Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Epigenetische Mechanismen der IL-4-vermittelten Induktion des μ-Opiat-Rezeptor-Gens in T-Lymphozyten

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med.
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Lienhard Lehmann
aus Dresden
Magdeburg 2016

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Lehmann, Lienhard:
„Epigenetische Mechanismen der IL-4-vermittelten Induktion des µ-Opiat-Rezeptor-Gens in T-Lymphozyten.“ - 2016. - 63 Bl., 17 Abb.

Kurzreferat

Opioide besitzen ein komplexes Wirkspektrum. Neben Analgesie, Sedierung und Atemdepression rückt dabei die Immunmodulation immer stärker in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Die Wirkung der Opioide auf das Immunsystem wird im Wesentlichen über den µ-Opiat-Rezeptor vermittelt. Dessen Expression wird in ruhenden T-Zellen normalerweise unterdrückt, kann aber durch IL-4 stimuliert werden. Die intrazelluläre Signalkaskade, die zu seiner Induktion führt, ist bislang nur ansatzweise bekannt. In der vorliegenden Arbeit wird mittels Westernblot demonstriert, dass bereits zehn Minuten nach Stimulation mit IL-4 der Jak-STAT-Signalweg aktiviert wird und nach drei Stunden der Transkriptionsfaktor STAT6 an die Promotorregion des µ-Opiat-Rezeptor-Gens bindet. µ-Opiat-Rezeptor-spezifische mRNA lässt sich in T-Lymphozyten erst später nachweisen.
Die Regulation der µ-Opiat-Rezeptor-Expression erfolgt auf unterschiedlichen Ebenen. Neben verschiedenen Transkriptionsfaktoren spielen möglicherweise auch epigenetische Mechanismen eine Rolle, mit welchen sich diese Arbeit in einem zweiten Schwerpunkt beschäftigt. Durch Chromatin-Immunpräzipitation wird die Bindung des µ-Opiat-Rezeptor-Promotors an verschiedene Histone (Lysin 4 trimethyliertem Histon H3 (H3K4me3), Serin 10 phosphoryliertem und Lysin 14 acetyliertem Histon H3 (H3S10p/K14ac) sowie Lysin 16 acetyliertem Histon H4 (H4K16ac)) analysiert. Zusätzlich wird eine Verringerung der Bindungsstärke des Kernproteins MeCP2 sowie eine transiente Interaktion des Transkriptionsfaktors Brg-1 mit der Promotorregion des µ-Opiat-Rezeptors nach Stimulation der T-Zellen mit IL-4 demonstriert. Zusammenfassend liefern diese Ergebnisse Hinweise darauf, dass der µ-Opiat-Rezeptor-Expression epigenetische Modifikationen vorausgehen.

Schlüsselwörter

Epigenetik
Histone
IL-4
Opiat-Rezeptor
T-Zellen

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 2
1.1 Opiate und Opiat-Rezeptoren 2
1.2 Opiate und Immunsystem 4
1.3 Histon-Modifikationen und Chromatin-Struktur 6
1.4 MeCP2 und DNA-Methylierung 9
1.5 Brg-1 und Chromatin-Remodeling 10
1.6 Klinische Bedeutung 11
1.7 Ziele der Arbeit 12
2 Material und Methoden 13
2.1 Geräte 13
2.2 Reagenzien 14
2.3 Zell-Stimulation 15
2.4 Westernblot 15
2.5 Chromatin-Immunpräzipitation 16
2.5.1 Das Prinzip 16
2.5.2 Optimierung der „Shearing“-Bedingungen 18
2.5.3 Chromatin-Isolation, „Shearing“ und Immunpräzipitation 19
2.5.4 PCR und Gel-Elektrophorese 20
2.6 Berechnung und Statistik 23
3 Ergebnisse 25
3.1 Die Induktion der µ-Opiat-Rezeptor-Expression 25
3.2 Die STAT6-Aktivierung 25
3.3 Die Bindung von STAT6 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor 26
3.4 Die Bindung der modifizierten Histone H3 und H4 29
3.5 Die Bindung von MeCP2 32
3.6 Die Bindung von Brg-1 33
3.7 Die Ergebnisse im Überblick 35

4 Diskussion 38
4.1 Die Aktivierung von STAT6 und Jak-1 durch IL-4 38
4.2 Chromatin-Remodeling durch Histon-Modifikationen 39
4.3 Histon-Modifikationen durch STAT 6 40
4.4 Die Dauer der Histon-Methylierung 40
4.5 Die DNA-Methylierung 41
4.6 Die Aktivierung der Transkription durch Brg-1 42
4.7 Die Bindung von STAT6 und die Genexpression 42
5 Zusammenfassung 44

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
Brg-1	Brahma-related gene 1
cDNA	Complementary DNA
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CP	Crossing Point
CpG	Cytosin – Phosphat – Guanin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
FCS	Fetales Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HDAC	Histon-Deacetylase
IL-4	Interleukin-4
IP	Immunpräzipitation
Jak-1	Januskinase 1
KDM5	Lysin-spezifische Demethylase 5
MeCP2	Methyl-CpG-bindendes Protein 2
mRNA	Messenger RNA
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6
SWI/SNF	Switch/Sucrose-NonFermentable

1 Einleitung

1.1 Opiate und Opiat-Rezeptoren

Als Opiate werden bestimmte Alkaloide bezeichnet, die natürlicherweise im Milchsaft des Schlafmohns (Papaver somniferum) vorkommen. Dazu gehören unter anderem Morphin, Codein, Noscapin und Papaverin. Außerdem werden halbsynthetische Stoffe wie beispielsweise Heroin, Hydrocodon oder Oxycodon sowie vollsynthetische Medikamente wie etwa Fentanyl, Pethidin, Methadon oder Tramadol zu den Opiaten gerechnet. Der Begriff Opioide ist weiter gefasst und schließt all diejenigen Stoffe ein, die morphin-artige Eigenschaften aufweisen und an Opioid-Rezeptoren binden. Zu dieser heterogenen Gruppe zählen neben den Opiat-Alkaloiden sowie ihren semi- und vollsynthetischen Derivaten auch endogene Peptide wie Endorphin, Enkephalin und Dynorphin, die der Analgesie im Rahmen der Stressreaktion dienen.

Opiate zählen zu den ältesten bekannten Arzneimitteln. Ihre schmerzlindernden Eigenschaften sind seit Jahrtausenden bekannt und es ist historisch belegt, dass sie seit mehreren hundert Jahren zur Analgesie bei chirurgischen Eingriffen verwendet werden. So wurden bei Ausgrabungen Tonfiguren mit Mohnkapseln der minoischen Kultur aus der Zeit um 1500 vor Christus entdeckt (Norn et al., 2005).

Die ersten schriftlichen Hinweise auf den Milchsaft des Mohngewächses und dessen Gebrauch stammen aus dem ersten Jahrtausend vor Christus von verschiedenen griechischen Ärzten und Naturforschern wie beispielsweise Theophrastos von Eresos oder Nikandros aus Kolophon. Der berühmteste Pharmakologe des Altertums ist jedoch Pedanios Dioskurides, der im ersten Jahrhundert nach Christus unter den römischen Kaisern Claudius und Nero als Militärarzt diente. Er empfahl in seinen Ausführungen *„De materia medica“* die Verwendung von Papaver somniferum bei Operationen. Auch in der arabischen Medizin des zehnten Jahrhunderts war Opium, der getrocknete Saft des Schlafmohns, weit verbreitet, insbesondere bei der Behandlung von Schmerzen und Diarrhoe (Kuhlen, 2002).

Im Jahre 1804 gelang es dem deutschen Apotheker Friedrich Sertürner, aus Opium einen Wirkstoff zu isolieren. Er gab ihm, in Anlehnung an Morpheus, dem griechischen Gott der Träume, den Namen Morphin. Mit diesem Opiat in Reinform stand erstmals ein verlässliches und standardisierbares Medikament für die Schmerztherapie zur Verfügung. Außerdem hatte Sertürner damit den Grundstein für die Erforschung weiterer Alkaloide, wie Atropin, Coffein, Nikotin, Colchicin und Kokain gelegt, die ebenfalls um diese Zeit entdeckt wurden (Klockgether-Radke, 2002).

Mitte der 1960er Jahre entstand die Hypothese, dass Opiate ihre Wirkung über spezielle Rezeptoren vermitteln. Die beiden amerikanischen Neurowissenschaftler Candace Pert und Solomon Snyder veröffentlichten 1973 eine Arbeit, in der sie die spezifische Bindung von mit radioaktivem Tritium markierten Naloxon an einen auf Neuronen exprimierten Rezeptor nachwiesen (Pert und Snyder, 1973). Dieser wurde später aufgrund seiner Affinität zu Morphin als μ-Opiat-Rezeptor bezeichnet. In der Folge wurden noch zwei weitere Opiat-Rezeptoren entdeckt: Der mit Hilfe des Liganden Ketazocin identifizierte κ-Opiat-Rezeptor (Pasternak, 1980) sowie der zuerst im Vas deferens, dem Samenleiter, einer Maus gefundene δ-Opiat-Rezeptor (Lord et al., 1977). Da die im klinischen Alltag am häufigsten verwendeten Opioide jedoch bevorzugt an den μ-Opiat-Rezeptor binden, spielen die beiden Letztgenannten eine eher untergeordnete Rolle.

Diese Entdeckungen lösten einen internationalen Wettstreit darüber aus, wer als erstes die Molekülstruktur dieser Rezeptoren aufklären würde. Schließlich konnten Evans in Kalifornien und Kieffer in Frankreich im Jahr 1992 voneinander unabhängig den δ-Opiat-Rezeptor klonieren und so einen wesentlichen Beitrag zum besseren Verständnis der Wirkmechanismen der Opiate leisten. Aufgrund der engen strukturellen Verwandtschaft konnte kurz darauf auch die Architektur des μ- und des κ-Opiat-Rezeptors identifiziert werden (Evans et al., 1992), (Kieffer et al., 1992).

Heute ist bekannt, dass die Opiat-Rezeptoren der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren angehören, die Signale von außen über GTP-bindende Proteine in das Zellinnere weiterleiten. Diese werden in Abgrenzung zu den liganden-gesteuerten Ionenkanälen auch als metabotrop bezeichnet. Sie bestehen, wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt, aus sieben transmembranären Domänen, die jeweils durch drei intra- und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind (Waldhoer et al., 2004). Außerdem besitzen sie eine extrazelluläre Bindungs- beziehungsweise Erkennungsdomäne für ihre Liganden, zu denen neben den endogenen Opioiden und opiatartigen Analgetika

auch Opioid-Antagonisten wie beispielsweise Naloxon oder Naltrexon gehören (Janecka et al., 2004).

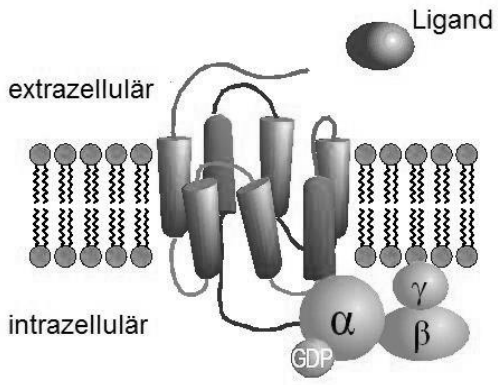

Abbildung 1. Struktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (modifiziert nach Jähnichen, 2006). Diese auch als Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren bezeichnete Gruppe von Signalproteinen ist an vielfältigen physiologischen Prozessen der Zellmembran beteiligt. Das intrazellulär membranständige G-Protein besteht aus den drei Untereinheiten α, β und γ. Die α-Untereinheit hat in der inaktiven Form GDP gebunden. Die Aktivierung des Rezeptors durch einen Liganden bewirkt den Austausch von GDP gegen GTP an der α-Untereinheit sowie die Dissoziation von den Untereinheiten β und γ. Die freigesetzen Untereinheiten regulieren anschließend unterschiedliche Effektoren, die nachfolgend eine intrazytoplasmatische Signalkaskade und damit letztendlich die zelluläre Antwort auslösen können (Hamm, 1998).

Opioid-Rezeptoren werden vor allem im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert, wo sie bekanntermaßen die analgesierende Wirkung der Opioide vermitteln. Daneben wirken opiathaltige Analgetika auf die autonomen Nervenzellen des Plexus myentericus im Gastrointestinaltrakt und können dort starke Obstipationszustände hervorrufen (Smith, 1984). Es konnte auch gezeigt werden, dass Opiate weitreichende Auswirkungen auf das Immunsystem haben (Eisenstein et Hilburger, 1998). Diese Prozesse zu verstehen, ist für den Einsatz opiathaltiger Medikamente von enormer klinischer Bedeutung.

1.2 Opiate und Immunsystem

Mitte der 1990er Jahre konnte nachgewiesen werden, dass Opiate Wachstum, Differenzierung und Funktionseigenschaften von Leukozyten beeinflussen. (Roy et al., 1997). Dies gilt insbesondere für den chronischen, teils aber auch schon für den kurzfristigen Einsatz dieser Arzneimittel und betrifft sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunabwehr. So wird beispielsweise die Proliferationsfähigkeit von B-Lymphozyten

eingeschränkt (Thomas et al., 1995) und das Wachstum von Makrophagen-Vorläuferzellen behindert (Roy und Loh, 1996). Daneben besitzen nicht nur Opiate, sondern auch endogene Opioide immunmodulatorische Funktionen (Panerai und Sacerdote, 1997). Kürzlich konnten zum Beispiel molekulare Mechanismen der Hemmung der IL-2-Produktion aktivierter T-Zellen durch Beta-Endorphin aufgeklärt werden (Börner et al., 2009).

Nicht alle Opioide weisen die gleichen immunsuppressiven Effekte auf. Morphin etwa beeinträchtigt das Immunsystem, indem es wichtige intrazelluläre Signalwege stört, die der Immunregulation dienen. Auch das stark wirksame Opiat Fentanyl verursacht eine erhebliche Immunsuppression, wohingegen das etwas schwächere Buprenorphin wesentlich weniger immunsuppressive Nebenwirkungen besitzt (Sacerdote, 2008).

Die Opioid-Effekte werden dabei, wie bereits erwähnt, fast ausschließlich über µ-Opiat-Rezeptoren vermittelt. Die Tatsache, dass Pert und Snyder in den 1970er Jahren davon ausgegangen waren, dass deren Verbreitung auf Neuronen beschränkt ist, hängt unter anderem damit zusammen, dass ihre Expression auf Zellen des Immunsystems normalerweise gehemmt wird (Börner et al., 2007). Nachdem jedoch bekannt geworden war, dass Opiat-Rezeptoren unter bestimmten Voraussetzungen auch auf T-Lymphozyten exprimiert werden, wurden in den vergangenen Jahren mehrere Arbeiten zu den Mechanismen der Induktion ihrer Transkription veröffentlicht. Dazu gehört in erster Linie die Stimulation durch Zytokine wie IL-4 (Kraus et al., 2001) und den Tumornekrosefaktor (Kraus et al., 2003). Darüber hinaus induziert auch die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Aktivierung menschlicher T-Lymphozyten die Opiat-Rezeptor-Synthese (Börner et al., 2008).

Die Induktion des µ-Opiat-Rezeptor-Gens durch IL-4 ist dabei der am weitaus besten charakterisierte Mechanismus: Durch die Bindung von IL-4 an seinen Rezeptor werden mit diesem assoziierte Januskinasen (Jaks), eine Gruppe intrazellulärer Tyrosinkinasen, zur Autophosphorylierung angeregt (Heim, 1999). Im nun vorliegenden aktivierten Zustand wird der in Abbildung 2 dargestellte Jak-STAT-Signalweg initiiert: Aktivierte Jaks phosphorylieren STAT6-Proteine (signal transducer and activator of transcription), die daraufhin dimerisieren und zum Zellkern translozieren (Aaronson und Horvath, 2002). Es konnte in primären menschlichen T-Lymphozyten sowie in T-Zellen der Linie Jurkat nachgewiesen werden, dass STAT6 an die Nucleotid-Position -997 des µ-Opiat-Rezeptor-Gen-Promotors bindet (Börner et al., 2004). Dort stimuliert der Transkriptionsfaktor direkt die Expression des µ-Opiat-Rezeptor-Gens (Börner et al., 2006).

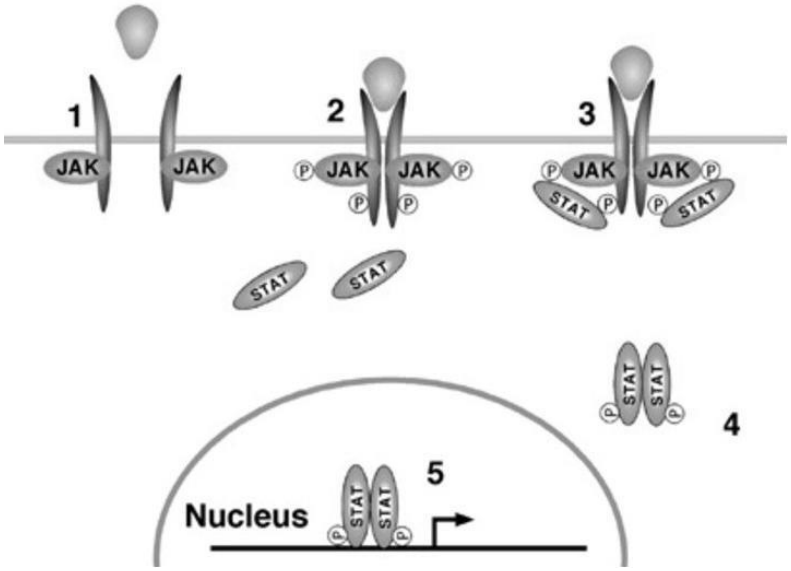

Abbildung 2. Der Jak-STAT-Signalweg (modifiziert nach Zeidler, 2006). Zytokinrezeptoren besitzen häufig keine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität und sind deshalb auf die Unterstützung von intrazellulären Janus-Kinasen („JAK“) angewiesen (Hebenstreit et al., 2005). 1) Ein Ligand, in diesem Fall IL-4, bindet an den Zytokinrezeptor. 2) Durch die Ligandenbindung kommt es zu Phosphorylierung der Rezeptor-assoziierten Januskinasen und anschließend zur Phosphorylierung des Rezeptors selbst. 3) STAT-Monomere binden an den phosphorylierten Rezeptor und werden daraufhin ebenfalls von den Jaks phosphoryliert. 4) Nach der Dissoziation vom Rezeptor bilden jeweils zwei STATs ein aktiviertes Dimer welches sogleich in den Nucleus transloziert. 5) Dort kann es an die Promotorregion eines Zielgens, hier des µ-Opiat-Rezeptor-Gens, binden und dort entweder direkt die Transkriptionsrate steigern, oder Modifikationen in der Chromatin-Architektur vermitteln (Bromberg und Darnell, 2000).

Einzelne Schritte der Signalkaskade, die zur Expression des µ-Opiat-Rezeptors auf T-Lymphozyten führt, werden mittlerweile relativ gut verstanden. So erscheint nun die Frage interessant, welche Kontrollmechanismen diesen Prozess steuern. An Neuronen von Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass der Aktivierung beziehungsweise der Unterdrückung der µ-Opiat-Rezeptor-Genexpression eine koordinierte Regulation sowohl auf DNA- als auch auf Histon-Ebene voraus geht (Hwang et al., 2007). In T-Lymphozyten wurde dies bislang noch nicht untersucht.

1.3 Histon-Modifikationen und Chromatin-Struktur

In eukaryotischen Zellen bildet die DNA zusammen mit Histonen und weiteren Strukturproteinen das Chromatin. Histon-Oktamere und DNA formen die in Abbildung 3 dargestellten Nukleosomen, die kettenförmig aneinander gereiht sind. (Luger et al., 1997).

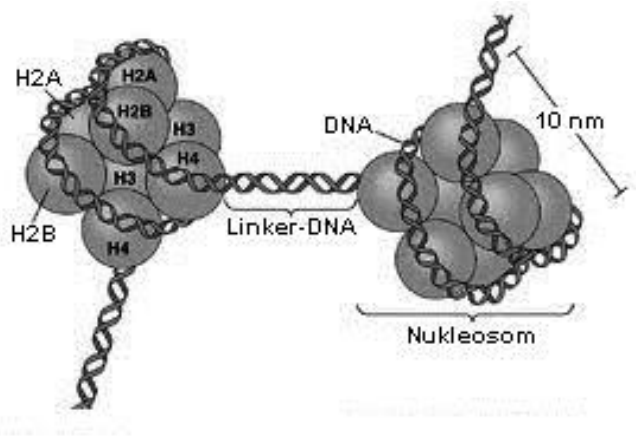

Abbildung 3. Die Struktur der Nukleosomen (modifiziert nach Pearson Education, 2009). Ein DNA-Segment mit einer Länge von 146 Basenpaaren ist circa 1,67fach um einen Kern aus Histon-Molekülen gewickelt. Dieser Komplex besteht aus jeweils zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4. Die einzelnen Nukleosomen werden durch die sogenannte Linker-DNA miteinander verbunden, welche eine Länge von bis zu 80 Basenpaaren erreichen kann. Das in der Abbildung nicht dargestellte Histon H1 bindet an die Linker-DNA und gehört somit nicht direkt zur Struktur der Nukleosomen.

Histone besitzen mehrere Funktionen: Um die DNA-Moleküle des Menschen, die auseinander gezogen eine Länge von etwa zwei Metern ergeben würden, in einem Nukleus mit einem Durchmesser von zehn Mikrometern zu verstauen, ist es notwendig, die Molekülkette sehr stark zu komprimieren (Luger und Richmond, 1998). Daneben hat das Protein-Gerüst den Zweck, die DNA zu stabilisieren und dadurch zu verhindern, dass sie während Mitose und Meiose beschädigt wird (Comings, 1972). Die dritte und wahrscheinlich komplexeste Aufgabe ist die Steuerung von Genexpression und DNA-Replikation (Jackson, 2003). Die Mechanismen, die der Erfüllung dieser Funktionen dienen, lassen sich unter dem Begriff „DNA-Packaging“ zusammenfassen.

Die Chromatin-Architektur hängt von unterschiedlichen Faktoren ab. Die Grundstruktur wird durch das Stadium des Zellzyklus determiniert: Während der Interphase befindet sich das Chromatin insgesamt in einem weitgehend aufgelockerten Zustand, der als euchromatisch bezeichnet wird. Er ermöglicht den RNA- und DNA-Polymerasen die Transkription und Replikation der DNA (Back, 1976). In den Stadien der Mitose beziehungsweise der Meiose wird das Chromatin kondensiert. Dieses sogenannte Heterochromatin kann nun nicht mehr abgelesen werden (Sandritter, 1970).

Die lokale Struktur des Chromatins wird während der Interphase von sehr spezifisch wirksamen Faktoren bestimmt, die eine selektive Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung der Genexpression ermöglichen (Steger und Workman, 1996). Die jeweiligen Bereiche der

DNA-Molekülkette werden unterschiedlich dicht an die Histone gebunden. Dementsprechend wird der Zugang für Transkriptionsfaktoren zu den Zielgenen entweder erlaubt oder verhindert (Jenuwein und Allis, 2001; Jayani et al., 2010).

Eine der Grundlagen für die Variabilität der Bindungsstärke zwischen DNA und Histonen stellen verschiedene posttranslationale Modifikationen an den basischen Histon-Seitenketten dar (Spencer und Davie, 1999; Berger, 2001). Zu den bekanntesten Mechanismen zählen die in Abbildung 4 gezeigten reversiblen Methylierungen, Phosphorylierungen und Acetylierungen (Berger, 2002; Bode und Dong, 2005).

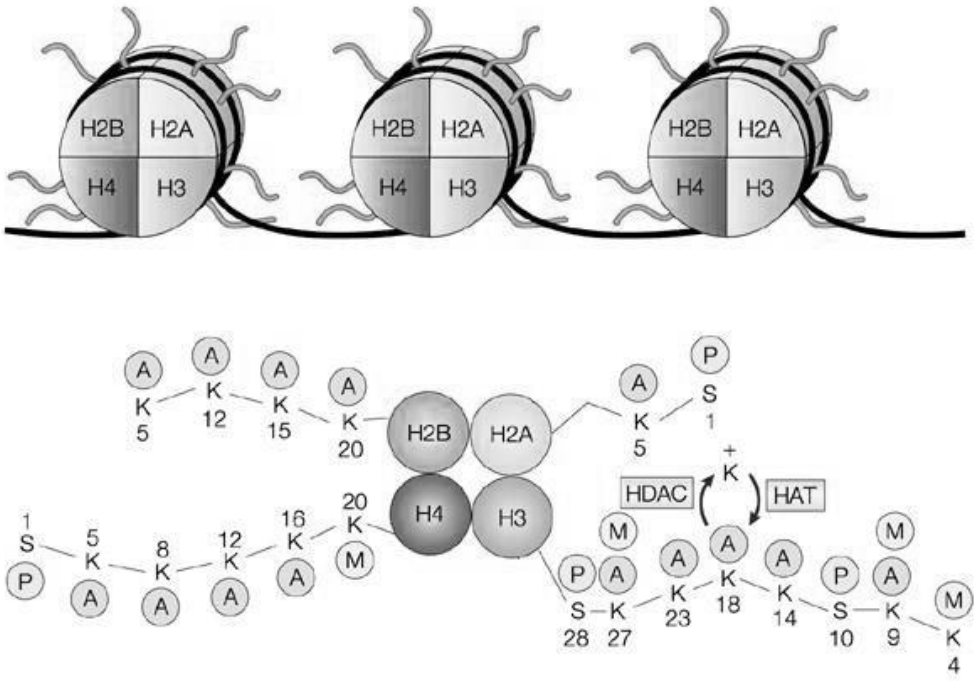

Abbildung 4. Posttranslationale Modifikationen der Histone (modifiziert nach Marks et al, 2001). Im oberen Abschnitt sind drei Nukleosomen gezeigt. Erkennbar sind die N-terminalen Enden der Histon-Molekülketten, die aus den Komplexen herausragen. Im unteren Abschnitt ist dargestellt, an welchen Positionen diese Seitenketten spezifisch modifiziert werden können. Die Acetylierung („A“) wird dabei durch die Histon-Acetyl-Transferase („HAT“) vermittelt, die Deacetylierung durch die Histon-Deacetylase („HDAC“). Die Methylierung („M“) wird durch spezifische Histon-Methylasen und die Phosphorylierung („P“) durch Histon-Phosphorylasen vollzogen (Nakao, 2001; Holland-Frei, 2003).

Es existiert jedoch keine allgemeingültige Regel die festlegt, ob die Histon-Veränderungen im Einzelfall einen aktivierenden oder hemmenden Einfluss auf die Genexpression haben (Berger, 2007). Zu den Mechanismen, die in der Literatur häufig mit einer Aktivierung in Verbindung gebracht werden, gehören unter anderem die Methylierung des Histons H3 an Lysin 4 (Robertson et al., 2008) oder die Acetylierung des Histons H4 an Lysin 16 (Koch et al., 2007).

1.4 MeCP2 und DNA-Methylierung

Neben den posttranslationalen Histon-Modifikationen spielen auch Veränderungen im Methylierungsmuster der DNA eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Genexpression. Beide Mechanismen werden unter dem Begriff Epigenetik zusammengefasst (Wolffe, 1998; Nakao et al., 2001). Epigenetische Mechanismen erweitern das Informationspotential der DNA deutlich ohne dabei die Nukleinsäure-Sequenz abzuwandeln und werden bei der Zellteilung als sogenannter epigenetischer Code weitergegeben (Wolffe und Matzke, 1999; Strahl und Allis, 2000; Bird, 2007).

Der Methylierungsstatus der DNA erscheint im Vergleich zu Veränderungen der Histone langlebiger und stabiler (Reik, 2007). Methylierungen werden besonders häufig an Cytosinresten in der Sequenz Cytosin – Guanin (CpG) beobachtet (Nan et al., 1998). Speziell mit diesen Methylgruppen kann das methyl-CpG-bindende Protein 2 (MeCP2) interagieren (Hoffbuhr et al., 2002). MeCP2 ist ein in menschlichen Zellen ubiquitär vorkommendes Polypeptid welches neben der Bindung an die Methylgruppen der CpG-Sequenz auch verschiedene Co-Faktoren rekrutieren kann (Nan und Bird, 2001; Ballestar und Wolffe, 2001). In Abbildung 5 ist erklärt, wie die Bindung von MeCP2 an einen methylierten DNA-Abschnitt zu einer Verdichtung der lokalen Chromatin-Struktur und dadurch zu einer Hemmung der Genexpression führt (Wade, 2001; Bártová et al., 2008).

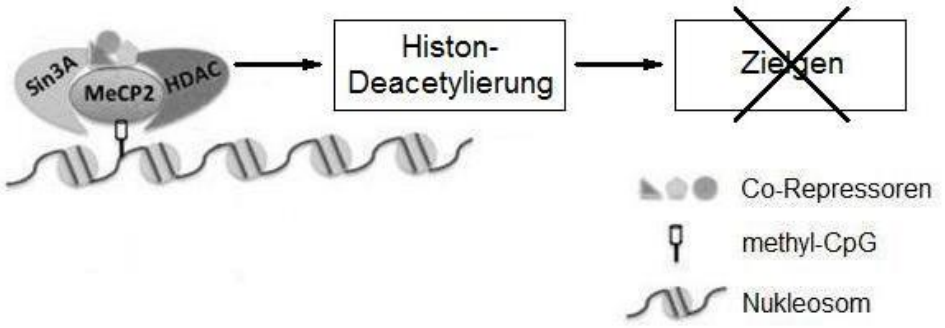

Abbildung 5. Der Mechanismus der Hemmung der Genexpression durch MeCP2 (modifiziert nach Xu et Pozzo-Miller, 2013). Der Transkriptionsfaktor MeCP2 bindet spezifisch an methylierte Cytosin-Guanin-Sequenzen („methyl-CpG“) der DNA. Daneben werden durch MeCP2 verschiedene Co-Faktoren rekrutiert. Dazu zählen unter anderem der Transkriptionsregulator Sin3A und die Histon-Deacetylase („HDAC“). Die Histon-Deacetylierung bewirkt eine Kondensation des Chromatins, welches dadurch für Transkriptionsaktivatoren unzugänglich wird. Somit können Gene in einem Bereich der DNA mit hoher MeCP2-Bindung nicht mehr exprimiert werden (Williamson und Christodoulou, 2006).

Neben der Rekrutierung von Co-Repressoren wird durch MeCP2 auch die Bindung von Transkriptionsaktivatoren verhindert (Bowen et al., 2004; Bogdanović und Veenstra, 2009). Somit weist ein hoher Methylierungsgrad in der Nähe eines Promotors und ein damit verbundener hoher Gehalt von MeCP2 in diesem Bereich auf eine niedrige Transkriptions-Aktivität des betroffenen Genes hin (Nan et al., 1997).

1.5 Brg-1 und Chromatin-Remodeling

Der Begriff Chromatin-Remodeling fasst die dynamischen Veränderungen der Chromatin-Architektur zusammen. Neben den bereits beschriebenen posttranslationalen Histon-Modifikationen und Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters spielen hier auch eine Reihe ATP-abhängiger Enzyme eine wichtige Rolle, die die Interaktion von DNA und Histonen beeinflussen können (Muchardt und Yaniv, 1999; Kokavec et al., 2008).

Dazu gehört zum Beispiel die Familie der SWI/SNF (Switch/Sucrose-NonFermentable)-Proteinkomplexe (Peterson, 2002; Ho und Crabtree, 2010). Als zentrale katalytische Untereinheit ist diesen Brg-1 (Brahma-related gene 1) gemeinsam, auch bekannt unter dem Namen „SMARCA4“. Unter Verwendung von Energie aus der ATP-Hydrolyse können SWI/SNF-Komplexe mittels Brg-1 die Position der Nukleosomen in Bezug auf den DNA-Strang verändern und dadurch die Chromatin-Struktur destabilisieren (Teif und Rippe, 2009; Lunning und Green, 2015). Inwieweit Brg-1 dabei eine aktivierende oder hemmende Funktion einnimmt hängt vermutlich von weiteren Regulatoren ab, wie beispielsweise den sogenannten „BAF“, den Brg-1-assoziierten Faktoren (Chen et al., 2006; Trotter und Archer, 2008; Yoo und Crabtree, 2009).

Die Veränderung der lokalen Chromatin-Architektur scheint nicht nur für die Steuerung der Transkription, sondern auch für die Replikation, DNA-Reparatur und Rekombination von Bedeutung zu sein (Trotter und Archer, 2007). So legen aktuelle Daten einen Zusammenhang zwischen einer Fehlsteuerung der SWI/SNF-Chromatin-Remodeling-Komplexe und der Entstehung von Tumoren nah (Biegel et al., 2014)

1.6 Klinische Bedeutung

Epigenetische Prozesse gehören zu den Schlüsselmechanismen der normalen Zellregulation. Störungen dieser Vorgänge können zu Entwicklungsdefekten führen. Als Beispiel sei das Rett-Syndrom genannt, welches eine der häufigsten Ursachen mentaler Retardierung bei Frauen darstellt. Eine Mutation des für MeCP2 codierenden Gens zieht eine gestörte epigenetische Transkriptionsregulation nach sich und führt bei den betroffenen Mädchen im Alter von etwa anderthalb Jahren zur Verzögerung der geistigen Entwicklung und einer deutlich gesteigerten Krampfbereitschaft (Amir et al., 1999, Lyst und Bird, 2015).

Daneben wird in der Literatur auch ein Zusammenhang zwischen mentaler Retardierung beim Martin-Bell-Syndrom (Fragiles-X-Syndrom) und einer Fehlsteuerung der vom DNA-Methylierungsmuster abhängigen Hemmung der Transkription diskutiert. (El-Osta und Wolffe, 2000). Die betroffenen Patienten fallen neben einer ausgeprägten Intelligenzminderung auch durch Aufmerksamkeitsdefizite und autistische Verhaltensweisen auf (Giangreco et al., 1996). Im Maus-Modell konnte bei dieser Form der genetischen Störung auf dem X-Chromosom unter anderem ein stark reduziertes MeCP2-Expressionsmuster nachgewiesen werden (Zhang et al., 2009).

Wie neuere Forschungsergebnisse zeigen, können Störungen der epigenetischen Regulation auch zur Tumorgenese führen. In verschiedenen Tumoren, wie beispielsweise Medulloblastomen oder rhabdoiden Tumoren im Kindesalter, wurden Mutationen des für Brg-1 codierenden Gens gefunden (Hargreaves und Crabtree, 2011; Bourdeaut und Bièche, 2012). Möglicherweise spielt Brg-1 eine Rolle in der Reparatur von DNA-Doppelstrang-Brüchen. Eine Fehlregulationen könnte die Entstehung und den Progress von Tumorerkrankungen zur Folge haben (Kwon et al., 2015).

Aufgrund dieser Erkenntnisse ist die Epigenetik in den zurück liegenden Jahren sehr stark in den Focus biologischer und medizinischer Forschung gerückt.

1.7 Ziele der Arbeit

Wie eingangs erwähnt, werden eine Vielzahl klinisch relevanter immun-modulatorischer Effekte der Opioide über µ-Opiat-Rezeptoren vermittelt. Diese werden allerdings auf ruhenden T-Lymphozyten normalerweise nicht exprimiert. Es ist jedoch bekannt, dass IL-4 mit Hilfe des Transkriptionsfaktors STAT6 die Synthese µ-Opiat-Rezeptor-spezifischer mRNA induzieren kann. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem zeitlichen Ablauf der intrazellulären Signalkaskade, die dieser Aktivierung vorausgeht.

Ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Beantwortung der Frage, ob der µ-Opiat-Rezeptor-Induktion in T-Lymphozyten epigenetische Mechanismen zugrunde liegen. Dafür wurde nach Stimulation der Zellen mit IL-4 sowohl die Bindung modifizierter Histone an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor als auch der Methylierungsgrad der DNA in diesem Bereich untersucht. Außerdem wurde das Bindungsverhalten des Transkriptionsregulator-Proteins Brg-1 in der Promotorregion analysiert. Um einen Überblick über den zeitlichen Verlauf der untersuchten Prozesse und mögliche Zusammenhänge zu erhalten wurden am Ende alle Ergebnisse in einem Diagramm zusammengefasst.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Abzugstisch	Heraeus, Frankfurt
Blotter	Pharmacia Biotech, Braunschweig
Brutschrank	Integra Bio Science, Göttingen
Einmal-Pipetten	Abimed, Langenfeld
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Gelträger	Bio-Rad
Hyperkassette (Westernblot)	Amersham, Braunschweig
Kämme	Bio-Rad
Kühlzentrifuge	Beckman Coulter, Frankfurt
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Jena
LightCycler	Roche, Mannheim
Neubauer-Zählkammer	Fein Optik, Jena
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen
Schüttler	Bachofer, Reutlingen
Spannungsgeber	Biotec-Fischer, Gelsenkirchen
Vakuumpumpe	Medela Basic, Zürich
Vortex	Scientific Industries, Bohemia (USA)
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifuge	Heraeus

2.2 Reagenzien

Anti-Brg-1-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-H4K16ac-Antikörper	Active Motif, Rixensart (Belgien)
Anti-H3K4me3-Antikörper	Active Motif
Anti-H3S10p/K14ac-Antikörper	Upstate Biotechnology, Lake Placid (USA)
Anti-MeCP2-Antikörper	Abcam, Cambridge (UK)
Anti-STAT6-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology
Aufschlusspuffer	Active Motif
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Active Motif
Enzymatic Shearing Cocktail	Active Motif
FCS (Fetales Kälberserum)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Formaldehyd	Otto Fischer GmbH, Saarbrücken
IL-4 (Interleukin-4)	R&D Systems, Wiesbaden
Lysepuffer	Active Motif
Magnetpartikel, Protein G-beschichtet	Active Motif
Milchpuffer	Humana Milchunion, Herfurt
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	Active Motif
Penicillin	Lonza Verviers SPRL, Verviers (Belgien)
PIC (Phenylisocyanat)	Active Motif
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Active Motif
Primärantikörper (für Western Blot)	Santa Cruz Biotechnology
Proteinase K	Active Motif
Reverse Cross Link Puffer	Active Motif
RPMI-1640 (Zellkulturmedium)	Lonza Verviers SPRL
Sekundärantikörper (für WesternBlot)	Amersham Biosciences, Braunschweig
Streptomycin	Lonza Verviers SPRL
SYBR Green	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween (Polysorbat)	Sigma-Aldrich

2.3 Zell-Stimulation

Für die Experimente wurden menschliche T-Lymphozyten der Linie Jurkat verwendet. Die Kultur der Zellen erfolgte in RPMI Medium. Das Medium war mit 10-prozentigem FCS sowie 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin versetzt.

Um die Einflüsse des FCS auf die Ergebnisse zu minimieren, wurden die Experimente zum Teil mit Zellen durchgeführt, die in Medien kultiviert wurden, denen weniger FCS zugesetzt worden war. So wurden die Jurkat-Zellen für die quantitative *real-time*-PCR sowie für die ChIP-Analyse für 24 h in einem Medium gezüchtet, welches nur 1-prozentiges FCS enthielt, bevor die Zellen mit IL-4 stimuliert wurden. Für die Western Blot-Analyse erfolgte die Kultur über drei Stunden und es wurde gänzlich auf FCS verzichtet.

2.4 Westernblot

Der erste Schritt zur Untersuchung des intrazellulären Signalweges, der zur Induktion des µ-Opiat-Rezeptor-Gens führt, war die Analyse der Phosphorylierung der zytoplasmatischen Tyrosinkinase Jak-1 sowie des Transkriptionsfaktors STAT6 vor und nach Stimulation mit IL-4. Für die Experimente wurden jeweils 2×10^6 Zellen für 10 Minuten mit IL-4 in einer Konzentration von 5 ng/ml stimuliert. Als Negativkontrolle fanden unstimulierte Zellen Verwendung.

Zunächst wurden alle Zellen lysiert. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Es wurde das Protokoll von Laemmli befolgt und ein 7-prozentiges Polyacrylamidgel verwendet (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese wurde für 15 Minuten mit 150 V sowie anschließend für 45 Minuten mit 180 V durchgeführt.

Im darauffolgenden Schritt wurden mittels Western Blot die gesuchten Proteine nachgewiesen. Dabei wurden die Proben zunächst mit Hilfe eines über 90 Minuten senkrecht angelegten elektrischen Feldes aus dem Trenngel auf eine Nitrozellulose-Trägermembran

übertragen. Diese wurde anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur in Milchpuffer geschüttelt, um die freien Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils fünf Minuten in PBS –Tween (nicht-ionisches Tensid) gewaschen.

Zur Identifikation der auf der Trägermembran befindlichen Proteinbanden wurden in den einzelnen Versuchsreihen verschiedene spezifische Primärantikörper verwendet. So wurden Antikörper gegen phosphoryliertes STAT6 (P-STAT6(Tyr641)), gegen phosphoryliertes Jak-1 (P-JAK1(Tyr1022/Tyr1023)) und gegen unphosphoryliertes STAT6 (M-20) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte jeweils für 16 Stunden bei 4 °C. Die Antikörper wurden 1:200 mit PBS–Tween verdünnt. Die Membran wurde anschließend wieder dreimal für jeweils 5 Minuten in PBS–Tween gewaschen.

Um die Detektion der Probenbanden zu ermöglichen, wurde ein gegen die Fc-Region der gebundenen Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper (anti-rabbit) verwendet. Die Inkubation erfolgte hier für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur, der Antikörper wurde 1:3000 mit PBS–Tween verdünnt. Es wurde ein dritter Waschschritt analog zu den beiden vorangegangenen durchgeführt. Schließlich konnte mit Hilfe des an den sekundären Antikörper gebundenen Reporterenzyms über eine Farblumineszenzreaktion in der Dunkelkammer das Proteinsignal sichtbar gemacht werden.

2.5 Chromatin-Immunpräzipitation

2.5.1 Das Prinzip

Ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Expression des µ-Opiat-Rezeptors ist die Bindung des durch Phosphorylierung aktivierten STAT6 an die Promotorregion des µ-Opiat-Rezeptor-Gens. Der zeitliche Ablauf dieses Prozesses sowie die Faktoren, die diesen möglicherweise beeinflussen, wie Histon-Modifikationen, DNA-Methylierung und Chromatin-Remodeling, wurden mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) analysiert. Mit Hilfe dieses Verfahrens kann in lebendigen Zellen gezeigt werden, ob ein bestimmtes Protein wie beispielsweise ein Transkriptionsfaktor oder ein Histon zu einem konkreten Zeitpunkt an einen definierten Abschnitt der DNA, zum Beispiel eine Promotorregion, gebunden hat (Buck und Lieb, 2004). Das Prinzip dieser Methode ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt und soll im Folgenden näher erläutert werden.

Als erstes werden intakte Zellen mittels Formaldehyd fixiert, um die DNA/Protein-Komplexe miteinander zu vernetzen. Dieses sogenannte „cross-linking“ ist notwendig, um die Interaktion zwischen DNA und Proteinen für die Experimente zu erhalten und zu stabilisieren (Orlando und Paro, 1993). Im Folgenden ist das Chromatin aus den Zellen zu isolieren. Die Zellen werden dafür mit Hilfe eines „Douncers“, eines Gewebe-Homogenisators, aufgebrochen und so die Zellkerne freigelegt. Die DNA-Stränge werden anschließend mitsamt den daran gebundenen Proteinen in Fragmente von einigen hundert Basenpaaren gespalten. Dieser Vorgang wird als „Shearing“ bezeichnet und kann enzymatisch oder aber auch mittels Ultraschall erfolgen. Nun werden die Zellmembranbestandteile von den Chromatin-Protein-Fragmenten getrennt und die Immunpräzipitation kann beginnen.

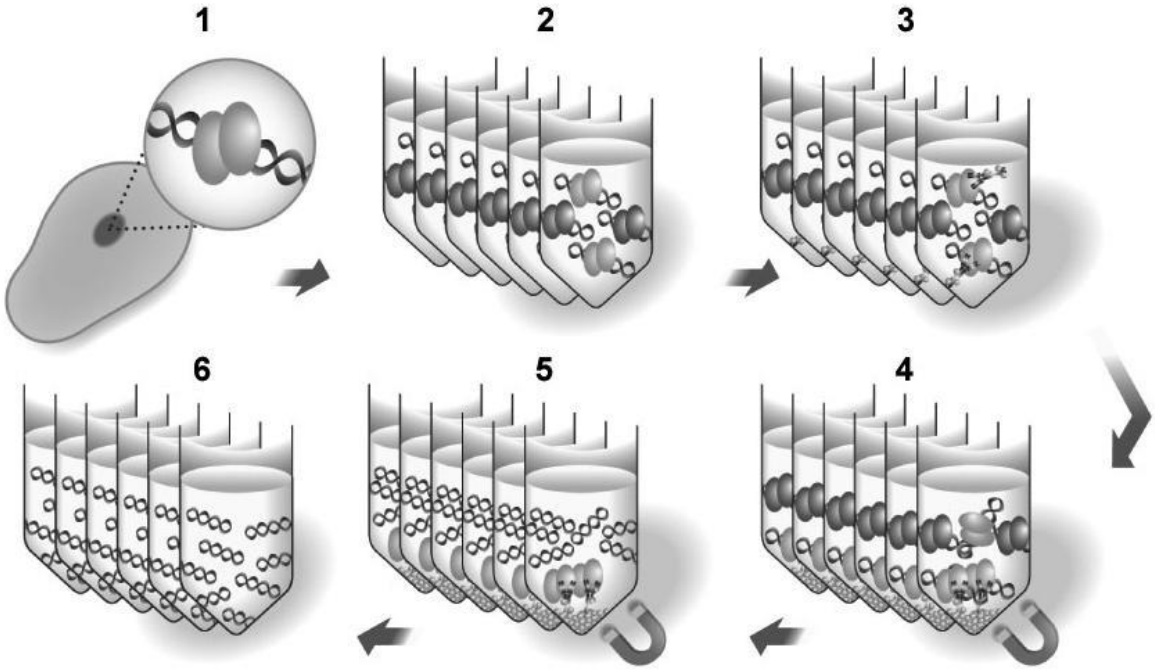

Abbildung 6. Das Prinzip der Chromatin-Immunpräzipitation (modifiziert nach Active Motif). 1) Zunächst muss die Bindung von Protein und DNA stabilisiert werden, was auch als „cross-linking“ bezeichnet wird. 2) Dann wird das „Shearing“, die enzymatische Fragmentierung der DNA-Stränge mit den an sie gebundenen Proteinen, durchgeführt. 3) Als nächstes wird ein spezifischer Primärantikörper zugegeben, der an das gesuchte Protein bindet. 4) Danach werden die antikörpergebundenen Protein/DNA-Komplexe mit Hilfe von Magnetpartikeln isoliert, welche mit Protein G beschichtet sind und so an die Primärantikörper ankoppeln können. 5) Anschließend wird die DNA von den Proteinen wieder getrennt und letztere enzymatisch abgebaut. 6) Zum Schluss wird der Überstand mitsamt den darin enthaltenen ungebundenen DNA-Sequenzen in ein frisches Gefäß gegeben. Die DNA ist nun bereit für die weitere Analyse.

Zu diesem Zweck werden jene DNA-Fragmente, die das gesuchte Protein gebunden haben, mit einem für dieses Protein spezifischen Primärantikörper inkubiert. Daran binden wiederum magnetische Partikel, die mit Protein G beschichtet sind. Protein G stammt aus der Zellwand von Streptokokken und weist am C-terminalen Ende eine hohe Affinität für die Fc-Region von Immunglobulinen auf (Sjöbring et al., 1991). Der gesamte Komplex wird in Abbildung 7 veranschaulicht.

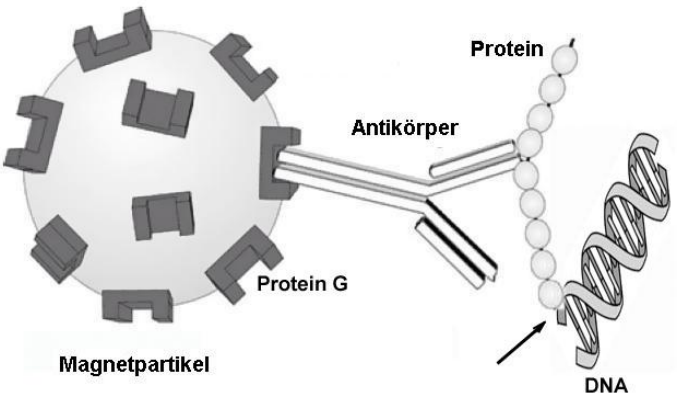

Abbildung 7. Komplex aus mit Protein G-beschichtetem Magnetpartikel, Primärantikörper, zu untersuchendem Protein und gebundenem DNA-Fragment (modifiziert nach Active Motif). Der Pfeil markiert einen „Cross-link“, eine der Bindungsstellen zwischen Protein und DNA-Fragment, die gespalten werden müssen, damit der Genabschnitt anschließend mittels PCR amplifiziert und weiter untersucht werden kann.

Mit Hilfe eines Magneten werden die gesuchten Komplexe von jenen DNA-Bruchstücken separiert, die kein Protein gebunden haben und somit auch nicht an ein Magnetpartikel gekoppelt sind. Die nicht gebundene DNA wird entfernt. Im Anschluss daran werden die „Cross-links“ durch Zugabe des Reverse Cross Link Puffers rückgängig gemacht, so dass die Magnet-Antikörper-Protein-Komplexe von den DNA-Sequenzen getrennt werden. Die in der Lösung befindlichen RNA-Moleküle und Proteine werden nun mittels Ribonucleasen beziehungsweise Serinproteasen abgebaut, um die DNA für die anschließende PCR vorzubereiten. So kann letztendlich ermittelt werden, ob ein Protein zum Untersuchungszeitpunkt an einen bestimmten Genabschnitt gebunden hat.

2.5.2 Optimierung der „Shearing“-Bedingungen

Für die vorliegende Arbeit wurde die CHiP (Chromatin-Immunpräzipitation) entsprechend der Herstellerangaben der Firma Active Motif durchgeführt. Die Dauer des „Shearings“ war dabei

bewusst nicht mit angegeben worden, da diese wesentlich vom verwendeten Zelltyp, den Zellkulturbedingungen und der Art und Weise der Stimulation abhängt. Ist die „Shearing"-Dauer jedoch einmal etabliert, liefert sie verlässliche Ergebnisse für den zu untersuchenden Zelltyp. Aus diesem Grund wurde in einer Vorversuchsreihe ermittelt, wie lange das „Shearing" durchgeführt werden muss, damit Immunpräzipitation und PCR anschließend aussagekräftige Resultate erbringen.

Das isolierte Chromatin wurde bei 37 °C mit einem DNase-Gemisch, dem „Enzymatic Shearing Cocktail", inkubiert. Nach 5, 10 beziehungsweise 15 Minuten wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden die Zellmembranbestandteile entfernt, die DNA/Protein-Bindungen getrennt und die Proteine enzymatisch abgebaut. Die DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Wie in Abbildung 11 im Ergebnisteil dargestellt, entstehen nach 10 Minuten „Shearing" DNA-Bruchstücke in der gewünschten Größenordnung zwischen etwa 200 und 1000 Basenpaaren. Auf dieser Grundlage wurde das „Shearing" für die folgenden Versuche auf diese Zeitspanne festgelegt.

2.5.3 Chromatin-Isolation, „Shearing" und Immunpräzipitation

Die ChIP-Analyse wurde mit dem „ChIP-IT Express-Kit" der Firma Active Motif durchgeführt. Zunächst wurde der zeitliche Ablauf der Bindung des Transkriptionsfaktors STAT6 an die Promotorregion des µ-Opiat-Rezeptors ermittelt. In weiteren Experimenten wurde die Bindung des trimethylierten Histons H3 mit Hilfe des Antikörpers Anti-H3K4me3, die Bindung des phosphorylierten und acetylierten Histons H3 mittels Anti-H3S10p/K14ac und die Bindung von acetyliertem Histon H4 durch Anti-H4K16ac untersucht. Für der Analyse der Bindung des Kernproteins MeCP2 wurde der Antikörper Anti-MeCP2 und für den Chromatin-Remodeling-Komplex Brg-1 der Antikörper Anti-Brg-1 verwendet.

Für die Experimente wurden jeweils 25 x 10^6 T-Zellen der Linie Jurkat für die Dauer von 1 bis 16 Stunden mit IL-4 in einer Konzentration von 5 ng/ml stimuliert. Als Negativkontrolle wurden erneut unstimulierte Zellen verwendet. Dem Protokoll des Herstellers folgend wurden die stimulierten wie auch die unstimulierten Zellen für das „Cross-linking" für 10 min bei 2.000 rpm zentrifugiert, in RPMI ohne FCS resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 37-prozentigem Formaldehyd inkubiert. Zur Beendigung des Fixationsvorganges wurden die Zellen in einer Lösung aus Glycin und PBS resuspendiert, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, abermals pelletiert und zum Waschen erneut in PBS resuspendiert. Um das Chromatin aus den Zellen zu isolieren, wurden nach

nochmaliger Pelletierung Lysepuffer, PIC und PMSF hinzugefügt und die Lösung 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellkerne mit 10 Stößen des „Douncers“ freigelegt und das Material nach erneuter Pelletierung in Aufschlusspuffer, PIC und PMSF resuspendiert.

Das Zellkern-Pellet wurde anschließend in Glycerin und dem „Enzymatic Shearing Cocktail“ resuspendiert. Das „Shearing“ wurde entsprechend den oben beschriebenen Vorversuchen für 10 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Um die Reaktion zu stoppen wurde 0,5-molares EDTA hinzugefügt und die Lösung für 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Daraufhin wurden die Zellmembranbestandteile von den in Lösung befindlichen Protein/Chromatin-Komplexen abzentrifugiert.

Für die nachfolgende Immunpräzipitation wurden jeweils 15 µg Chromatin eingesetzt, was in etwa der Menge entspricht, die sich aus 2,5 x 10^6 Zellen isolieren lässt. Das Chromatin wurde für 16 Stunden bei 4 °C mit jeweils 3 µg der oben genannten Antikörper sowie 25 µl der mit Protein G beschichteten Magnetpartikel inkubiert. Anschließend wurden die gesuchten Komplexe mittels eines Magneten isoliert. Die ungebundenen DNA-Fragmente wurden verworfen.

Parallel dazu wurden aus jeder Versuchsreihe 3 µg Chromatin/Protein-Fragmente separiert und gesondert aufbewahrt, um später eine relative Quantifizierung der isolierten DNA-Mengen zu ermöglichen. Diese als „Input-DNA“ bezeichneten Proben wurden nicht mit Antikörpern und Magnetpartikeln inkubiert, sondern nur mit Pufferlösung versetzt und mit dieser auf eine Konzentration von 1:5 verdünnt.

Nach mehreren Waschschritten wurden den Herstellerangaben folgend im 95 °C heißen Wasserbad unter Zugabe des Reverse Cross Link Puffers die „Cross-links“ rückgängig gemacht und so die DNA von Proteinen, Antikörpern und Magnetpartikeln getrennt. Daraufhin wurden sämtliche Proben, also auch die „Input-DNA“, für jeweils 15 Minuten mit RNase A sowie mit Proteinase K behandelt um die darin enthaltenen RNA-Moleküle und Proteine abzubauen und die DNA so für die anschließende PCR zu reinigen.

2.5.4 PCR und Gel-Elektrophorese

Die durch die Immunpräzipitation isolierten DNA-Abschnitte wurden mittels quantitativer *real-time*-PCR weiter untersucht. Diese Methode ermöglicht simultan zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte auch deren Quantifizierung. Dabei wird SYBR Green verwendet,

ein zunächst inaktiver fluoreszierender Farbstoff der in den DNA-Doppelstrang interkaliert. Durch die Einlagerung in die DNA steigt die Fluoreszenz des Farbstoffes an. Das Fluoreszenzsignal wird in Echtzeit gemessen und nimmt dementsprechend proportional zur Anzahl der entstandenen Kopien zu.

Eine PCR läuft generell in drei Phasen ab. In der frühen Phase ist die Anzahl der zu amplifizierenden DNA-Fragmente deutlich begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass Nucleotidsequenz und Polymerase aufeinandertreffen äußerst gering. Dadurch läuft die Vervielfältigung noch suboptimal ab. In der zweiten Phase, die in jedem Lauf nur wenige Zyklen umfasst, finden sich DNA-Sequenzen, Primer und Enzyme in einem günstigen Verhältnis, sodass die Amplifikation exponentiell verläuft und eine korrekte Quantifizierung möglich ist. In der späten Phase wird durch die zunehmende Knappheit der Substrate sowie die Menge der entstandenen Produkte die Vervielfältigung wiederum behindert und läuft dadurch langsamer ab.

Aus diesem Grund ist es entscheidend denjenigen Zyklus zu determinieren, an dem die exponentiell verlaufende Kurve eine definierte Basislinie überschreitet: Dieser wird als „Crossing Point“ bezeichnet und beschreibt den Schwellenwert, an dem die gemessene Fluoreszenz in der Probe sich erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz erhebt. Aus dem Zeitpunkt, an dem jener Grenzwert überschritten wird, lassen sich Rückschlüsse auf die Anzahl der ursprünglich vorhandenen Kopien ziehen, denn je mehr Kopien sich initial in der Probe befinden, desto schneller wird der „Crossing Point“ erreicht.

Durch eine anschließend durchgeführte Schmelzkurvenanalyse wird die Spezifität des Verfahrens erhöht und die Qualität der amplifizierten Proben untersucht. Dabei werden die Doppelstränge durch kontinuierliche Temperaturerhöhung von 70 °C bis 96 °C denaturiert und so der Fluoreszenzfarbstoff wieder freigesetzt und entsprechend inaktiviert. Die Temperatur, bei der die DNA schmilzt und sich dadurch das Fluoreszenzmuster ändert, ist für jedes Amplifikat charakteristisch. So lässt sich dieses von möglicherweise entstandenen unspezifischen PCR-Produkten und Primerdimeren unterscheiden.

Für die vorliegende Arbeit wurde das “LightCycler – Fast Start DNA Master SYBR Green I”-Kit der Firma Roche verwendet. Bei den Experimenten zur Bindung von STAT6 am µ-Opiat-Rezeptor-Promotor wurden die beiden 1 und 2 verwendet, welche in Abbildung 8 dargestellt sind. Es handelt sich dabei um den Primer 5’-GATCTTGTTGTAGGCCACTC-3’, der der Nucleotid-Position −1104 bis −1085 des menschlichen µ-Opiat-Rezeptor-Promotors entspricht, sowie um den Primer 5‘-TGGCATCCAGTAAAGTCAAC-3‘, entsprechend der

Position −893 bis −874. Nach der Präinkubation für 8 Minuten bei 95 °C wurde die PCR in 50 Zyklen mit 5 Sekunden bei 95 °C, 5 Sekunden bei 63 °C und 10 Sekunden bei 72 °C durchgeführt.

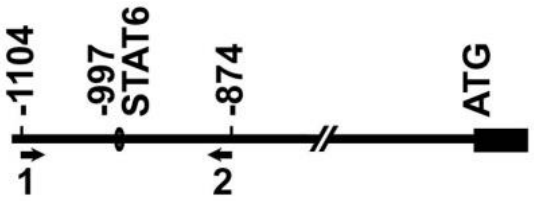

Abbildung 8. Die PCR-Primer für die ChIP-Analyse der STAT6-Bindung. Dargestellt ist der Promotor des menschlichen µ-Opiat-Rezeptor-Gens mit der STAT6-Bindungsstelle an Position -997 vor dem Startcodon („ATG“) sowie die Lokalisation der beiden Primer 1 und 2. Das entsprechende Amplifikat hat eine Länge von 231 Basenpaaren.

Für die Experimente zum zeitlichen Ablauf der Bindung der modifizierten Histone H3 und H4 sowie des Kernproteins MeCP2 und des Chromatin-Remodeling-Komplexes Brg-1 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor wurde das in Abbildung 9 gezeigte Primerpaar 3 und 4 verwendet. Der Primer 5’-GTTAGGGTTTCATCAAGCCA-3’ entspricht dabei der Nukleotid-Position −543 bis −524, der Primer 5‘-TCTTCACTGGGCACTCTTCT-3‘ der Position −372 −353. Hier wurde die PCR nach 8 minütiger Präinkubation bei 95 °C in 50 Zyklen mit 5 Sekunden bei 95 °C, 5 Sekunden bei 61 °C und 8 Sekunden bei 72 °C durchgeführt.

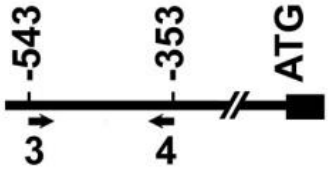

Abbildung 9. Die PCR-Primer für die ChIP-Analyse der Bindung modifizierter Histone. Schematisch abgebildet ist die Promotorregion des µ-Opiat-Rezeptor-Gens in Jurkat T-Zellen und die Position der Primer 3 und 4. Das gesuchte Amplifikat hat eine Länge von 191 Basenpaaren.

Das gesamte Protokoll wurde den Angaben der Herstellerfirma Roche entsprechend durchgeführt. Für jede PCR-Analyse wurden 2 µl immunpräzipitierte DNA beziehungsweise 0,2 µl der „Input-DNA“ verwendet, es wurde mit einem Gesamtvolumen von jeweils 20 µl gearbeitet. Um sicherzustellen, dass die Reagenzien nicht mit fremder DNA kontaminiert waren, wurde in jedem Lauf auch eine Negativkontrolle eingesetzt, bei der den Proben an Stelle der DNA nur Wasser zugefügt wurde.

Anschließend wurden die PCR-Produkte in einem 2-prozentigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, um die Ergebnisse der quantitativen PCR-Analyse zu überprüfen. Mit Hilfe eines Markers konnte so die Länge der Amplifikate sowohl der immunpräzipitierten DNA als auch der jeweils dazugehörigen „Input-DNA“ kontrolliert werden. In Abbildung 14 ist eine solche Spezifitätskontrolle beispielhaft dargestellt.

2.6 Berechnung und Statistik

Die Mengen der in den einzelnen Experimenten immunpräzipitierten DNA wurden mit Hilfe der „Crossing Points“ der quantitativen *real-time*-PCR bestimmt. Für die Quantifizierung wurde ein relativer Menge-Vergleich durchgeführt. Es wurden also nicht die absoluten Startkopienzahlen bestimmt, sondern der Anteil der Protein-gebundenen DNA-Abschnitte aus der Immunpräzipitation bezogen auf die Gesamtheit der µ-Opiat-Promotorregionen, der „Input-DNA“, ermittelt. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist die Reduktion der Varianz der Ergebnisse, da sich möglicherweise störende Einflussfaktoren innerhalb einer Probe immer in gleichem Maße auf die immunpräzipitierte DNA und die „Input-DNA“ auswirken. Dadurch heben sich in den darauffolgenden Berechnungen individuelle Probeneffekte wieder auf.

Für die Berechnung des Unterschiedes (Δ CP) wurde zunächst vom „Crossing Point“ der immunpräzipitierten DNA (CP_{IP}) jener der dazugehörigen „Input-DNA“ (CP_{Input}) subtrahiert.

$$\Delta CP = CP_{IP} - CP_{Input}$$

Bei der *real-time*-PCR berechnet sich der relative Anteil (Ratio) einer behandelten Probe bezogen auf ihre entsprechende Kontrolle grundsätzlich aus der Formel:

$$Ratio = \frac{1}{2^{\Delta CP}}$$

Dieses Berechnungsmodell setzt eine ideale PCR mit Verdopplung aller Kopien in jedem Zyklus voraus, was natürlich so nicht der Realität entspricht. Die tatsächliche Effizienz der Amplifikation wurde in mehreren Vorversuchen mittels verschiedener Verdünnungsreihen ermittelt und hatte unter oben beschriebenen Reaktionsbedingungen eine Größenordnung von 1,73 ergeben. Daher wurde für die relative Quantifizierung der Protein-gebundenen Promotoren bezogen auf deren Gesamtheit (Ratio $_{IP\ /\ Input}$) folgendes Berechnungsschema verwendet:

$$\textbf{Ratio}_{\textbf{IP / Input}} = \frac{1}{1{,}73^{\Delta\ CP}}$$

So konnte gezeigt werden, welcher Anteil der µ-Opiat-Rezeptor-Promotoren zu welchem Zeitpunkt durch die gesuchten Proteine gebunden war.

Sämtliche Versuche bestanden für jeden der verwendeten Antikörper aus zwei bis vier voneinander von der Zellernte bis hin zur PCR unabhängigen Experimenten. Für jede Versuchsreihe wurden für die untersuchten Zeitpunkte aus den „Crossing Points“ die jeweilige Ratio $_{IP\ /\ Input}$ und daraus wiederum das arithmetische Mittel, dessen Standardfehler und die Standardabweichung berechnet.

Die Daten wurden anschließend in Fehlerbalken-Diagrammen grafisch dargestellt und sind für den zeitlichen Verlauf der Bindung der Histone H3 und H4 in Abbildung 13 und für die Bindung der Proteine MeCP2 und Brg-1 in Abbildung 15 beziehungsweise Abbildung 16 gezeigt.

3 Ergebnisse

3.1 Die Induktion der µ-Opiat-Rezeptor-Expression

Die Rolle der µ-Opiat-Rezeptor-Expression bei der Regulation der Erregbarkeit von Neuronen und der damit einhergehenden Opioid-Effekte wie Analgesie, Sedierung und Atemdepression ist seit langem bekannt (Chavkin et al., 1988). Die Steuerung der µ-Opiat-Rezeptor-Expression in Zellen des Immunsystems ist hingegen kaum erforscht. Die Auswirkungen von Opiaten auf das Immunsystem dürfen jedoch aufgrund deren weit verbreiteten Einsatzes im klinischen Alltag nicht unterschätzt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Mechanismen der µ-Opiat-Rezeptor-Induktion in T-Lymphozyten untersucht.

In einer Vorarbeit zu diesem Thema konnte gezeigt werden, dass die Synthese µ-Opiat-Rezeptor-spezifischer mRNA sowohl in T-Zellen der Linie Jurkat als auch in primären menschlichen T-Zellen durch IL-4 induziert wird (Kraus et al., 2001). Eine weitere Arbeit hatte die Beantwortung der Frage zum Ziel, in welchem zeitlichen Rahmen diese Induktion stattfindet. Es konnten bis zu drei Stunden nach einer IL-4-Stimulation noch keine µ-Opiat-Rezeptor-spezifischen Transkripte nachgewiesen werden; nach acht beziehungsweise 24 Stunden wurden jedoch signifikante Mengen µ-Opiat-Rezeptor-mRNA gefunden (Börner et al., 2007). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Transkription des Gens zwischen drei und acht Stunden nach Stimulation der Zelle mit IL-4 beginnt. Die Ausgangsfrage der vorliegenden Arbeit lautete nun, welche intrazellulären Prozesse vor der Aktivierung der Transkription ablaufen.

3.2 Die STAT6-Aktivierung

Dem Jak-STAT-Signalweg kommt eine zentrale Bedeutung bei der Induktion des µ-Opiat-Rezeptor-Gens zu. Durch die Bindung von IL-4 an den entsprechenden Rezeptor wird die

intrazelluläre, Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinase Jak-1 phosphoryliert. Anschließend binden STAT6-Monomere an den Rezeptor und werden durch die phosphorylierte Jak-1 ebenfalls phosphoryliert. Auf diese Weise aktiviert dissoziieren die STAT6-Moleküle vom Rezeptor und bilden Dimere (Aaronson und Horvath, 2002).

Für diese Arbeit wurde zunächst ermittelt, in welchem zeitlichen Rahmen die Phosphorylierung von Jak-1 und STAT6 stattfindet. Wie in Abbildung 10 zu erkennen ist, wurde in den Zellen, die nicht mit IL-4 behandelt waren weder phosphoryliertes STAT6 noch phosphoryliertes Jak-1, dafür aber reichlich unphosphoryliertes STAT6 gefunden. Zehn Minuten nach IL-4-Stimulation lagen hingegen sowohl STAT6 als auch Jak-1 in phosphorylierter, und demzufolge aktivierter Form vor.

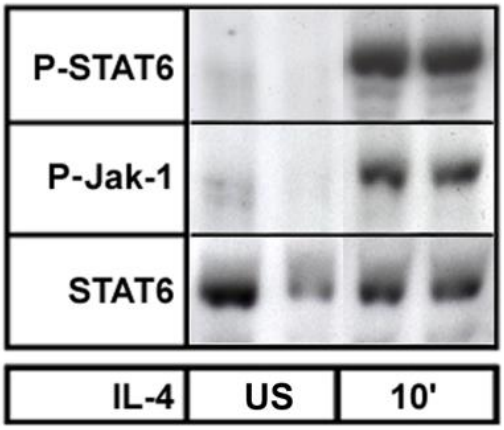

Abbildung 10. Die Phosphorylierung von Jak-1 und STAT6 nach Stimulation mit IL-4. Für diesen Versuch wurden 2×10^6 Zellen der Linie Jurkat für 10 min mit IL-4 (5 ng/ml) stimuliert. Danach wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot auf phosphorylierte STAT6 („P-STAT6“) und Jak-1 („P-Jak-1“) sowie unphosphorylierte STAT6 untersucht. Im Vergleich dazu wurden auch unstimulierte Zellen („US“) im Western Blot analysiert. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei voneinander unabhängigen, jeweils doppelt durchgeführten Versuchen. Es ist deutlich erkennbar, dass im Gegensatz zu den stimulierten Zellen („10‘“) im Blot der unstimulierten weder phosphorylierte STAT6 noch phosphorylierte Jak-1 gefunden wurden.

3.3 Die Bindung von STAT6 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor

Durch die Dissoziation vom IL-4-Rezeptor und die Dimerisierung erlangen die STAT6-Moleküle die Fähigkeit in den Zellkern zu translozieren. Dort binden sie an die Promotorregion des µ-Opiat-Rezeptor-Gens. Gemeinsam mit Co-Aktivatoren können sie nun die Transkription initiieren.

Um eine Vorstellung vom zeitlichen Ablauf dieses Vorgangs zu bekommen, wurde mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) untersucht, zu welchem Zeitpunkt STAT6 an den entsprechenden Promotor bindet. Diese Methode erlaubt mit Hilfe Magnetpartikel-gebundener Antikörper Aussagen zur Bindung bestimmter Proteine an die DNA.

Vor der eigentlichen Immunpräzipitation musste jedoch die enzymatische Spaltung des Chromatins in kurze Abschnitte, das sogenannte „Shearing“, durchgeführt werden. Für aussagekräftige Ergebnisse sollten DNA-Fragmente mit einer Länge zwischen einhundert und eintausend Basenpaaren gebildet werden, da die gesuchten, mittels PCR zu identifizierenden Genabschnitte aus 191 beziehungsweise 231 Basenpaaren bestanden.

Die optimale „Shearing“-Dauer wurde in einer Vorversuchsreihe experimentell ermittelt. Wie Abbildung 11 zeigt, wurde nach 10 Minuten das beste „Shearing“-Ergebnis erzielt, sodass für alle Experimente die Chromatin-Spaltung auf diese Dauer festgelegt wurde.

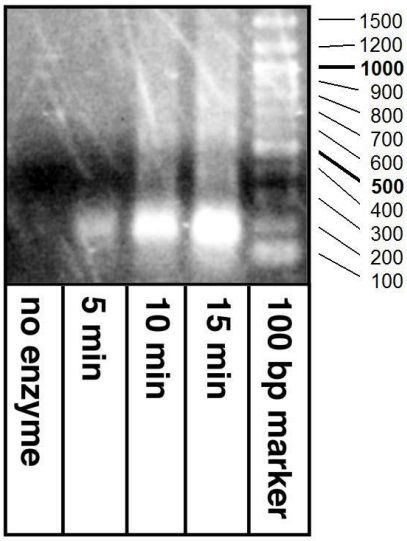

Abbildung 11. Die Optimierung der „Shearing“-Dauer. Das aus Jurkat T-Zellen isolierte Chromatin wurde unbehandelt belassen („no enzyme“) beziehungsweise für die Dauer der angegebenen Zeiten bei 37 °C mit dem „Enzymatic Shearing Cocktail“, einem DNase-Gemisch, versetzt. Das abgebildete Agarosegel verdeutlicht, dass eine „Shearing“-Dauer von 5 Minuten zu kurz ist und nur wenige Fragmente der gesuchten Länge liefert. Dagegen entstehen nach 10 Minuten DNA-Fragmente einer Länge ab etwa 200 Basenpaaren aufwärts. Eine weitere Verlängerung des „Shearing“ auf 15 Minuten hat zur Folge, dass kürzere Fragmente ab etwa 100 Basenpaaren Länge gebildet werden, die für die durchzuführenden Experimente unbrauchbar wären, da die Länge der gesuchten Amplifikate in den verschiedenen Versuchen jeweils um die 200 Basenpaare beträgt. In der rechten Spalte ist zum Abschätzen der Länge der Fragmente der „100 base pair marker“ abgebildet.

Für die Experimente zur Bindung von STAT6 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor wurden T-Lymphozyten der Linie Jurkat zunächst durch die ein- bis fünfstündige Zugabe von IL-4 zum Nährmedium stimuliert und anschließend das Chromatin aus den Zellen isoliert. Im nächsten

Schritt erfolgten die enzymatische Spaltung sowie die Immunpräzipitation der STAT6-gebundenen Chromatin-Fragmente mit Hilfe magnetischer Antikörper. In den auf diese Weise selektierten Komplexen wurde anschließend die DNA von den an sie gebundenen Proteinen getrennt und mittels Endpunkt-PCR amplifiziert. Das für den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor spezifische Primer-Paar welches hier verwendet wurde, ist in Abbildung 8 gezeigt.

In Zellen, die nicht mit IL-4 vorbehandelt waren, in denen STAT6 also zum Großteil in unphosphorylierter, monomerer Form vorlag, konnte in der ChIP-Analyse keine Bindung des Transkriptionsfaktors an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor nachgewiesen werden. Auch eine beziehungsweise zwei Stunden nach IL-4-Stimulation war noch keine relevante Interaktion zwischen STAT6 und der Promotorregion erkennbar. Wie in Abbildung 12 ersichtlich, hatten jedoch insbesondere nach drei, aber auch noch nach fünf Stunden erhebliche Mengen STAT6 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor gebunden.

Um die Qualität der untersuchten Proben zu überprüfen, wurde jeweils bei einem Teil der DNA auf eine Immunpräzipitation verzichtet und der entsprechende Abschnitt des µ-Opiat-Rezeptor-Promotors direkt mittels PCR amplifiziert. Diese als „Input-DNA“ bezeichneten Proben wurden anschließend, ebenso wie ihre jeweils zugehörige immunpräzipitierte DNA, per Gelelektrophorese aufgetrennt. Der gesuchte DNA-Abschnitt ließ sich sowohl in zuvor mit IL-4 stimulierten wie auch in unstimulierten Zellen nachweisen, wodurch das Gelingen der vorausgegangenen Versuchsschritte bestätigt werden konnte.

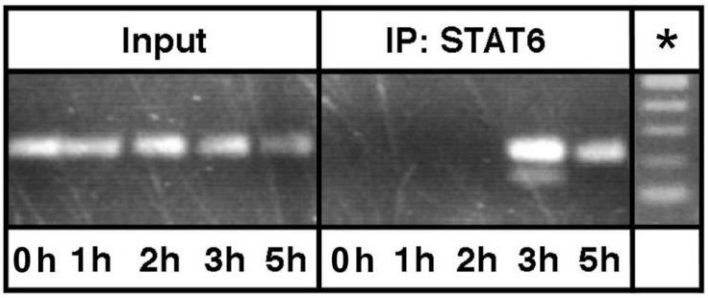

Abbildung 12. Der zeitliche Ablauf der Bindung von STAT6 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor nach Stimulation mit IL-4. Für die ChIP-Analyse wurden Jurkat-T-Zellen in jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten für die Dauer der unten angegebenen Zeiten mit IL-4 stimuliert. Anschließend wurden mittels Immunpräzipitation STAT6-gebundene DNA-Fragmente isoliert und ein 231 Basenpaare langer Abschnitt des µ-Opiat-Rezeptor-Promotors durch PCR amplifiziert. Dargestellt sind die Bilder eines 2-prozentigen Agarosegels, welches mit den PCR-Produkten jeweils eines exemplarisch ausgewählten Experiments für jede der unterschiedlichen Stimulationsdauern beladen wurde. Zur Kontrolle des immunpräzipitierten Chromatins („IP: STAT6“) wurde jeweils zusätzlich µ-Opiat-Rezeptor-Promotor-DNA amplifiziert, die aus demselben Versuch stammte, jedoch keiner Immunpräzipitation unterzogen wurde („Input“). In der mit * gekennzeichneten rechten Spalte ist zur Abschätzung der Fragmentlänge der „100 base pair marker“ abgebildet: Die unterste, etwas kräftigere Bande entspricht einer Länge von 100 Basenpaaren, die oberste einer Länge von 500 Basenpaaren.

3.4 Die Bindung der modifizierten Histone H3 und H4

Das Ziel des nun folgenden zweiten Abschnittes der vorliegenden Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob bei der Steuerung der Expression des µ-Opiat-Rezeptors auch epigenetische Mechanismen eine Rolle spielen. Das Hauptaugenmerk lag dabei ebenfalls auf dem Zeitraum zwischen der Aktivierung von STAT6 und dessen Bindung an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor.

Da ein Großteil des Chromatins die meiste Zeit für Transkriptionsfaktoren unzugänglich ist, muss vermutlich vor einer Bindung von STAT6 an die Promotorregion des µ-Opiat-Rezeptor-Gens die lokale Chromatin-Struktur verändert werden. Es sind verschiedene Mechanismen bekannt, die diese Funktion erfüllen können. Zu den bekanntesten zählen posttranslationale Histon-Modifikationen und Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters (Lachner und Jenuwein, 2002). Die Regulation der Transkription beruht höchstwahrscheinlich auf einer komplexen Kombination verschiedener Modifikationen, für die sich im Einzelfall nicht sicher vorhersagen lässt, ob sie einen aktivierenden oder reprimierenden Einfluss auf die Genexpression haben (Berger, 2007).

Vergleichsweise gut charakterisiert sind die dynamischen Veränderungen der Histone H3 und H4. Deren N-terminale Enden ragen als lange basische Ketten aus den Nukleosomen heraus und können an bestimmten Positionen reversibel modifiziert werden. Dadurch werden unterschiedlich starke Bindungsaffinitäten zwischen DNA und Histonen erzeugt. Vor diesem Hintergrund wurde mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) untersucht, ob und gegebenenfalls zu welchem Zeitpunkt sich im Bereich des µ-Opiat-Rezeptor-Promotors Histon-Modifikationen ereignen, die in der Literatur mit einer Aktivierung der Transkription in Verbindung gebracht werden. Es wurden drei verschiedene Antikörper ausgewählt um die Trimethylierung (H3K4me3), die Acetylierung (H4K16ac) sowie die kombinierte Phosphorylierung und Acetylierung (H3S10p/K14ac) der Histone H3 beziehungsweise H4 zu untersuchen.

Für die ChIP-Analysen wurden T-Zellen der Linie Jurkat unterschiedlich lang mit IL-4 stimuliert. Im Anschluss daran wurde das Chromatin isoliert und das „Shearing“ durchgeführt. Die mit Hilfe der magnetischen Antikörper isolierten DNA-Fragmente wurden von den an sie gebundenen Histon-Komplexen getrennt und mittels quantitativer *real-time*-

PCR amplifiziert. Die in der PCR verwendeten Primer sind in Abbildung 9 dargestellt. Analog zu den vorausgegangenen Experimenten wurde aus allen Proben ein Teil der DNA ohne vorherige Immunpräzipitation untersucht, die sogenannte „Input-DNA“. Anhand der korrespondierenden „Crossing Points“, also derjenigen Zyklen der PCR, bei denen die exponentielle Phase der Amplifikation beginnt, wurde ein relativer Menge-Vergleich durchgeführt. Das heißt, der „Crossing Point“ der PCR aus Histon-gebundener µ-Opiat-Rezeptor-DNA wurde ins Verhältnis zum „Crossing Point“ der PCR aus der „Input-DNA“, also der Gesamtheit der in der Probe vorhandenen µ-Opiat-Rezeptor-Promotoren gesetzt. So konnte der Anteil der Histon-gebundenen µ-Opiat-Rezeptor-Promotoren zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt bestimmt werden.

Wie in Abbildung 13 dargestellt, bestand die Bindung der modifizierten Histone an die DNA nur vorübergehend: In unstimulierten T-Lymphozyten konnte keine Histonbindung nachgewiesen werden. Erstmalig nach einstündiger und am stärksten nach zweistündiger IL-4-Stimulation hatte das an Lysin 4 trimethylierte Histon H3 (H3K4me3) an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor gebunden. Das an Serin 10 phosphorylierte sowie an Lysin 14 acetylierte Histon H3 (H3S10p/K14ac) und das an Lysin 16 acetylierte Histon H4 (H4K16ac) wiesen nach 3 Stunden die jeweils größte Bindungsstärke auf. Bereits nach fünf Stunden war für keine der modifizieren Histone mehr eine Bindung an die DNA nachweisbar. Die Interaktion konnte also nur in einem relativ kurzen Zeitfenster nach der Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT6, aber vor dessen Bindung an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor gezeigt werden.

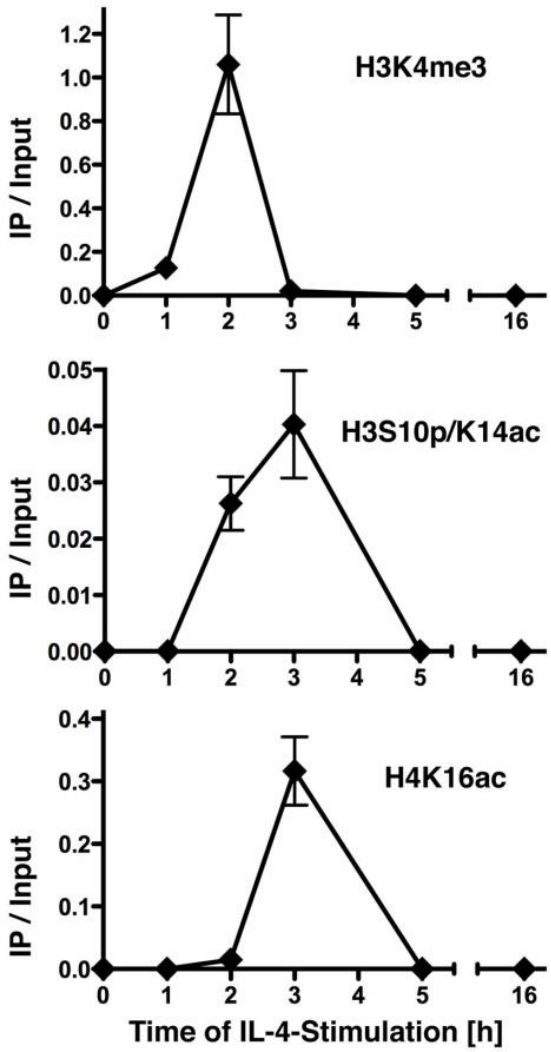

Abbildung 13. Der zeitliche Ablauf der Bindung der modifizierten Histone H3 und H4 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor nach Stimulation mit IL-4. Für diesen Versuch wurden Jurkat-T-Zellen für die Dauer der jeweils angegebenen Zeiten mit IL-4 stimuliert. Als nächstes wurden „Cross-linking“ und „Shearing“ durchgeführt. Anschließend wurden die an H3K4me3, H3S10p/K14ac beziehungsweise H4K16ac gebundenen Chromatin-Fragmente mittels Immunpräzipitation isoliert und ein 191 Basenpaare langer DNA-Abschnitt des µ-Opiat-Rezeptor-Promotors durch quantitative *real-time*-PCR amplifiziert. Die drei Diagramme fassen die Ergebnisse des relativen Menge-Vergleichs der PCR-Produkte zusammen. So wurde die Menge der Amplifikate, die aus dem immunpräzipitierten Chromatin („IP“) gewonnen wurden, zur Menge derjenigen ins Verhältnis gesetzt, die aus der „Input-DNA“ stammten, also aus den jeweils gleichen Versuchen, jedoch ohne vorherige Immunpräzipitation. Diese Quotienten („IP / Input“) sind als Funktion der Inkubationszeit der T-Zellen mit IL-4 abgebildet. Das Ziel war es zu zeigen, welcher Anteil der µ-Opiat-Rezeptor-Promotoren zu welchem Zeitpunkt durch modifizierte Histone gebunden war. Sämtliche Experimente wurden für jede der verschiedenen Stimulationsdauern zwei- bis viermal voneinander unabhängig durchgeführt. Abgebildet sind die jeweiligen Mittelwerte; die Standardfehler sind als Balken dargestellt.

Zur Qualitätskontrolle wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem sogenannten „100 base pair marker“ verglichen. Dieser wird auch als Größenleiter bezeichnet und ermöglicht in der Gelelektrophorese das Abschätzen der Länge der in einer Probe enthaltenen Moleküle. In Abbildung 14 ist exemplarisch ein solches

Gelelektrophorese-Bild aus den PCR-Produkten der H3K4me3-Experimente dargestellt. Es zeigt, dass in der PCR tatsächlich Kopien einer Länge von knapp 200 Basenpaaren entstanden sind, bei denen es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die gesuchten 191 Basenpaare langen Abschnitte des µ-Opiat-Rezeptor-Promotors handelt. Mit den PCR-Produkten aus den übrigen ChIP-Analysen wurde analog verfahren. Die entsprechenden Gel-Bilder zeigten ebenfalls die übereinstimmende Fragment-Länge.

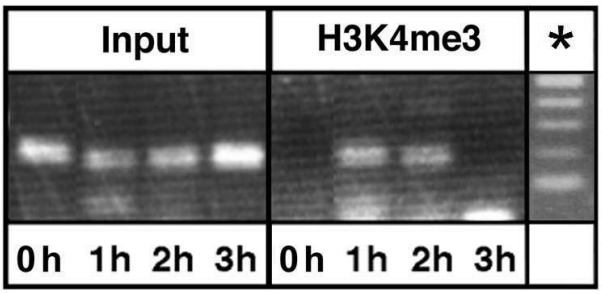

Abbildung 14. Kontrolle der Spezifität der Amplifikate der quantitativen *real-time*-PCR. Abgebildet ist ein 2-prozentiges Agarosegel mit den aufgetrennten PCR-Produkten aus der H3K4me3-ChIP und der jeweils dazugehörigen Kontroll-DNA („Input"). Die Länge der gesuchten Amplifikate betrug in diesem Experiment 191 Basenpaare. Zur Überprüfung der korrekten Amplifikatlänge wurde der „100 base pair marker" (mit * gekennzeichnet) verwendet: Die unterste Bande entspricht einer Länge von 100 Basenpaaren, die oberste einer Länge von 500 Basenpaaren.

3.5 Die Bindung von MeCP2

Zusätzlich zu den posttranslationalen Veränderungen der Histone H3 und H4 wurde untersucht, ob sich nach der Aktivierung von T-Lymphozyten durch IL-4 das Methylierungsmuster der DNA am µ-Opiat-Rezeptor-Promotor ändert. Zu diesem Zweck wurde das Bindungsverhalten von MeCP2 in diesem Bereich im zeitlichen Verlauf analysiert. MeCP2 scheint Einfluss auf die Repression der Genexpression zu besitzen. Es kann an methyliertes Cytosin im DNA-Strang binden und mit Hilfe verschiedener Co-Faktoren eine Histon-Deacetylierung vermitteln. Dies führt vermutlich zu einer stärkeren Kondensation des Chromatins und erschwert den Zugang für Transkriptionsaktivatoren (Nan et al., 1996).

Dafür wurden erneut T-Lymphozyten durch unterschiedlich lange Inkubation mit IL-4 aktiviert. Nach erfolgtem „Shearing" wurden mittels Immunpräzipitation aus den Chromatin-Proben der stimulierten Zellen MeCP2-gebundene DNA-Fragmente isoliert. In der anschließenden quantitativen *real-time*-PCR fand das gleiche Primer-Paar wie in den Versuchen zur Bindung der modifizierten Histone Verwendung.

In Abbildung 15 ist das Bindungsmuster von MeCP2 im Bereich des µ-Opiat-Rezeptor-Promotors im zeitlichen Verlauf dargestellt: In Chromatin aus unstimulierten T-Lymphozyten konnte eine ausgeprägte MeCP2-Bindung nachgewiesen werden. Mit zunehmender Dauer der Stimulation mit IL-4 nahm der Anteil der MeCP2-gebundenen DNA immer weiter ab bis schließlich nach 16 Stunden keine Interaktion zwischen DNA und MeCP2 mehr gefunden wurde.

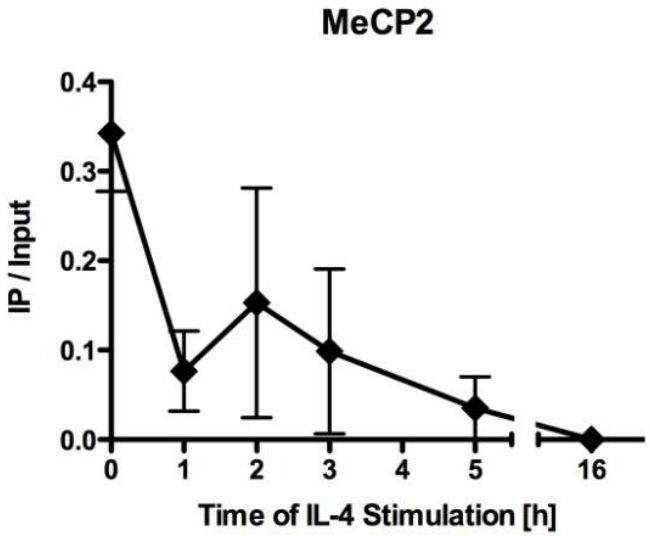

Abbildung 15. Der zeitliche Ablauf der Bindung von MeCP2 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor nach Stimulation mit IL-4. Für die Dauer der jeweils angegebenen Zeiten wurden Jurkat-T-Zellen mit IL-4 stimuliert. Nach der Immunpräzipitation mit MeCP2-bindenden Antikörpern wurde ein Abschnitt des µ-Opiat-Rezeptor-Promotors durch quantitative *real-time*-PCR amplifiziert. Das Diagramm zeigt einen relativen Menge-Vergleich der in den einzelnen Experimenten gewonnenen PCR-Produkte. Dafür wurde die Menge der Amplifikate, die aus dem immunpräzipitierten Chromatin („IP“) gewonnen wurden, zur Menge derer ins Verhältnis gesetzt, die aus den jeweils gleichen Versuchen stammten, jedoch keiner Immunpräzipitation unterzogen wurden („Input-DNA“). Das Diagramm zeigt diese Quotienten als Funktion der Inkubationszeit der T-Zellen mit IL-4. So konnte gezeigt werden, zu welchem Zeitpunkt welcher Anteil der µ-Opiat-Rezeptor-Promotoren MeCP2 gebunden hatte. Die Daten stammen aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten; die einzelnen Standardfehler sind als Balken dargestellt.

3.6 Die Bindung von Brg-1

Abschließend stand das Chromatin-Remodeling im Fokus. Durch die SWI/SNF-Proteinkomplexe, die als katalytische Untereinheit Brg-1 aufweisen, können möglicherweise die Positionen der Nukleosomen am DNA-Strang verändert werden. Dadurch könnte die Bindung zwischen DNA und Histonen destabilisiert und der Zugang für andere

Transkriptionsfaktoren zur Promotorregion erleichtert werden. Dies könnte die Steigerung der Transkriptionsaktivität eines zuvor reprimierten Gens zur Folge haben (Lunning und Green, 2015).

Dieser Theorie folgend wurde der Frage nachgegangen, ob und gegebenenfalls zu welchem Zeitpunkt Brg-1 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor bindet. Analog zu den vorausgegangenen Versuchsreihen wurden Jurkat T-Zellen zwischen einer und 16 Stunden mit IL-4 stimuliert und die Bindung von Brg-1 an die DNA mittels Immunpräzipitation und PCR analysiert. Dabei wurde, wie in Abbildung 16 gezeigt, in unstimulierten T-Lymphozyten und auch nach einstündiger IL-4-Stimulation keine Brg-1-Bindung gefunden. Erstmals dargestellt werden konnte diese nach zwei Stunden; nach dreistündiger Stimulation erreichte sie ihr Maximum. Nach fünf und auch nach 16 Stunden wurde keine Bindung mehr nachgewiesen.

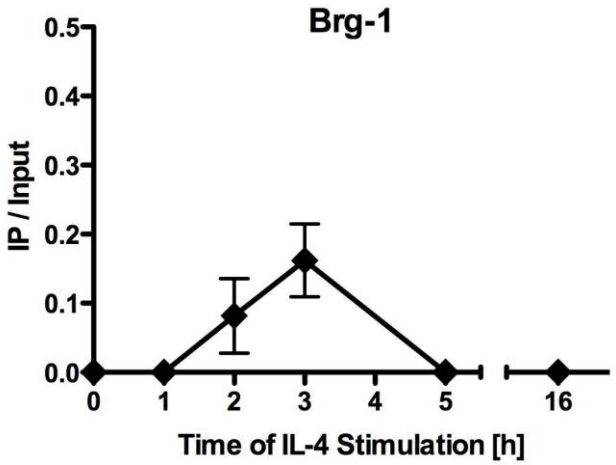

Abbildung 16. Der zeitliche Ablauf der Bindung von Brg-1 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor nach Stimulation mit IL-4. Für die Dauer der jeweils angegebenen Zeiten wurden Jurkat-T-Zellen mit IL-4 stimuliert. Nach der Immunpräzipitation mit Brg-1-bindenden Antikörpern wurde ein Abschnitt des µ-Opiat-Rezeptor-Promotors durch quantitative *real-time*-PCR amplifiziert. Abgebildet ist ein relativer Mengevergleich der PCR-Produkte aus dem immunpräzipitierten Chromatin („IP“), ins Verhältnis gesetzt zur Menge jener Amplifikate, die aus den jeweils gleichen Versuchen stammten, jedoch keiner Immun-präzipitation unterzogen wurden („Input-DNA“). Das Diagramm zeigt diese Quotienten als Funktion der Inkubationszeit der T-Zellen mit IL-4. So konnte gezeigt werden, zu welchem Zeitpunkt welcher Anteil der µ-Opiat-Rezeptor-Promotoren Brg-1 gebunden hatte. Die Daten stammen aus drei voneinander unabhängigen durchgeführten Experimenten; die einzelnen Standardfehler sind als Balken dargestellt.

3.7 Die Ergebnisse im Überblick

In unstimulierten T-Zellen lagen die zytoplasmatische Tyrosinkinase Jak-1 und der Transkriptionsfaktor STAT6 im unphosphorylierten Zustand vor. Bereits nach zehnminütiger Stimulation mit IL-4 konnten deren phosphorylierte Formen **P-Jak-1** und **P-STAT6** nachgewiesen werden. Wie lange die Phosphorylierung Bestand hatte wurde nicht untersucht.

Die Methylierung der DNA spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Genexpression. Das speziell an methyliertes Cytosin in der DNA-Sequenz bindende Kernprotein **MeCP2** scheint eine Hemmung der mRNA-Synthese zu vermitteln. Während in unstimulierten T-Zellen eine hohe Affinität von MeCP2 zur µ-Opiat-Rezeptor-Promotorregion erkennbar war, konnte gezeigt werden, dass bereits 1 Stunde nach Stimulation die Bindungsstärke deutlich reduziert war und im Verlauf weiter abnahm.

Der Transkriptionsfaktor **Brg-1** stellt eine Untereinheit eines Enzymkomplexes dar, der wahrscheinlich die Chromatin-Architektur destabilisieren und dadurch die Genexpression steigern kann. Ohne IL-4-Stimulation lag zunächst keine Bindung von Brg-1 am µ-Opiat-Rezeptor-Promotor vor. Nach drei Stunden erreichte die Affinität ein Maximum, nach fünf Stunden war sie bereits nicht mehr nachweisbar.

Nicht nur der Methylierungsgrad der DNA entscheidet darüber, ob ein bestimmter Bereich für Transkriptionsfaktoren zugänglich ist oder nicht. Auch verschiedene Modifikationen der Histone, wie deren Methylierung, Phosphorylierung oder Acetylierung, können das Ausmaß der Kondensation eines Genabschnitts und damit dessen Transkriptionsaktivität mitbestimmen. Untersucht wurden das an Lysin 4 trimethylierte Histon **H3K4me3**, das an Serin 10 phosphorylierte sowie an Lysin 14 acetylierte Histon **H3S10p/K14ac** sowie das an Lysin 16 acetylierte Histon **H4K16ac**. Die Bindung der modifizierten Histone wurde jeweils nur vorübergehend nach ein- bis und fünfstündiger Stimulation beobachtet.

Durch die Modifikation der lokalen Chromatin-Architektur scheint der Zugang für Transkriptionsfaktoren zu bestimmten Genabschnitten erleichtert zu sein. Untersucht wurde daher auch die Bindung des aktivierten **STAT6** an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor. Diese

war erstmalig nach dreistündiger Stimulation der T-Zellen nachweisbar. Nach fünf Stunden war die Bindungsstärke wieder rückläufig, spätere Zeitpunkte wurden nicht untersucht.

Der Vollständigkeit halber sind im untersten Abschnitt der Abbildung 17 auch Ergebnisse einer Vorarbeit zu diesem Thema dargestellt. Börner und Stumm hatten 2007 den zeitlichen Ablauf der µ-Opiat-Rezeptor-spezifischen **mRNA**-Synthese untersucht und gezeigt, dass bis zu drei Stunden nach IL-4-Stimulation keine µ-Opiat-Rezeptor-spezifischen Transkripte vorlagen. Nach acht und insbesondere nach 16 Stunden hingegen wurden erhebliche Mengen µ-Opiat-Rezeptor-mRNA gefunden.

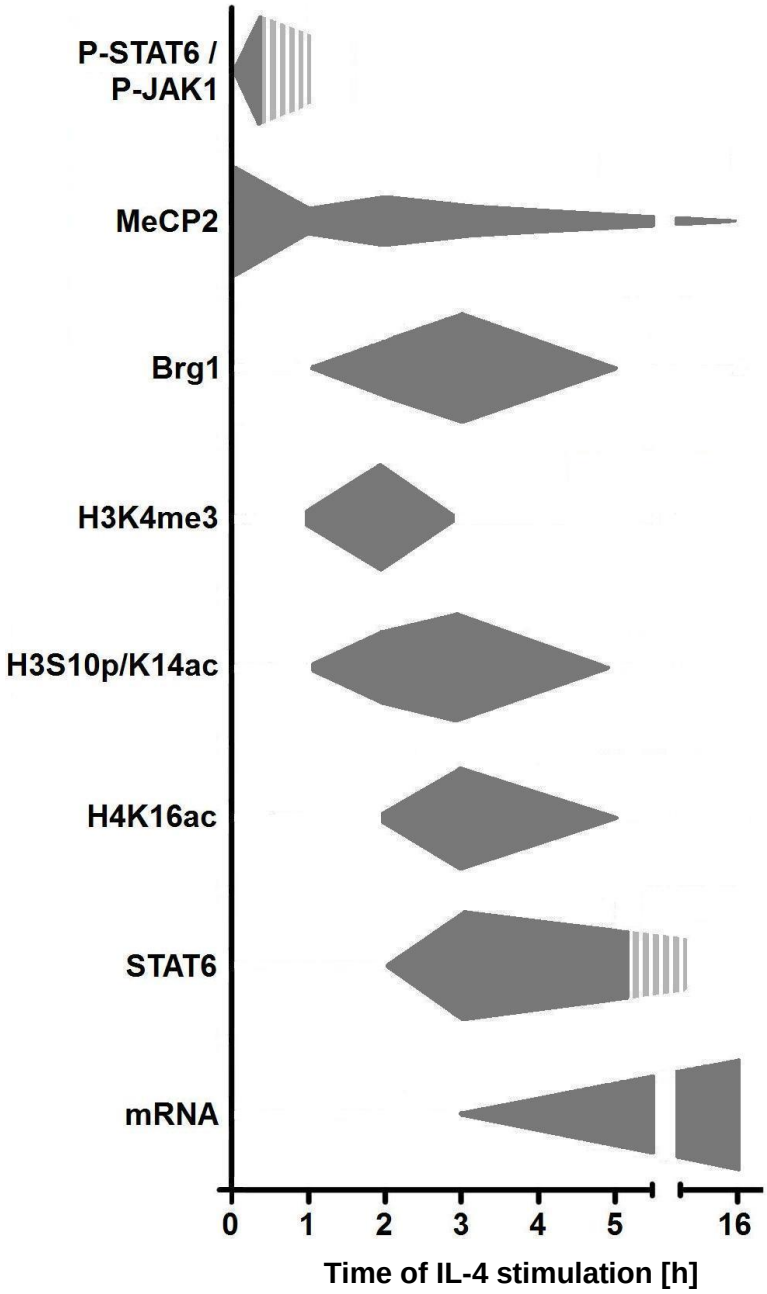

Abbildung 17. Übersicht über alle Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Dargestellt sind verschiedene intrazelluläre Prozesse, die in ihrem zeitlichen Verlauf nach Stimulation von T-Lymphozyten mit IL-4 untersucht wurden. Die Ordinate ist nicht skaliert. Die Breite der abgebildeten Flächen gibt Hinweise auf das Ausmaß der Veränderungen an DNA, Histonen und Transkriptionsfaktoren, welche zu den jeweiligen Zeitpunkten ermittelt wurden. Versuche zur mRNA-Synthese waren nicht Bestandteil dieser Arbeit; jene Ergebnisse stammen aus einer Vorarbeit und wurden für eine bessere zeitliche Einordnung in die Grafik eingefügt. Die gestrichelten Areale wurden nicht untersucht.

4 Diskussion

4.1 Die Aktivierung von STAT6 und Jak-1 durch IL-4

Die pharmakologischen Effekte der in der Medizin relevanten Opiate werden über den µ-Opiat-Rezeptor vermittelt. Dabei ist die Anzahl der Rezeptoren, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden von entscheidender Bedeutung für die Opiat-Wirkung (Brack et al., 2004). Die Regulation dieser Rezeptorexpression wurde in Nervenzellen bereits eingehend untersucht, zum Beispiel durch Chen et al. (1997), Bao et al. (2003) und Wu et al. (2005). Bezüglich der Steuerung in menschlichen Immunzellen ist dagegen bislang wenig bekannt. T-Lymphozyten stellen hierfür ein interessantes Modell dar. Die Expression des µ-Opiat-Rezeptors wird in ruhenden T-Lymphozyten normalerweise gehemmt, kann aber durch verschiedene Faktoren induziert werden (Kraus et al., 2001). IL-4 konnte in T-Zellen der Linie Jurkat als ein solcher Stimulus identifiziert werden (Kraus, 2009). Für die vorliegende Arbeit wurden intrazelluläre Prozesse analysiert, die an der Induktion durch IL-4 beteiligt sein könnten.

Einer der ersten Schritte scheint die Phosphorylierung von STAT6 zu sein. Wie in Abbildung 10 dargestellt, ließ sich diese schon wenige Minuten nach Stimulation der Jurkat-Zellen nachweisen. Der IL-4-Rezeptor besitzt wie viele andere Zytokinrezeptoren mehrere Untereinheiten, unter anderem eine Alpha- und eine Gamma-Kette (Nelms et al., 1999). Die Aktivierung von STAT6 nach Stimulation der Jurkat-Zellen mit IL-4 wird dabei wahrscheinlich durch die Alpha-Einheit des IL-4-Rezeptors vermittelt, da eine Blockade durch den Antagonisten IL-4[R121D,Y124D] die Induktion des µ-Opiat-Rezeptor-Gens verhinderte (Börner et al., 2006). Auch die Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinase Jak-1, die ebenfalls schon nach zehnminütiger IL-4-Stimulation nachgewiesen werden konnte, spielt vermutlich eine Rolle bei der Aktivierung von STAT6. Diese Erkenntnisse lassen sich gut mit den Beobachtungen von Reichel et al. (1997) vereinbaren, die in T-Zellen bei Mäusen zeigen konnten, dass die Aktivierung von STAT6 von den Alpha-Untereinheiten des IL-4-Rezeptors sowie von Jak-1 abhängig ist.

4.2 Chromatin-Remodeling durch Histon-Modifikationen

Die Promotorregion des µ-Opiat-Rezeptor-Gens liegt in ruhenden Zellen vermutlich als dicht gepacktes Heterochromatin vor. Daher ist anzunehmen, dass vor der Genexpression die Chromatin-Architektur in diesem Bereich verändert werden muss. Dabei werden höchstwahrscheinlich auch verschiedene epigenetische Mechanismen wie beispielsweise Histon-Modifikationen wirksam. Diese wurden im Zusammenhang mit der µ-Opiat-Rezeptor-Expression in Zellen des Immunsystems bisher noch nicht eingehend untersucht.

Für die vorliegende Arbeit wurden Veränderungen der Histone analysiert, die in der Literatur mit aktiv transkribierten Genen in Verbindung gebracht werden. Dazu zählen die Trimethylierung des Histons H3 an Lysin 4, H3K4me3 (Li et al., 2006; Sims et al., 2007), die Phosphorylierung des Histons H3 an Serin 10 bei gleichzeitiger Acetylierung an Lysin 14, H3S10p/K14ac (Ebert et al., 2006; Winter et al., 2008) und die Acetylierung des Histons H4 an Lysin 16, H4K16ac (Kuo et al., 1996; Akhtar und Becker, 2000). Wie in Abbildung 13 dargestellt, konnte eine Interaktion zwischen dem µ-Opiat-Rezeptor-Promotor und den modifizierten Histonen nur nach Stimulation der Zellen und auch nur in einem begrenzten Zeitraum nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass diese Histon-Modifikationen auch in T-Lymphozyten am Chromatin-Remodeling beteiligt sind und vermutlich die Transkriptionsaktivität steigern.

Es fielen dabei gewisse Unterschiede im Bindungsverhalten der einzelnen Histone untereinander auf. Ob Histon-Methylierungen grundsätzlich etwas eher ablaufen als Acetylierungen oder Phosphorylierungen, lässt sich aus den vorliegenden Daten nicht sicher ableiten. Auch in der Literatur lassen sich diesbezüglich bisher keine eindeutigen Aussagen finden.

Aus den Versuchen ging außerdem hervor, dass der Anteil der Promotorregionen, bei denen die Bindung von H3S10p/K14ac nachweisbar war, zu jedem der untersuchten Zeitpunkte um mehr als eine Zehnerpotenz niedriger war als der Anteil derjenigen, die die anderen modifizierten Histone gebunden hatten. Dieses Phänomen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Histone unterschiedlich groß und verschieden konfiguriert sind, so dass sich trotz identischer Ausgangsbedingungen stark voneinander abweichende Bindungsaffinitäten ergeben (Cosgrove und Wolberger, 2005). Darüber hinaus könnte auch

der Umstand, dass H3S10p/K14ac im Gegensatz zu H3K4me3 und H4K16ac zeitgleich an zwei Positionen modifiziert ist, erklären, dass sich in der Immun-Präzipitation eine deutlich geringere Bindungsstärke zeigte.

4.3 Histon-Modifikationen durch STAT 6

Es wird davon ausgegangen, dass STAT6 neben seiner Funktion im Jak-STAT-Signalweg auch eine zentrale Rolle für das Chromatin-Remodeling spielt. Es ist bekannt, dass der Expression des für IL-4 codierenden Gens in T-Helfer-Zellen die Aktivierung von STAT6 vorausgeht (Agarwal und Rao, 1998). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass STAT6 und Brg-1 an der Regulation der Differenzierung und Genexpression in T-Helfer-Zellen beteiligt sind (Wurster und Pazin, 2008). Darüber hinaus konnte im Makrophagen-Modell nachgewiesen werden, dass aktivierte STAT6 die Expression einer Demethylase induzieren, die das Histon H3 an Lysin 27 demethylieren und dadurch Einfluss auf die epigenetische Steuerung der Expression anderer Gene nehmen kann (Ishii et al., 2009). Zur Frage, in wie weit STAT6 auch an der Modifikation der Histone H3 und H4 in T-Lymphozyten beteiligt ist, liegen bislang keine Daten vor.

4.4 Die Dauer der Histon-Methylierung

Die Methylierung der Histone wurde in der Vergangenheit als stabil angesehen, als eine Art epigenetisches Programm, welches die Chromatin-Struktur beeinflusst und die Transkription reguliert. Wie jedoch in Abbildung 13 dargestellt, konnte die Bindung des methylierten Histons H3 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor nur in einem auf wenige Stunden nach Stimulation mit IL-4 beschränkten Zeitraum nachgewiesen werden. Die zeitliche Begrenzung bestimmter Histon-Modifikationen wird auch in der Literatur ausführlich diskutiert, zum Beispiel durch Christensen et al. (2007), Ellis et al. (2009) oder Stower (2013). Neuere Untersuchungen deuten sogar darauf hin, dass Veränderungen an Histonen ein fast ausschließlich transientes Phänomen darstellen (Swygert und Peterson, 2014). Diese Hypothese findet weitere Unterstützung durch die Entdeckung spezifischer Histon-Demethylasen. Dazu zählt beispielsweise die Lysin-spezifische Demethylase KDM5, auch

bekannt als „JARID1“, die für die Demethylierung von trimethyliertem (H3K4me3) oder dimethyliertem (H3K4me2) Lysin 4 des Histons H3 verantwortlich ist (Horton et al., 2016).

4.5 Die DNA-Methylierung

Für die vorliegende Arbeit wurde neben den Histon-Modifikationen auch die Bindung des Kernproteins MeCP2 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor in T-Lymphozyten nach IL-4-Stimulation untersucht. Mittels ChIP-Analyse konnte gezeigt werden, dass MeCP2 besonders stark in unstimulierten T-Lymphozyten bindet. Diese Affinität nahm mit zunehmender Stimulationsdauer ab. Ein geringerer Gehalt von MeCP2 im Promotorbereich weist auf einen niedrigeren Methylierungsgrad der DNA hin. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die IL-4-Stimulation eine Demethylierung im Bereich des µ-Opiat-Rezeptor-Promotors zur Folge hat. Die Demethylierung der DNA wird seit längerem mit einer Steigerung der Genexpression in Verbindung gebracht (Wade, 2001).

In der Literatur finden sich vergleichbare Ergebnisse aus Untersuchungen zur Expression des µ-Opiat-Rezeptors in anderen Zelltypen. In embryonalen Teratokarzinomzellen der Linie P19 konnte nach Demethylierung der Promotorregion sowohl eine Abnahme der MeCP2-Bindung als auch eine Steigerung der Genexpression gezeigt werden (Hwang et al., 2007). Auch in Neuronen von Mäusen, in denen initial keine µ-Opiat-Rezeptor-Expression gefunden wurde, konnte diese nach Demethylierung der DNA nachgewiesen werden (Hwang et al., 2009).

Bei der Betrachtung des zeitlichen Ablaufs der Bindung von MeCP2 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor, dargestellt in Abbildung 15, fällt nach einstündiger IL-4-Stimulation ein Knick im Kurvenverlauf auf. Dies ist möglicherweise ein statistischer Effekt aufgrund des geringen Stichprobenumfangs. Es ist auch nicht ausgeschlossen, dass die ChIP-Analysen mit dem Anti-MeCP2-Antikörper etwas anfälliger für störende Einflüsse sind als die Experimente mit den anderen Antikörpern. Dafür würden auch die vergleichsweise großen Standardfehler nach zwei- beziehungsweise dreistündiger Stimulation sprechen. Abgesehen davon ist dennoch ein deutlicher Trend im zeitlichen Verlauf erkennbar, so dass die Ergebnisse dieser Versuchsreihe oben genannte Schlussfolgerung zulassen.

4.6 Die Aktivierung der Transkription durch Brg-1

Ergänzend zu den Versuchen mit MeCP2 wurden Untersuchungen zur Bindung des Transkriptionsregulator-Proteins Brg-1 am Promotor des µ-Opiat-Rezeptor-Gens durchgeführt. Wie in Abbildung 16 dargestellt, lag in unstimulierten T-Lymphozyten zunächst keine Bindung vor. Nach Stimulation der Zellen mit IL-4 konnte eine zeitlich begrenzte Interaktion zwischen Brg-1 und der DNA nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass Brg-1 einen aktivierenden Einfluss auf die Expression des µ-Opiat-Rezeptors in T-Lymphozyten hat.

Diese Aussage ist auch vereinbar mit den Ergebnissen vorausgegangener Experimente zur Bindung von Brg-1 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor in anderen Zelllinien. In Neuronen konnte beispielsweise ebenfalls ein Zusammenhang zwischen einer vermehrten Brg-1-Bindung und einer Steigerung der Genexpression gezeigt werden (Hwang et al., 2010). Laut aktueller Literatur wird durch Brg-1 vermutlich die Position der Nukleosomen verändert und die Anlagerung des Transkriptionskomplexes an den Promotor erleichtert (Meier und Brehm, 2014; Lunning und Green, 2015).

4.7 Die Bindung von STAT6 und die Genexpression

Für diese Arbeit wurden mehrere intrazelluläre Prozesse mit STAT6-Beteiligung analysiert. Zusätzlich zur Phosphorylierung von STAT6 nach Bindung von IL-4 an den entsprechenden Rezeptor wurde auch die Bindung von STAT6 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor im zeitlichen Verlauf untersucht. Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, konnte diese erstmals nach dreistündiger IL-4-Stimulation nachgewiesen werden und damit erst ein bis zwei Stunden nachdem bereits Histon-Modifikationen sowie Veränderungen des DNA-Methylierungsstatus und der Brg-1-Bindung gefunden wurden. Dies gibt Grund zur Annahme, dass jene Mechanismen für die Bindung von STAT6 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor eine Bedeutung haben.

Dazu passen die Ergebnisse der Arbeit von Börner und Stumm (2007), die in Jurkat T-Zellen acht Stunden nach Stimulation mit IL-4 µ-Opiat-Rezeptor-spezifische mRNA nachweisen konnten. In unstimulierten Zellen wurden dagegen keine Transkripte gefunden. Darüber hinaus konnten sie im Anschluss die Expression funktionsfähiger µ-Opiat-Rezeptoren auf den T-Zellen zeigen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Bindung von STAT6 an der Expression des µ-Opiat-Rezeptors beteiligt ist.

5 Zusammenfassung

Opiate besitzen seit vielen hundert Jahren einen sehr hohen medizinischen Stellenwert. Bis heute gehören die stärksten bekannten Analgetika zu dieser Gruppe von Wirkstoffen. Ihre Verwendung im klinischen Alltag ist jedoch durch ihr hohes Missbrauchspotential sowie ihre zahlreichen Nebenwirkungen stark eingeschränkt. Dazu zählt neben der Atemdepression auch die Immunmodulation. Die Kenntnis der Regulation der Expression der µ-Opiat-Rezeptoren auf T-Zellen ist Grundlage für das Verständnis der erwünschten wie auch der unerwünschten Wirkungen der Opiate auf das Immunsystem.

In der vorliegenden Arbeit konnten wesentliche Bestandteile der intrazellulären Signalkaskade aufgeklärt werden, die zur Induktion des µ-Opiat-Rezeptor-Gens in T-Zellen führt. Es konnte dargestellt werden, dass in unstimulierten T-Lymphozyten die zytoplasmatische Tyrosinkinase Jak-1 und der Transkriptionsfaktor STAT6 in unphosphorylierter Form vorliegen. Bereits 10 Minuten nach Stimulation mit IL-4 wurden phosphorylierte Jak-1 und STAT6 gefunden. Letztere translozieren nach dieser Aktivierung zum Zellkern, wo sie die Transkription induzieren können. Am µ-Opiat-Rezeptor-Promotor wurde erstmalig drei Stunden nach Stimulation mit IL-4 eine Bindung von aktiviertem STAT6 nachgewiesen. Nach fünf Stunden war die Bindungsstärke wieder rückläufig.

In weiteren Experimenten wurde der Frage nachgegangen, ob für die Expression des µ-Opiat-Rezeptors in T-Zellen auch epigenetische Mechanismen wie Histon-Modifikationen oder Veränderungen der DNA-Methylierung eine Rolle spielen. Es wurde das Bindungsverhalten des an Lysin 4 trimethylierten Histons H3 (H3K4me3), des an Serin 10 phosphorylierten und an Lysin 14 acetylierten Histons H3 (H3S10p/K14ac) sowie des an Lysin 16 acetylierten Histons H4 (H4K16ac) untersucht. In der Zeit zwischen einer und fünf Stunden nach Stimulation mit IL-4 konnte eine transiente Bindung der modifizierten Histone nachgewiesen werden. In den folgenden Experimenten war in unstimulierten T-Zellen eine hohe Affinität des Kernproteins MeCP2 zur µ-Opiat-Rezeptor-Promotorregion erkennbar. Bereits nach einstündiger IL-4-Stimulation war die Bindungsstärke deutlich reduziert. Abschließend wurden Versuche zur Bindung des Transkriptionsregulator-Proteins Brg-1 durchgeführt. Diese erreichte nach dreistündiger Stimulation ihr Maximum.

Es wurden weitreichende Veränderungen sowohl auf DNA- als auch auf Histon-Ebene gefunden, deren Beginn jeweils nach der Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT6 und vor dessen Bindung an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor beobachtet werden konnte. Dies lässt den Schluss zu, dass an der Expression des µ-Opiat-Rezeptors in T-Lymphozyten epigenetische Mechanismen beteiligt sind.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Struktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors 4

Abb. 2. Der Jak-STAT-Signalweg 6

Abb. 3. Die Struktur der Nukleosomen. 7

Abb. 4. Posttranslationale Modifikationen der Histone 8

Abb. 5. Der Mechanismus der Hemmung der Genexpression durch MeCP2 9

Abb. 6. Das Prinzip der Chromatin-Immunpräzipitation 17

Abb. 7. Komplex aus mit Protein G-beschichtetem Magnetpartikel, Primärantikörper, zu untersuchendem Protein und gebundenem DNA-Fragment 18

Abb. 8. Die PCR-Primer für die ChIP-Analyse der STAT6-Bindung. 22

Abb. 9. Die PCR-Primer für die ChIP-Analyse der Bindung modifizierter Histone 22

Abb. 10. Die Phosphorylierung von Jak-1 und STAT6 nach Stimulation mit IL-4 26

Abb. 11. Die Optimierung der „Shearing“-Dauer 27

Abb. 12. Der zeitliche Ablauf der Bindung von STAT6 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor nach Stimulation mit IL-4 28

Abb. 13. Der zeitliche Ablauf der Bindung der modifizierten Histone H3 und H4 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor nach Stimulation mit IL-4 31

Abb. 14. Kontrolle der Spezifität der Amplifikate der quantitativen *real-time*-PCR 32

Abb. 15. Der zeitliche Ablauf der Bindung von MeCP2 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor nach Stimulation mit IL-4 33

Abb. 16. Der zeitliche Ablauf der Bindung von Brg-1 an den µ-Opiat-Rezeptor-Promotor nach Stimulation mit IL-4 34

Abb. 17. Übersicht über alle Ergebnisse der vorliegenden Arbeit 37

Literaturverzeichnis

Aaronson, DS und CM Horvath. „A road map for those who don't know JAK-STAT.“ *Science*, 2002: 296(5573):1653-5.

Agarwal, S und A Rao. „Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation.“ *Immunity*, 1998: 9(6):765-75.

Akhtar A und PB Becker. „Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in Drosophila.” *Mol Cell,* 2000: 5(2):367-75.

Amir, RE, IB Van den Veyver, M Wan, CQ Tran, U Francke und HY Zoghbi. „Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2.“ *Nat Genet*, 1999: 23(2):185-8.

Back, F. „The variable condition of euchromatin and heterochromatin.“ *Int Rev Cytol*, 1976: 45:25-64.

Ballestar, E und AP Wolffe. „Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression.“ *Eur J Biochem*, 2001: 268(1):1-6.

Bártová, E, J Krejcí, A Harnicarová, G Galiová und S Kozubek. „Histone modifications and nuclear architecture: a review.“ *J Histochem Cytochem*, 2008: 56(8):711-21.

Bao, L, SX Jin, C Zhang, LH Wang, ZZ Xu, FX Zhang, LC Wang, FS Ning, HJ Cai, JS Guan, HS Xiao, ZQ Xu, C He, T Hökfelt, Z Zhou und X Zhang. „Activation of delta opioid receptors induces receptor insertion and neuropeptide secretion.” *Neuron,* 2003: 37(1):121-33.

Berger, SL. „Histone modifications in transcriptional regulation.“ *Curr Opin Genet Dev*, 2002: 12(2):142-8.

Berger, SL. „The complex language of chromatin regulation during transcription.“ *Nature*, 2007: 447(7143):407-12.

Berger, SL. „Molecular biology. The histone modification circus.“ *Science*, 2001: 292(5514):64-5.

Bicknell, RJ. „Endogenous opioid peptides and hypothalamic neuroendocrine neurons”.*J Endocrinol,* 1985: 107(3):437-46.

Biegel JA, TM Busse und BE Weissman. „SWI/SNF chromatin remodeling complexes and cancer.” *Am J Med Genet C Semin Med Genet,* 2014: 166C(3):350-66.

Bird, A. „Perceptions of epigenetics.“ *Nature*, 2007: 447(7143):396-8.

Bode, AM und Z Dong. „Inducible covalent posttranslational modification of histone H3.“ *Sci STKE*, 2005: 2005(281):re4.

Bogdanović, O und GJ Veenstra. „DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function.“ *Chromosoma*, 2009: 118(5):549-65.

Börner, C, B Warnick, M Smida, R Hartig, JA Lindquist, B Schraven, V Höllt und J Kraus. „Mechanisms of opioid-mediated inhibition of human T cell receptor signaling.“ *J Immunol*, 2009: 183(2):882-9.

Börner, C, J Kraus, A Bedini, B Schraven und V Höllt. „T-cell receptor/CD28-mediated activation of human T lymphocytes induces expression of functional mu-opioid receptors.“ *Mol Pharmacol*, 2008: 74(2):496-504.

Börner, C, M Wöltje, V Höllt und J Kraus. „STAT6 transcription factor binding sites with mismatches within the canonical 5'-TTC...GAA-3' motif involved in regulation of delta- and mu-opioid receptors.“ *J Neurochem*, 2004: 91(6):1493-500.

Börner, C, R Stumm, V Höllt und J Kraus. „Comparative analysis of mu-opioid receptor expression in immune and neuronal cells.“ *J Neuroimmunol*, 2007: 188(1-2):56-63.

Börner, C, V Höllt und J Kraus. „Cannabinoid receptor type 2 agonists induce transcription of the mu-opioid receptor gene in Jurkat T cells.“ *Mol Pharmacol*, 2006: 69(4):1486-91.

Bourdeaut, F und I Bièche. „Chromatin remodeling defects and cancer: the SWI/SNF example.” *Bull Cancer,* 2012: 99(12):1133-40.

Bowen, NJ, MB Palmer und PA Wade. „Chromosomal regulation by MeCP2: structural and enzymatic considerations.“ *Cell Mol Life Sci*, 2004: 61(17):2163-7.

Brack, A, HL Rittner, H Machelska, M Shaqura, SA Mousa, D Labuz, C Zollner, M Schafer und C Stein. „ Endogenous peripheral antinociception in early inflammation is not limited by the number of opioid-containing leukocytes but by opioid receptor expression. “ *Pain*, 2004: 108:67–75.

Bromberg, J und JE Darnell Jr. „The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function.“ *Oncogene*, 2000: 19(21):2468-73.

Buck, MJ und JD Lieb. „ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments.“ *Genomics*, 2004: 83(3):349-60.

Chavkin, C, JF Neumaier und E Swearengen. „Opioid receptor mechanisms in the rat hippocampus.“ *NIDA Res Monogr*, 1988: 82:94-117.

Chen, JJ, J Dymshitz und MR Vasko. „Regulation of opioid receptors in rat sensory neurons in culture.“ *Mol Pharmacol,* 1997: 51(4):666-73.

Chen, J, HK Kinyamu und TK Archer „Changes in attitude, changes in latitude: nuclear receptors remodeling chromatin to regulate transcription.“ *Mol Endocrinol*, 2006: 20:1–13.

Christensen, J, K Agger, PA Cloos, D Pasini, S Rose, L Sennels, J Rappsilber, KH Hansen, AE Salcini und K Helin. „RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri- and dimethylated lysine 4 on histone 3.“ *Cell,* 2007: 128(6):1063-76.

Comings, DE. „The structure and function of chromatin.“ *Adv Hum Genet*, 1972: 3:237-431.

Cosgrove MS und C Wolberger. „How does the histone code work?” *Biochem Cell Biol*, 2005: 83(4):468-76.

DeBoer, L. „The opiates and their derivatives.“ *Tex Med*, 1973: 69(6):47-53.

Ebert A, S Lein, G Schotta und G Reuter. „Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in Drosophila.” *Chromosome Res*, 2006: 14(4):377-92

Eisenstein, TK und ME Hilburger. „Opioid modulation of immune responses: effects on phagocyte and lymphoid cell populations.” *J Neuroimmunol,* 1998: 83(1-2):36-44.

Ellis, L, PW Atadja und RW Johnstone. „Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications.” *Mol Cancer Ther,* 2009: 8(6):1409-20.

El-Osta, A und AP Wolffe. „DNA methylation and histone deacetylation in the control of gene expression: basic biochemistry to human development and disease.“ *Gene Expr*, 2000: 9(1-2):63-75.

Evans, CJ, DE Jr Keith, H Morrison, K Magendzo und RH Edwards. „Cloning of a delta opioid receptor by functional expression.“ *Science*, 1992: 258(5090):1952-5.

Fukuda H, N Sano, S Muto und M Horikoshi. „Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression.“ *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2006: 5(3):190-208.

Giangreco, CA, MW Steele, CE Aston, JH Cummins und SL Wenger. „A simplified six-item checklist for screening for fragile X syndrome in the pediatric population.“ *J Pediatr*, 1996: 129(4):611-4.

Grossman, A. „Brain opiates and neuroendocrine function.”*Clin Endocrinol Metab,* 1983: 12(3):725-46.

Hamm, HE. „The many faces of G protein signaling.” *J Biol Chem,* 1998: 273(2):669-72.

Hargreaves, DC und GR Crabtree. „ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms.“ *Cell Res*, 2011: 21(3):396-420.

Hebenstreit, D, J Horejs-Hoeck und A Duschl. „JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines.“ *Drug News Perspect*, 2005: 18(4):243-9.

Heim, MH. „The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus.“ *J Recept Signal Transduct Res*, 1999: 19(1-4):75-120.

Ho, L und GR Crabtree. „Chromatin remodelling during development.“ *Nature*, 2010: 463(7280):474-84.

Hoffbuhr, KC, LM Moses, MA Jerdonek, S Naidu und EP Hoffman. „Associations between MeCP2 mutations, X-chromosome inactivation, and phenotype.“ *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 2002: 8(2):99-105.

Holland-Frei. *Cancer Medicine.* Hamilton (ON): BC Decker, 2003.

Holzapfel, B und L Wickert. „Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. .“ *Biologie in unserer Zeit*, 2007: 37:120–126.

Horton, JR, A Engstrom, EL Zoeller, X Liu, JR Shanks, X Zhang, MA Johns, PM Vertino, H Fu und X Cheng. „Characterization of a linked Jumonji domain of the KDM5/JARID1 family of histone H3 lysine 4 demethylases.” *J Biol Chem,* 2016: 291(6):2631-46.

Hwang CK, CS Kim, HS Choi, SR McKercher und HH Loh. „Transcriptional regulation of mouse mu opioid receptor gene by PU.1.“ *J Biol Chem*, 2004: 279(19):19764-74.

Hwang, CK, CS Kim, K Kim do, PY Law, LN Wei und HH Loh. „Up-regulation of the mu-opioid receptor gene is mediated through chromatin remodeling and transcriptional factors in differentiated neuronal cells.“ *Mol Pharmacol*, 2010: 78(1):58-68.

Hwang, CK, KY Song, CS Kim, HS Choi, XH Guo, PY Law, LN Wei und HH Loh. „Epigenetic programming of mu-opioid receptor gene in mouse brain is regulated by MeCP2 and Brg1 chromatin remodelling factor.“ *J Cell Mol Med*, 2009: 13(9B):3591-615.

Hwang, CK, KY Song, CS Kim, HS Choi, XH Guo, PY Law, LN Wei und HH Loh. „Evidence of endogenous mu opioid receptor regulation by epigenetic control of the promoters.“ *Mol Cell Biol.*, 2007: 27(13):4720-36.

Ishii, M, H Wen, CA Corsa, T Liu, AL Coelho, RM Allen, WF Carson 4th, KA Cavassani, X Li, NW Lukacs, CM Hogaboam, Y Dou und SL Kunkel. „Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype.“ *Blood*, 2009: 114(15):3244-54.

Jackson, DA. „The principles of nuclear structure.“ *Chromosome Res*, 2003: 11(5):387-401.

Janecka, A, J Fichna und T Janecki. „Opioid receptors and their ligands.“ *Curr Top Med Chem*, 2004: 4(1):1-17.

Jayani, RS, PL Ramanujam und S Galande. „Studying histone modifications and their genomic functions by employing chromatin immunoprecipitation and immunoblotting.“ *Methods Cell Biol*, 2010: 98:35-56.

Jenuwein, T und CD Allis. „Translating the histone code.“ *Science*, 2001: 293(5532):1074-80.

Kieffer, BL, K Befort, C Gaveriaux-Ruff und CG Hirth. „The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992: 89(24):12048-52.

Kisseleva, T, S Bhattacharya, J Braunstein und CW Schindler. „Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges.“ *Gene*, 2002: 285(1-2):1-24.

Klockgether-Radke, AP. „F. W. Sertürner and the discovery of morphine. 200 years of pain therapy with opioids.“ *Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 2002: 37(5): 244-9.

Koch, CM, RM Andrews, P Flicek, SC Dillon, U Karaöz, GK Clelland, S Wilcox, DM Beare, JC Fowler, P Couttet, KD James, GC Lefebvre, AW Bruce, OM Dovey, PD Ellis, P Dhami, CF Langford, Z Weng, E Birney, NP Carter, D Vetrie und I Dunham. „The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines.“ *Genome Res*, 2007: 17(6):691-707.

Kokavec, J, J Podskocova, J Zavadil und T Stopka. „Chromatin remodeling and SWI/SNF2 factors in human disease.“ *Front Biosci*, 2008: 13:6126-34.

Kraus, J. „Regulation of mu-opioid receptors by cytokines.“ *Front Biosci (Schol Ed)*, 2009: 1:164-70.

Kraus, J, C Börner, E Giannini und V Höllt. „The role of nuclear factor kappaB in tumor necrosis factor-regulated transcription of the human mu-opioid receptor gene.“ *Mol Pharmacol*, 2003: 64(4):876-84.

Kraus, J, C Borner, E Giannini, K Hickfang, H Braun, P Mayer, MR Hoehe, A Ambrosch, W Konig und V Hollt. „Regulation of mu-opioid receptor gene transcription by interleukin-4 and influence of an allelic variation within a STAT6 transcription factor binding site.“ *J Biol Chem*, 2001: 276(47):43901-8.

Kuhlen, FJ. „History of pain and pain treatment.“ *Pharm Unserer Zeit*, 2002: 31(1):13-22.

Kuo MH, JE Brownell, RE Sobel, TA Ranalli, RG Cook, DG Edmondson, SY Roth und CD Allis. „Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines.” *Nature,* 1996: 383(6597):269-72.

Kwon SJ, JH Park, EJ Park, SA Lee, HS Lee, SW Kang und J Kwon. „ATM-mediated phosphorylation of the chromatin remodeling enzyme BRG1 modulates DNA double-strand break repair.” *J Oncogene*, 2015: 34(3):303-13.

Lachner, M und T Jenuwein. „The many faces of histone lysine methylation.“ *Curr Opin Cell Biol,* 2002: 14(3):286-98.

Laemmli, UK. „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ *Nature*, 1970: 227(5259):680-5.

Li H, S Ilin, W Wang, EM Duncan, J Wysocka, CD Allis und DJ Patel. „Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF.” *Nature,* 2006: 442(7098):91-5.

Lord, JA, AA Waterfield, J Hughes und HW Kosterlitz. „Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors.“ *Nature*, 1977: 267(5611):495-9.

Lüllmann, H, K Mohr und L Hein. *Pharmakologie und Toxikologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2010.

Luger, K, AW Mäder, RK Richmond, DF Sargent und TJ Richmond. „Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution.“ *Nature*, 1997: 389(6648):251-60.

Luger K und TJ Richmond. „DNA binding within the nucleosome core." *Curr Opin Struct Biol,* 1998: 8(1):33-40.

Lunning, MA und MR Green. „Mutation of chromatin modifiers; an emerging hallmark of germinal center B-cell lymphomas." *Blood Cancer J,* 2015: 5:e361.

Lyst, MJ und A Bird. „Rett syndrome: a complex disorder with simple roots" *Nat Rev Genet,* 2015: 16(5):261-75.

Meier K und A Brehm. „Chromatin regulation: how complex does it get?" *Epigenetics,* 2014: 9(11):1485-95.

Marks P, RA Rifkind, VM Richon, R Breslow, T Miller und WK Kelly „Histone deacetylases and cancer: causes and therapies." *Nat Rev Cancer*, 2001: (3):194-202.

Muchardt, C und M Yaniv. „The mammalian SWI/SNF complex and the control of cell growth." *Semin Cell Dev Biol*, 1999: 10(2):189-95.

Nakao, M. „Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin." *Gene*, 2001: 278(1-2):25-31.

Nakao, M, S Matsui, S Yamamoto, K Okumura, M Shirakawa und N Fujita. „Regulation of transcription and chromatin by methyl-CpG binding protein MBD1." *Brain Dev*, 2001: 23 Suppl 1:S174-6.

Nan, X, HH Ng, CA Johnson, CD Laherty, BM Turner, RN Eisenman und A Bird. „Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex." *Nature*, 1998: 393(6683):386-9.

Nan, X, FJ Campoy und A Bird. „MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin." *Cell*, 1997: 88(4):471-81.

Nan, X, P Tate, E Li und A Bird. „DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2." *Mol Cell Biol*, 1996: 16(1):414-21.

Nan, X und A Bird. „The biological functions of the methyl-CpG-binding protein MeCP2 and its implication in Rett syndrome." *Brain Dev*, 2001: 23 Suppl 1:S32-7.

Nelms, K, AD Keegan, J Zamorano, JJ Ryan und WE Paul. „The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions." *Annu Rev Immunol*, 1999: 17:701-38.

Norn, S, PR Kruse und E Kruse. „History of opium poppy and morphine." *Dan Medicinhist Arbog*, 2005: 33:171-84.

Orlando, V und R Paro. „Mapping Polycomb-repressed domains in the bithorax complex using in vivo formaldehyde cross-linked chromatin." *Cell*, 1993: 75(6):1187-98.

Panerai, AE und P Sacerdote. „Beta-endorphin in the immune system: a role at last?" *Immunol Today*, 1997: 18(7):317-9.

Pasternak, GW. „Multiple opiate receptors: [3H]ethylketocyclazocine receptor binding and ketocyclazocine analgesia." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980: 3691-4.

Pert, CB und SH Snyder. „Opiate receptor: demonstration in nervous tissue.“ *Science*, 1973: 179(77):1011-4.

Peterson, CL. „Chromatin remodeling: nucleosomes bulging at the seams.“ *Curr Biol*, 2002: 12(7):R245-7.

Peterson, CL und MA Laniel. „Histones and histone modifications.“ *Curr Biol*, 2004: 14(14):R546-51.

Reichel, M, BH Nelson, PD Greenberg und PB Rothman. „The IL-4 receptor alpha-chain cytoplasmic domain is sufficient for activation of JAK-1 and STAT6 and the induction of IL-4-specific gene expression.“ *J Immunol*, 1997: 158(12):5860-7.

Reik, W. „Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development.“ *Nature*, 2007: 447(7143):425-32.

Richmond, TJ, JT Finch, B Rushton, D Rhodes und A Klug. „Structure of the nucleosome core particle at 7 A resolution.“ *Nature*, 1984: 311(5986):532-7.

Robertson, AG, M Bilenky, A Tam, Y Zhao, T Zeng, N Thiessen, T Cezard, AP Fejes, ED Wederell, R Cullum, G Euskirchen, M Krzywinski, I Birol, M Snyder, PA Hoodless, M Hirst, MA Marra und SJ Jones. „Genome-wide relationship between histone H3 lysine 4 mono- and tri-methylation and transcription factor binding.“ *Genome Res*, 2008: 18(12):1906-17.

Roy, S, RB Chapin, KJ Cain, RG Charboneau, S Ramakrishnan und RA Barke. „Morphine inhibits transcriptional activation of IL-2 in mouse thymocytes.“ *Cell Immunol*, 1997: 179(1):1-9.

Roy, S und HH Loh. „Effects of opioids on the immune system.“ *Neurochem Res*, 1996: 21(11):1375-86.

Sacerdote, P. „Opioid-induced immunosuppression.“ *Curr Opin Support Palliat Care*, 2008: 2(1):14-8.

Sandritter, W. „Functional structures of the cell nucleus. Euchromatin and heterochromatin.“ *Med Welt*, 1970: 1:1-10.

Sharp, BM. „Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling.“ *Brain Behav Immun*, 2006: 9-14.

Sims, RJ 3rd, S Millhouse, CF Chen, BA Lewis, H Erdjument-Bromage, P Tempst, JL Manley und D Reinberg. „Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing.” *Mol Cell,* 2007: 28(4):665-76

Sjöbring, U, L Björck und W Kastern. „Streptococcal protein G. Gene structure and protein binding properties.“ *J Biol Chem*, 1991: 266(1):399-405.

Smith, TW. „The mechanisms of pain and opioid-induced analgesia.“ *Mol Aspects Med*, 1984: 7(6):509-45.

Spencer, VA und JR Davie. „Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression.“ *Gene*, 1999: 240(1):1-12.

Steger, DJ und JL Workman. „Remodeling chromatin structures for transcription: what happens to the histones?“ *Bioessays*, 1996: 18(11):875-84.

Stower, H. „Gene regulation: from genetic variation to phenotype via chromatin.” *Nat Rev Genet,* 2013: 14(12):824.

Strahl, BD und CD Allis. „The language of covalent histone modifications.“ *Nature*, 2000: 403(6765):41-5.

Swygert SG und CL Peterson. „Chromatin dynamics: interplay between remodeling enzymes and histone modifications.” *Biochim Biophys Acta,* 2014: 1839(8):728-36.

Teif, VB und K Rippe. „Predicting nucleosome positions on the DNA: combining intrinsic sequence preferences and remodeler activities.” *Nucleic Acids Res,* 2009: 37(17):5641-55.

Thomas, PT, RV House und HN Bhargava. „Direct cellular immunomodulation produced by diacetylmorphine (heroin) or methadone.“ *Gen Pharmacol*, 1995: 26(1):123-30.

Tikhonova, IG und S Costanzi. „Unraveling the structure and function of G protein-coupled receptors through NMR spectroscopy.“ *Curr Pharm Des*, 2009: 15(35):4003-16.

Trotter KW und TK Archer. „Nuclear receptors and chromatin remodeling machinery.“ *Mol Cell Endocrinol*, 2007: 265-266:162-7.

Trotter KW und TK Archer. „The BRG1 transcriptional coregulator.“ *Nucl Recept Signal*, 2008: 6:e004.

Wade, PA. „Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression.“ *Bioessays*, 2001: 23(12):1131-7.

Waldhoer, M, SE Bartlett und JL Whistler. „Opioid receptors.“ *Annu Rev Biochem*, 2004: 73:953-90.

Wang J, RA Barke und S Roy. „Transcriptional and epigenetic regulation of interleukin-2 gene in activated T cells by morphine.“ *J Biol Chem*, 2007: 282(10):7164-71.

Williamson, SL und J Christodoulou. „Rett syndrome: new clinical and molecular insights.“ *Eur J Hum Genet*, 2006: 14(8):896-903.

Winter S, E Simboeck, W Fischle, G Zupkovitz, I Dohnal, K Mechtler, G Ammerer und C Seiser. „14-3-3 proteins recognize a histone code at histone H3 and are required for transcriptional activation.” *EMBO J*, 2008: 27(1):88-99.

Wolffe, AP. „Epigenetics. Introduction.“ *Novartis Found Symp*, 1998: 214:1-5.

Wolffe, AP und MA Matzke. „Epigenetics: regulation through repression.“ *Science*, 1999: 286(5439):481-6.

Wu, ZQ, M Li, J Chen, ZQ Chi und JG Liu. „Involvement of cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway in regulation of Na+,K+-ATPase upon activation of opioid receptors by morphine.” *Mol Pharmacol,* 2006: 69(3):866-76.

Wurster, AL und MJ Pazin. „BRG1-mediated chromatin remodeling regulates differentiation and gene expression of T helper cells.“ *Mol Cell Biol*, 2008: 28(24):7274-85.

Xu X und L Pozzo-Miller. „A novel DNA-binding feature of MeCP2 contributes to Rett syndrome.” *Front Cell Neurosci,* 2013: 7:64.

Yoo, AS und GR Crabtree. „ATP-dependent chromatin remodeling in neural development.“ *Curr Opin Neurobiol*, 2009: 19(2):120-6.

Zhang, A, CH Shen, SY Ma, Y Ke und A El Idrissi. „Altered expression of Autism-associated genes in the brain of Fragile X mouse model.“ *Biochem Biophys Res Commun*, 2009: 379(4):920-3.

Danksagung

Ich bedanke mich an erster Stelle bei Herrn Prof. Dr. med. Volker Höllt, dass er es mir ermöglicht hat, diese Arbeit an dem unter seiner Leitung stehenden Institut zu erstellen.

Daneben gilt mein ausdrücklicher Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Jürgen Kraus für die freundliche Überlassung des Themas sowie insbesondere für seine stets verfügbare und äußerst hilfreiche Unterstützung bei der experimentellen Arbeit.

Bei Frau Dr. med. Christine Börner bedanke ich mich sehr für die Einführung in die Laborarbeit sowie für die Hilfe bei der Lösung technischer Schwierigkeiten.

Mein Dank gilt außerdem Frau Helga Tischmeyer für ihre wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Zellkultur.

Nicht zuletzt möchte ich von Herzen meiner Freundin sowie meiner Familie für die mentale Unterstützung danken, ohne die diese Arbeit mit Sicherheit nicht möglich gewesen wäre.

Ehrenerklärung

Ich, Lienhard Lehmann, erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Epigenetische Mechanismen der IL-4-vermittelten Induktion des µ-Opiat-Rezeptor-Gens in T-Lymphozyten“

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie mit Unterstützung durch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Jürgen Kraus ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg / 24. Juni 2016

…….

Darstellung des Bildungsweges

Jakob Lienhard Lehmann
geboren am 06.08.1984 in Dresden

Schulbildung

1991 – 1995	56. Grundschule in Dresden
1995 – 2001	Lössnitzgymnasium in Radebeul
2001 – 2002	Sixth Form College in York, GB
2002 – 2004	Katholisches St.-Benno-Gymnasium in Dresden
Juni 2004	Abitur (Note: 1,4)

Hochschulstudium

2004 – 2011	Humanmedizin an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
August 2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)
November 2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: 2,3)
22.11.2010	Approbation als Arzt

Ärztliche Tätigkeit

Seit 01.09.2011	Arzt in Weiterbildung an der Universitätskinderklinik der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Prof. Dr. med. G. Jorch

Magdeburg / 24. Juni 2016

……