NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* 274, 10641–10648.
- Schmitz, M.L., Weber, A., Roxlau, T., Gaestel, M., and Kracht, M. (2011). Signal integration, crosstalk mechanisms and networks in the function of inflammatory cytokines. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 2165–2175.
- Schreiber, J., Jenner, R.G., Murray, H.L., Gerber, G.K., Gifford, D.K., and Young, R.A. (2006). Coordinated binding of NF- κ B family members in the response of human cells to lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 5899–5904.
- Shaulian, E., and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 4, E131–E136.
- Shen, Y., Yue, F., McCleary, D.F., Ye, Z., Edsall, L., Kuan, S., Wagner, U., Dixon, J., Lee, L., Lobanenkov, V.V., and Ren, B. (2012). A map of the cis-regulatory sequences in the mouse genome. *Nature* 488, 116–120.
- Simonatto, M., Barozzi, I., and Natoli, G. (2013). Non-coding transcription at cis-regulatory elements: computational and experimental approaches. *Methods* 63, 66–75.
- Spitz, F., and Furlong, E.E. (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat. Rev. Genet.* 13, 613–626.
- Weber, A., Wasiliew, P., and Kracht, M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci. Signal.* 3, cm1.
- Wu, J., Powell, F., Larsen, N.A., Lai, Z., Byth, K.F., Read, J., Gu, R.F., Roth, M., Toader, D., Saeh, J.C., and Chen, H. (2013). Mechanism and in vitro pharmacology of TAK1 inhibition by (5Z)-7-Oxozeaenol. *ACS Chem. Biol.* 8, 643–650.
- Xing, Y., Yang, Y., Zhou, F., and Wang, J. (2013). Characterization of genome-wide binding of NF- κ B in TNF α -stimulated HeLa cells. *Gene* 526, 142–149.
- Yang, J., Mitra, A., Dojer, N., Fu, S., Rowicka, M., and Brasier, A.R. (2013). A probabilistic approach to learn chromatin architecture and accurate inference of the NF- κ B/RelA regulatory network using ChIP-Seq. *Nucleic Acids Res.* 41, 7240–7259.
- Zhang, J., Clark, K., Lawrence, T., Peggie, M.W., and Cohen, P. (2014). An unexpected twist to the activation of IKK β : TAK1 primes IKK β for activation by autophosphorylation. *Biochem. J.* 461, 531–537.
- Zhao, B., Barrera, L.A., Ersing, I., Willox, B., Schmidt, S.C., Greenfield, H., Zhou, H., Mollo, S.B., Shi, T.T., Takasaki, K., et al. (2014). The NF- κ B genomic landscape in lymphoblastoid B cells. *Cell Rep.* 8, 1595–1606.
- Zhu, J., Adli, M., Zou, J.Y., Verstappen, G., Coyne, M., Zhang, X., Durham, T., Miri, M., Deshpande, V., De Jager, P.L., et al. (2013). Genome-wide chromatin state transitions associated with developmental and environmental cues. *Cell* 152, 642–654.