

**Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie  
der Universität Würzburg**

**Vorstand: Professor Dr. med. Wolfgang Kastenmüller**

**Effekt der  
Interleukin-1 Rezeptor-assoziierten Kinase 2 (IRAK2)-Mutation N333D  
auf den Signalweg von TLR4**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Michael Ludwig Zölch  
aus Winhöring**

**Würzburg, August 2018**

**Referent:** Professor Dr. rer. nat. Ingolf Berberich  
**Korreferent:** Professor Dr. rer. nat. Alexander Buchberger  
**Dekan:** Professor Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2019**

**Der Promovend ist Zahnarzt**

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem .....	1
1.1.2	Das adaptive Immunsystem.....	2
1.2	Erkennung von Pathogenen .....	3
1.3	Toll-like Rezeptoren.....	4
1.3.1	Überblick über TLRs .....	4
1.3.2	Signalwege der TLRs und deren Auswirkungen .....	4
1.3.3	Der MyD88-abhängige Signalweg .....	6
1.3.4	Der MyD88-unabhängige Signalweg.....	8
1.4	IRAK2 als wichtige Komponente des TLR-Signalwegs .....	8
1.4.1	Grundsätzlicher Aufbau der IRAKs .....	8
1.4.2	Die jeweilige Funktion der einzelnen IRAKs.....	9
1.4.3	Aktuelles Wissen über die Funktion der Kinaseaktivität von IRAK2 .....	10
1.5	Regulierung der TLR .....	11
1.5.1	Post-transkriptionelle Regulierungen .....	11
1.5.2	Mechanismus der Ubiquitinierung.....	12
1.6	Mit TLR-verbundene Krankheiten.....	13
1.7	Ziel der Doktorarbeit.....	14
2	Material und Methoden .....	16
2.1	Material .....	16
2.1.1	Antibiotika.....	16
2.1.2	Antikörper .....	16
2.1.3	Bakterien .....	16
2.1.4	Chemikalien.....	17
2.1.5	Enzyme .....	18
2.1.6	Inhibitoren.....	18
2.1.7	Kits .....	18
2.1.8	Oligonukleotide.....	19
2.1.9	Plasmide bzw. Vektoren .....	19
2.1.10	Puffer und Lösungen .....	20
2.1.11	Geräte .....	20
2.1.12	Zellkulturen und zugehörige Nährmedien .....	21
2.2	Zelluläre Methoden.....	22

2.2.1	Ermittlung der Zellzahl .....	22
2.2.2	Kultivierung der Zelllinien.....	22
2.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	22
2.2.4	Transfektion und Transduktion.....	23
2.2.5	Durchflusszytometrie/ Anreicherung erfolgreich infizierter Zellen .....	24
2.2.6	Stimulation.....	25
2.3	Molekularbiologische Methoden: Klonierung .....	25
2.3.1	Prinzip der PCR.....	26
2.3.2	Verwendung der PCR für die ortsspezifische Mutagenese .....	26
2.3.3	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen .....	27
2.3.4	Isolation von DNA aus Agarosegelen.....	28
2.3.5	Restriktionsverdau und Ligation von Insert und Vektoren .....	28
2.3.6	Transformation von Bakterien .....	29
2.3.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen: Mini-Präparation .....	29
2.3.8	Sequenzierung mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	29
2.3.9	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen: Midi-Präparation .....	30
2.3.10	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	30
2.4	Proteinbiochemische Methoden .....	31
2.4.1	Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten .....	31
2.4.2	Denaturierende SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page) .....	31
2.4.3	Western Blotting .....	32
2.4.4	Immunologische Detektion mittels Antikörper .....	33
2.5	Statistische Analyse von Daten .....	33
3	Ergebnisse .....	34
3.1	Induktion der CD40-Expression wildtypischer RAW 264.7 Makrophagen ....	34
3.2	Rekonstitution von IRAK2-defizienten Zellen mit IRAK2 wt .....	36
3.3	Klonierung von Plasmiden mit IRAK2-Mutationen .....	38
3.3.1	Klonierung eines Plasmids mit der Mutation IRAK2[N333D] .....	38
3.3.2	Expression verschiedener IRAK2-Mutanten in RAW Sc17-Zellen.....	39
3.4	Western Blots: Expression der IRAK2-Mutanten .....	40
3.5	Effekt von IRAK2[N333D] auf das NF- $\kappa$ B-System .....	41
3.5.1	Messung der NF- $\kappa$ B-Expression .....	43
3.5.2	Analyse eines weiteren IRAK2-defizienten Zellklons: RAW Sc12 .....	44
3.5.3	Kinetik der CD40-Expression.....	46
4	Diskussion.....	48

4.1	Nachweis der geringeren Aktivität von IRAK2[N333D] im Vergleich zu IRAK2 wt.....	49
4.2	Mögliche Gründe für die geringere Aktivität von IRAK2[N333D] .....	50
4.3	Vergleichskontrollen: IRAK2[K235S] und IRAK2[E525A].....	52
4.4	Bewertung der Expressionskontrolle der IRAK2-Mutanten .....	53
4.5	Erhöhte Signalleitung durch die entwicklungsgeschichtlich erfolgte Veränderung des aktiven Zentrums von IRAK2.....	54
5	Zusammenfassung.....	55
6	Abbildungsverzeichnis .....	57
7	Tabellenverzeichnis .....	58
8	Abkürzungsverzeichnis .....	59
9	Literaturverzeichnis .....	63
10	Anhang .....	68

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Die Zellen und Moleküle, die dem Körper Schutz vor infektiösen Krankheiten bieten, bilden zusammen das Immunsystem. Ihre koordinierte Reaktion auf den Kontakt mit Mikroorganismen, die als „fremd“ erkannt werden, wird als Immunantwort bezeichnet (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2018). Da unter bestimmten Bedingungen auch körpereigene Strukturen zu einer dann als „autoimmun“ bezeichneten Antwort führen können, kommt dem Vorgang der Erkennung und der Unterscheidung von Fremdem und Eigenem besondere Bedeutung zu. Diese Unterscheidung führt zu einem fragilen Gleichgewicht, dessen Aufrechterhaltung durch ein komplexes Zusammenspiel der verschiedenen Komponenten versucht wird. Vereinfacht lassen sich die Komponenten in zwei Bereiche einteilen: Das angeborene und das adaptive (erworbene) Immunsystem.

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das phylogenetisch gesehen ältere, angeborene Immunsystem dient als erste Verteidigungslinie und ist für die Abwehr von Pathogenen in den ersten Stunden und Tagen nach einer Infektion essentiell. Als erster Schritt der Abwehrstrategie sind epitheliale Barrieren wie die Haut vorgesehen, die schon das Eindringen von Mikroben verhindern sollen (Murphy & Weaver, 2017; Owen, Punt, Stranford, & Kuby, 2013). Alle Mikroben, die diese erste Barriere überwinden, werden anhand von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP), also spezifischen Strukturmotiven, erkannt. Die Erkennung erfolgt durch Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR), die von Makrophagen, Neutrophilen und dendritischen Zellen exprimiert werden (Abbas et al., 2018; Murphy & Weaver, 2017). Eine der Reaktionen des angeborenen Immunsystems auf das Erkennen von eingedrungenen Pathogenen ist die Induktion einer Entzündungsreaktion. Durch Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen werden weitere Zellen des angeborenen Immunsystems aus dem Blut zum betroffenen Gewebe rekrutiert, um die eingedrungenen Pathogene mittels Phagozytose zu beseitigen. Die klinischen Anzeichen einer Entzündung

beruhen auf den Auswirkungen von Zytokinen oder anderen inflammatorischen Vermittlern auf die lokalen Blutgefäße (Murphy & Weaver, 2017). Es kommt aber nicht immer zu einer Entzündungsreaktion, da das Verhindern einer viralen Replikation und das Abtöten von mit Viren infizierten Zellen oft auch ohne eine Entzündungsreaktion bewerkstelligt werden kann (Abbas et al., 2018).

### **1.1.2 Das adaptive Immunsystem**

Zum adaptiven Immunsystem zählen die B- und T-Lymphozyten (B- und T-Zellen) sowie die von ihnen produzierten Effektormoleküle. Im Gegensatz zu Makrophagen, Neutrophilen und dendritischen Zellen der angeborenen Immunität, die auf eine eher begrenzte Anzahl von keimbahnkodierten Rezeptoren zurückgreifen, besitzen die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems ein riesiges Repertoire an Rezeptoren, die von rekombinierenden Gensegmenten kodiert werden und so eine große Vielfalt von Antigenen spezifisch erkennen können (Murphy & Weaver, 2017). Diese Antigenrezeptoren werden entsprechend ihrer Zellzugehörigkeit als B- und T-Zell Rezeptoren (BCR, TCR) bezeichnet. Die Antigene werden den T-Zellen auf MHC (*major histocompatibility complex*)-Molekülen von Makrophagen, dendritischen Zellen, aber auch von B-Zellen präsentiert. Im Gegensatz zu den T-Zellen sind B-Zellen mit ihrem BCR nicht auf die Präsentation von Antigenen durch andere Zellen angewiesen, sondern erkennen auch lösliche Antigene. Nach dem Erkennen von Antigen wird in beiden Lymphozytenarten eine hochspezifische Antwort ausgelöst, die bei T-Zellen zur Produktion von Zytokinen, bei B-Zellen unter anderem zur Sekretion von Antikörpern dient. Die Zytokine koordinieren die Immunantwort, während die Antikörper zur Opsonierung und Neutralisation der Pathogene führen (Owen et al., 2013).

Damit es überhaupt zur vollen Aktivierung der Lymphozyten kommen kann, braucht es neben dem Erkennen von Antigen als zweites Signal wiederum Moleküle des angeborenen Systems wie Kostimulatoren und Zytokine. Hier zeigt sich, dass angeborenes und adaptives Immunsystem nicht isoliert zu betrachten sind und Fehlregulationen in beiden Systemen zu chronischen Infektionen führen können (Abbas et al., 2018).

Eine weitere Besonderheit des adaptiven Immunsystems ist die Bildung eines „Gedächtnisses“. Damit ist gemeint, dass der Körper als Reaktion beim ersten Kontakt mit einem Antigen langlebige Gedächtniszellen ausbildet, die für das Antigen spezifisch sind. Dies führt dazu, dass die sekundäre Immunantwort bei weiteren Kontakten mit demselben Pathogen schneller und effizienter erfolgen kann. Auf diese exklusive Anpassungsfähigkeit verweist auch der Name des *adaptiven* Immunsystems (Abbas et al., 2018; Owen et al., 2013).

Insgesamt zeigt sich, dass nur ein adäquates Zusammenspiel aus verzögerter, aber hochspezifischer adaptiver Immunantwort und sofort verfügbarer angeborener Immunität den Körper ausreichend vor Pathogenen schützen kann.

## 1.2 Erkennung von Pathogenen

Die verschiedenen Arten von Pathogenen wie Viren, Pilze und gramnegative/grampositive Bakterien besitzen alle spezifische PAMPs. Diese Strukturmerkmale, wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS) auf gramnegativen Bakterien, sind für sie überlebenswichtig und deswegen unveränderlich (invariant). Da sie zudem nicht von Zellen von Säugetieren synthetisiert werden, eignen sie sich als perfektes Erkennungsmerkmal für das angeborene Immunsystem (Abbas et al., 2018; Medzhitov & Janeway, 1997). Zu den wichtigsten für die Erkennung zuständigen PRRs gehören die Familien der Toll-like Rezeptoren (TLRs), NOD-like Rezeptoren (NLRs) und RIG-I-like Rezeptoren (RLRs) (Iwasaki & Medzhitov, 2015; Kawasaki & Kawai, 2014). Die verschiedenen PRRs werden auf Zelloberflächen oder in intrazellulären Kompartimenten exprimiert, können aber auch in die Blutbahn oder in Gewebsflüssigkeiten sezerniert werden. Das Bemerkenswerte dabei ist, dass Pathogene wie Viren, Bakterien und Pilze, die aus phylogenetischer Sicht zwar strukturell sehr verschieden sind, trotzdem von nur auf den ersten Blick verschiedenen, aber eigentlich überraschend ähnlichen Mechanismen der PRR erkannt werden (Akira, Uematsu, & Takeuchi, 2006). Die Funktionen von PRR beinhalten neben der Aktivierung proinflammatorischer Signalwege Oponierung, Aktivierung von Komplement, Phagozytose und die Induktion von Apoptose (Janeway & Medzhitov, 2002).



## 1.3 Toll-like Rezeptoren

### 1.3.1 Überblick über TLRs

Als erste Familie der PRRs wurden 1997 die TLRs beschrieben. Ihren Namen erhielten sie aufgrund der Ähnlichkeit zum „Toll“-Protein der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Medzhitov & Janeway, 1997). Bisher besteht die TLR-Familie aus 10 Mitgliedern (TLR1-TLR10) beim Menschen und 12 bei der Maus (TLR1-TLR9, TLR11-TLR13), wovon die TLR 1-9 bei beiden konserviert sind. Man kann sie anhand ihrer Lokalisation in der Zelle in zwei Kategorien einteilen: Die in der Plasmamembran lokalisierten TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und die in intrazellulären Kompartimenten wie Endosomen lokalisierten TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9. Die TLRs an der Zelloberfläche erkennen hauptsächlich mikrobielle Membrankomponenten wie Lipide, Lipoproteine und Proteine, wohingegen die intrazellulären TLRs gegen Nukleinsäuren von Bakterien und Viren gerichtet sind. Die TLRs werden nicht nur von Zellen des angeborenen Immunsystems wie dendritischen Zellen und Makrophagen, sondern auch von Lymphozyten, Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert (Kawasaki & Kawai, 2014; O'Neill, 2008).

Alle TLRs sind Transmembran-verankerte Glykoproteine, bestehend aus 16-18 extrazellulär lokalisierten Leucin-reichen Sequenzen (*Leucine-rich repeats*, LRRs), die die PAMP-Erkennung bewerkstelligen. Eine zytoplasmatische Toll/IL-1 Rezeptor (TIR)-Domäne initiiert den folgenden Signalweg. Dessen Hauptfunktion ist die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die zu einer Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und Typ-I Interferonen (IFNs) führen (Abbas et al., 2018).

### 1.3.2 Signalwege der TLRs und deren Auswirkungen

Die Aktivierung der TLRs durch PAMPs führt zur deren Homo- bzw. Heterodimerisierung (TLR1/2, TLR2/6) und daraufhin zur Rekrutierung von einem oder mehreren von insgesamt 5 Adaptermolekülen mit TIR-Domänen: *Myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88), *MyD88 adaptor-like* (MAL), *TIR-domain containing adaptor inducing IFN- $\beta$*  (TRIF), *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) und *sterile- $\alpha$  armadillo motif containing protein*

(SARM) (S. Flannery & Bowie, 2010; Mogensen, 2009). Welches der Adaptermoleküle zum Einsatz kommt, ist abhängig davon, welcher TLR stimuliert wird.

MyD88 kommt in allen von TLRs stimulierten Signalkaskaden vor. Die einzige Ausnahme bildet der TLR3, der nur TRIF als Adaptermolekül benutzt. TLR4 ist der einzige TLR, beim dem die Signalübertragung über beide Signalwege erfolgen kann. Die Signalwege werden auf der Basis der beiden Adapter in einen MyD88-abhängigen und den MyD88-unabhängigen eingeteilt (Kawasaki & Kawai, 2014). Abbildung 1 zeigt schematisch die unterschiedlichen Abläufe im TLR4.

Alle initiierten Signalwege enden in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Die wichtigsten dabei sind NF- $\kappa$ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), AP1 (*activation protein*), IRF3 und IRF7 (*interferon response factors*). NF- $\kappa$ B und AP1 stimulieren die Expression von Genen, die für entzündungsfördernde Moleküle wie die Zytokine Interleukin-1 und 6 (IL1, IL6), Tumornekrosefaktor (TNF) sowie Chemokine kodieren. Dagegen fördern IRF3 und IRF7 die Produktion von Typ-I Interferonen, die für die antivirale Immunantwort wichtig sind (Abbas et al., 2018). Neben der gesteigerten Produktion von Zytokinen und Chemokinen kommt es auch zur erhöhten Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD40 (*cluster of differentiation*), CD80 und CD86 auf Makrophagen und dendritischen Zellen (Qin, Wilson, Lee, Zhao, & Benveniste, 2005). Dies führt u.a. zu einer gesteigerten Aktivierung von T-Zellen und damit der adaptiven Immunantwort.

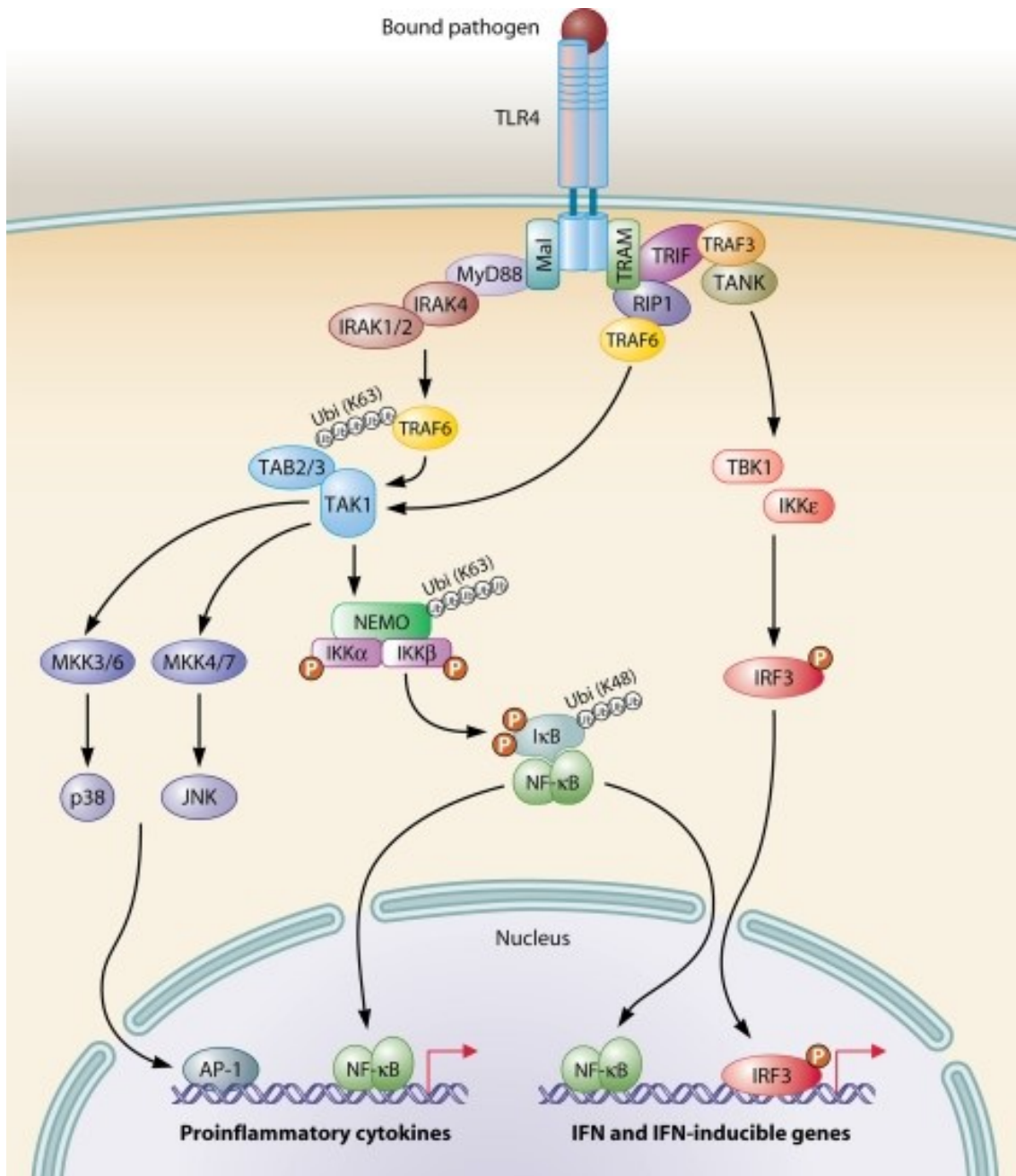


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Signalwegs des TLR4. Er besitzt sowohl eine MyD88-abhängige als auch eine MyD88-unabhängige Komponente. Detaillierte Erklärung im Text. Quelle: Mogensen, 2009 (© 2009, American Society for Microbiology, Abdruckgenehmigung wurde erteilt).

### 1.3.3 Der MyD88-abhängige Signalweg

Als Antwort auf die Stimulation von TLR4 durch einen geeigneten Liganden wie LPS assoziiert MyD88 mit dem zyttoplasmatischen Anteil des Rezeptors über seine TIR-Domäne (Abbildung 1). Neben der für die Bindung an den TLR wichtigen TIR-Domäne besitzt MyD88 eine N-terminale *death*-Domäne (DD). Über diese DD erfolgt die anschließende Interaktion von MyD88 mit den

Mitgliedern der IL-1 Rezeptor-assoziierten Kinase (IRAK)-Familie. Diese besteht aus insgesamt 4 Proteinen, die einen ähnlichen Aufbau aufweisen und hochkonserviert in ihrer Kinase-Domäne und DD sind. Der gemeinsame Komplex der IRAKs mit MyD88 wird als Myddosome bezeichnet (Lin, Lo, & Wu, 2010). Die Bildung des Myddosomes erfolgt hierarchisch: MyD88 rekrutiert IRAK4 und durch den MyD88:IRAK4-Komplex werden IRAK1 oder IRAK2 rekrutiert. Die Formation des Komplexes bringt die Kinase-Domänen der IRAKs in Reichweite für Phosphorylierungen. Die Phosphorylierung von IRAK4 führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von IRAK1/2, wodurch diese wieder vom Myddosome-Komplex dissoziieren können (Jain, Kaczanowska, & Davila, 2014; Kawasaki & Kawai, 2014).

IRAK1 oder IRAK2 assoziieren nun mit dem Ubiquitin-ligierenden Enzym (E3) TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*). TRAF6 synthetisiert zusammen mit Ubiquitin-konjugierenden Enzymen (E2) K63-verlinkte Polyubiquitinketten an sich selbst und an andere Substratproteine wie TAK1 (*transforming growth factor-activated protein kinase 1*). Ein zentraler Schritt in dem Signalweg ist das Rekrutieren von TAK1-bindendem Protein 2 (TAB2) und TAB3 an ubiquitiniertes TRAF6. Auf diese Weise wird TAK1 zum Signalkomplex gebracht, wobei bisher nicht geklärt ist, ob die folgende Aktivierung von TAK1 durch K63-Ubiquitinierung oder Phosphorylierung erfolgt (Cohen, 2014; Kawasaki & Kawai, 2014). TAK1 aktiviert dann zwei weitere Pfade: den MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) und den IKK (Inhibitor der kappa-B Kinase) Signalweg.

Im ersten Signalweg phosphoryliert TAK1 Mitglieder der MAPK-Familie, einschließlich MKK3, 4, 6 und 7. MKK3/6 phosphorylieren und aktivieren p38, wohingegen MKK4/7 JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) aktiviert. Schließlich führen diese Signalwege zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP1 (Mogensen, 2009; Owen et al., 2013).

Der IKK-Komplex besteht aus zwei strukturell ähnlichen Kinasen, IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ , sowie dem regulatorischen Adapter IKK $\gamma$ , der auch unter dem Namen NEMO (*NF-kappa-B essential modulator*) bekannt ist. Die Ubiquitinierung von NEMO erfolgt direkt durch TRAF6 und LUBAC (*linear ubiquitination chain assembly*

*complex*), einem Komplex mit E3-Ligase-Funktion (detaillierte Erläuterung Kapitel 1.5.2) (Fujita et al., 2014). Die TAK1-vermittelte Aktivierung des IKK-Komplexes führt zur Phosphorylierung des NF- $\kappa$ B-Inhibitor-Proteins I $\kappa$ B und zu dessen proteasomaler Degradierung. Dieser Abbau der inhibitorischen Untereinheit erlaubt den regulatorischen NF- $\kappa$ B-Einheiten in den Zellkern zu wandern, wo sie an  $\kappa$ B-Elementen von Promotoren ausgewählter proinflammatorischer Gene binden, welche dann exprimiert werden (S. Flannery & Bowie, 2010; Kawagoe et al., 2008).

#### **1.3.4 Der MyD88-unabhängige Signalweg**

Den MyD88-unabhängigen Signalweg gibt es, wie oben erwähnt, nur bei den endosomalen TLR3 und TLR4. Statt MyD88 ist hier TRIF das zum TLR rekrutierte Adaptermolekül (Abbildung 1). Die von TRIF rekrutierten Proteinkinasen sind RIPK1 (*receptor-interacting serine/threonine protein kinase1*) sowie die IKK-ähnlichen Kinasen TBK1 (*TANK-binding kinase1*) und IKK $\epsilon$ . Die TRIF-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B erfolgt ab der Bindung von TRIF/RIPK1 an TRAF6 über dieselbe Signalkaskade wie beim MyD88-abhängigen Weg. Neben NF- $\kappa$ B werden auch die für die antivirale Immunantwort wichtigen Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 aktiviert. Die Aktivierung ist die Folge einer Phosphorylierung durch TBK1 und IKK $\epsilon$ . Insgesamt zeigt sich, dass die wichtige Expression von proinflammatorischen Molekülen über NF- $\kappa$ B MyD88-abhängig oder MyD88-unabhängig erfolgen kann (Kawai & Akira, 2010; Mogensen, 2009).

### **1.4 IRAK2 als wichtige Komponente des TLR-Signalwegs**

#### **1.4.1 Grundsätzlicher Aufbau der IRAKs**

Wie bereits erwähnt, zeigen alle vier IRAKs einen ähnlichen Aufbau und sind wichtige Regulatoren der Signalwege der TLRs. So haben sie einen Einfluss auf die Regulation von Entzündungsreaktionen, die antivirale Antwort, die Aktivierung der adaptiven Immunantwort und die Kontrolle von autoimmunen und entzündlichen Krankheiten. Wie Abbildung 2 zeigt, bestehen sie aus einer N-terminalen DD, einer ProST-Domäne, einer konservierten Kinase-Domäne und einer C-terminalen Domäne (außer IRAK4) (Jain et al., 2014; Rhyasen &

Starczynowski, 2015). Über die DD können die IRAKs mit anderen Signalmolekülen wie dem vorgeschalteten MyD88 interagieren. Die ProST-Domäne ist reich an Prolin, Serin und Threonin und z.B bei IRAK1 der Ort, an dem die Autophosphorylierungen erfolgen. Die zentrale Kinase-Domäne beinhaltet eine Aktivierungsschleife. Zudem gibt es ein invariantes Lysin in der ATP-bindenden Tasche, welches kritisch für die katalytische Aktivität ist. Die C-terminale Domäne ist zuletzt wichtig für die Interaktion mit TRAF6 (S. Flannery & Bowie, 2010; Jain et al., 2014).

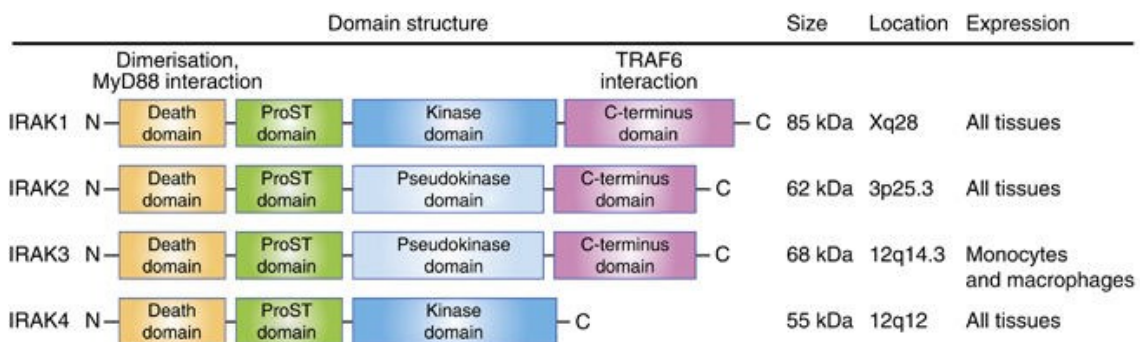


Abbildung 2: Struktureller Aufbau der IRAKs, sowie die Unterschiede der einzelnen Proteine in Größe, Expressionsort und –muster.

Quelle: Rhyasen & Starczynowski, 2015 (© 2014, Springer Nature, Lizenznr.: 4303190174718).

#### 1.4.2 Die jeweilige Funktion der einzelnen IRAKs

Obwohl der grundsätzliche Aufbau der vier IRAKs gleich ist, unterscheiden sie sich, wie schon angedeutet, in der genauen Ausgestaltung ihrer Subdomänen. Damit lassen sich auch die teilweise großen Unterschiede in ihrer Funktion für den Signalweg des TLR4 begründen.

Aufgrund des Fehlens der für die Interaktion mit TRAF6 wichtigen C-terminalen Domäne liegt die Hauptfunktion von IRAK4 in der Phosphorylierung und Aktivierung von IRAK1 und IRAK2. Der Verlust von IRAK4 führt bei Mäusen zur kompletten Resistenz gegen LPS-induzierten Schock, bei Menschen wird es zumindest in Verbindung mit einer erhöhten Anfälligkeit für bakterielle Infektionen gebracht (Jain et al., 2014).

IRAK1 war das erste beschriebene Mitglied der IRAK-Familie und die initiale Phosphorylierung von Threonin 209 durch IRAK4 führt zu einer Konformationsänderung in der Kinase-Domäne von IRAK1, die letztlich eine Hyperphosphorylierung des Proteins bewirkt (S. Flannery & Bowie, 2010; Jain et

al., 2014). IRAK1 kann so vom Rezeptorkomplex dissoziieren, da MyD88 nur nicht-phosphoryliertes IRAK1 binden kann (Yamin & Miller, 1997).

Das IRAK2-Protein wurde in den ersten 10 Jahren nach seiner Entdeckung unterschätzt. Man nahm an, dass es neben IRAK1 nur eine ergänzende Rolle einnimmt (Muzio, Ni, Feng, & Dixit, 1997; Rosati & Martin, 2002). Erst durch Studien mit dem *Vaccinia Virus A52* wurde seine besondere Bedeutung erkannt (Harte et al., 2003; Keating, Maloney, Moran, & Bowie, 2007). So erfolgt die Interaktion von A52, die zur Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalwegs führt, nur mit IRAK2 und TRAF6, nicht aber mit IRAK1 (Maloney, Schroder, & Bowie, 2005). Dies belegt, dass IRAK2 eine zentrale Rolle in der TLR-abhängigen Aktivierung von NF- $\kappa$ B einnimmt.

Im Gegensatz zu den anderen IRAKs wirkt IRAK3 als negativer Regulator im klassischen NF- $\kappa$ B-Weg. Es verhindert die Dissoziation von IRAK1 und IRAK2 vom Rezeptorkomplex, damit die Interaktion mit TRAF6 und unterbricht so die Signalkaskade (Jain et al., 2014).

#### **1.4.3 Aktuelles Wissen über die Funktion der Kinaseaktivität von IRAK2**

Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass IRAK1 und IRAK4 die einzigen aktiven Kinasen der IRAK-Familie sind (Pauls et al., 2013). Diese Überlegung kam zustande, da eine für diese Funktion wichtige Asparaginsäure in der Kinase-Domäne in IRAK2 zu einem Asparagin und in IRAK3 zu einem Serin mutiert ist (Kawagoe et al., 2008). Trotzdem gibt es Publikationen, die IRAK2 neben einer Autophosphorylierungs-Funktion eine katalytisch aktive Kinase-Domäne zuschreiben (Meylan & Tschopp, 2008; Wan et al., 2009; Yin et al., 2011). Da IRAK2 wie alle anderen Mitglieder eine funktionelle ATP-Bindungstasche mit einem invarianten Lysin in der Kinase-Domäne besitzt, könnte dies für IRAK2 ausreichen, um wie eine aktive Kinase zu agieren. Derzeitiger Stand ist, dass IRAK4 IRAK2 phosphoryliert und so die Kinaseaktivität induziert (Jain et al., 2014). Zudem bleibt bei IRAK2 die Kinaseaktivität länger erhalten als bei IRAK1. Aus diesem Grund ist IRAK2 für die späten Phasen der TLR-Antworten notwendig, IRAK1 für die frühen (Pauls et al., 2013).

Das Inhibieren von IRAK2 als mögliche neue Therapiemöglichkeit für mit Entzündungsgeschehen assoziierte Krankheiten hätte zudem den Vorteil, dass es zwar zum Blockieren einer Entzündungsreaktion über NF- $\kappa$ B-abhängige Gene führen, aber den TLR-IFN-Arm dabei nicht betreffen würde (S. Flannery & Bowie, 2010).

## 1.5 Regulierung der TLR

### 1.5.1 Post-transkriptionelle Regulierungen

IRAK2 besitzt auch eine Rolle bei der post-transkriptionellen Regulierung des mRNA-Metabolismus für die Expression proinflammatorischer Gene (Wan et al., 2009; Zhou et al., 2017). Eukaryontische Zellen produzieren mRNA im Zellkern durch mehrere an der Transkription beteiligte Prozesse. Wenn dies abgeschlossen ist, wird die mRNA ins Zytoplasma exportiert, wo es durch Translation zur Produktion der entsprechenden Proteine kommt (Anderson, 2008; Kanitz & Gerber, 2010). Diese post-transkriptionelle Ebene wird neben der transkriptionellen Ebene ebenfalls über die Signalwege der TLRs reguliert. Dabei kommt IRAK2 eine wichtige Rolle zu (S. M. Flannery, Keating, Szymak, & Bowie, 2011). So gibt es Berichte, die zeigen, dass bei Verlust von IRAK2 die Transkription für inflammatorische Gene von Zytokinen und Chemokinen in Makrophagen unverändert bleibt, deren post-transkriptionelle Expression sich aber beeinträchtigt zeigt (Wan et al., 2009; Yin et al., 2011). Dabei scheint IRAK2 die mRNA zu stabilisieren und bei deren Export aus dem Zellkern zu helfen. Der genaue Mechanismus ist aber noch nicht geklärt. Nach einer Publikation von Zhou et al. kann durch Sumo-modifiziertes IRAK2 in den Zellkern wandern (Zhou et al., 2017) und dadurch mit an der Degradierung von mRNA beteiligten Proteinen interagieren. Dass diese Sumoylierung und die damit verbundene Translokation in den Zellkern aber nicht bei katalytisch inaktiven IRAK2-Mutanten auftrat, verdeutlicht wiederum, wie wichtig das Verständnis der katalytischen Aktivität von IRAK2 ist und wie wichtig es ist zu klären, ob IRAK2 wirklich eine aktive Kinase ist.



### **1.5.2 Mechanismus der Ubiquitinierung**

Die Regulierung bzw. Aktivierung vieler Proteine im TLR-Signalweg beruht auf Modifizierungen wie Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung (Wertz & Dixit, 2010). Der Mechanismus der Ubiquitinierung baut auf einer kaskadenartigen Reaktion von drei verschiedenen Enzymen auf und endet mit der Konjugation von Ubiquitin an ein Zielprotein. Zuerst wird Ubiquitin durch eine ATP-abhängige Reaktion durch ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) aktiviert. Dieses aktivierte Ubiquitin wird danach von E1 auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) unter Ausbildung einer hochenergetischen E2-Ubiquitin-Thioester Bindung übertragen. Über ein Ubiquitin-ligierendes Enzym (E3) wird nun zwischen dem Lysinrest des Zielproteins und dem Glycinrest im C-Terminus des Ubiquitins eine kovalente Isopeptidbindung hergestellt (Chen, 2005; Napetschnig & Wu, 2013; Wertz & Dixit, 2010).

Die Verlinkung der entstehenden Polyubiquitin-Kette entscheidet über die Funktion der Ubiquitinierung. Verkettungen über Lysinsrest 48 (K48) und 11 (K11) führen normalerweise zum Abbau durch das 26S-Proteasom, wohingegen Verkettungen über Lysinrest 63 (K63) bei der Aktivierung von Proteinkinasen und der Regulierung von Proteininteraktionen eine Rolle spielen (Chen, 2005; Napetschnig & Wu, 2013; Wertz & Dixit, 2010).

Bei IRAK1 soll eine Modifizierung sowohl durch K48-verlinkte wie auch durch K63-verlinkte Ubiquitinierung erfolgen (Newton et al., 2008; Ordureau et al., 2008; Windheim, Stafford, Peggie, & Cohen, 2008). Die Markierung durch K48-verlinkte Polyubiquitinketten stand schon früh als Grund für den schnellen Abbau fest (Yamin & Miller, 1997). Die Bedeutung der K63-verlinkten Ubiquitinierung von IRAK1 sieht man daran, dass, wenn die Ubiquitinierungsstellen mutiert werden, die Bindung an NEMO und die folgende NF- $\kappa$ B-Aktivierung verhindert wird (Windheim et al., 2008). Welche Proteine für die Ubiquitinierung verantwortlich sind, ist noch nicht abschließend geklärt. Als K63-spezifische E3-Enzyme wurden TRAF6 und die Pellino-Proteine beschrieben. Aber auch der unten genauer erklärte LUBAC-Komplex spielt eine entscheidende Rolle (Conze, Wu, Thomas, Landstrom, & Ashwell, 2008; Ordureau et al., 2008; Wertz et al., 2015; Windheim et al., 2008).

Bei der Ubiquitinierung von TRAF6 ist der E2-konjugierende-Komplex Ubc13-Uev1a für die Entstehung der Verkettungen über K63 essentiell (Deng et al., 2000; Yamamoto et al., 2006). Die Wichtigkeit dieser Ubiquitinierung lässt sich daran festmachen, dass das Entfernen von Ubiquitinketten von TRAF6 durch deubiquitinierende Proteine wie A20 eine Möglichkeit des Beendens der TLR-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivität darstellt (Boone et al., 2004; Napetschnig & Wu, 2013).

Bei der Regulierung des NF- $\kappa$ B-Systems spielt auch die lineare Ubiquitinierung durch den LUBAC-Komplex eine Rolle (Peltzer et al., 2018; Wertz et al., 2015). Bei LUBAC handelt es sich um einen E3-Ligase-Komplex aus 3 Untereinheiten: Dem katalytischen HOIP (HOIL-1 interagierendes Protein) und den für die Stabilität der Ligase wichtigen akzessorischen HOIL-1 (*Heme-oxidized iron regulatory protein 2 ubiquitin ligase-1*) und SHARPIN (*SHANK-associated RH domain-interacting protein*) (Fujita et al., 2018; Iwai, Fujita, & Sasaki, 2014). Bei der Ubiquitinierung durch LUBAC werden lineare Polyubiquitinketten an die Zielproteine angeknüpft. Die lineare Verknüpfung von Ubiquitinen wird über eine Peptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin eines Ubiquitins und dem N-terminalen Methionin des folgenden Ubiquitins gebildet (Hrdinka & Gyrd-Hansen, 2017). Dass der LUBAC-Komplex neben RIP1, MyD88 und IRAK1 auch NEMO ubiquitiniert, wie beschrieben ein Schlüsselschritt in der Aktivierung des IKK-Komplexes, deutet dessen Bedeutung für das NF- $\kappa$ B-System an (Iwai et al., 2014; Peltzer et al., 2018; Wertz et al., 2015).

## 1.6 Mit TLR-verbundene Krankheiten

Fehlregulationen und Fehlfunktionen der TLRs werden mit verschiedensten Krankheitsbildern in Verbindung gebracht. So wurde schon früh der Zusammenhang von chronischen Entzündungen und der Entwicklung von Krebs beschrieben. Dieser Zusammenhang ist insofern relevant, da auch über den TLR-Signalweg die Expression von inflammatorischen Molekülen gefördert wird, die bei Fehlregulation das Tumorstadium, die Ausbildung von Metastasen, die Immunsuppression und die Chemotherapie-Resistenz fördern können (Jain et al., 2014). Durch die Entdeckung von onkogenen MyD88-Mutationen (L265P) in

einer diffusen, großen B-Zell Lymphom-Art wurde die Bedeutung des TLR-Signalwegs für die Krebsentwicklung bestätigt (Ngo et al., 2011). Dabei führt die L265P-Mutation durch spontanes Entstehen eines Komplexes aus MyD88 und IRAK1/4 zur konstitutiven NF- $\kappa$ B-Aktivierung und trägt damit zur erhöhten Überlebensrate der Zellen bei.

Aufgrund der Beteiligung von IRAK2 an der Regulation der für Entzündungsgeschehen wichtigen Signaltransduktion ist der von Hassine et al. beschriebene Zusammenhang von IRAK2-Mutanten mit chronisch entzündlichen Krankheiten wie der rheumatischen Arthritis wenig überraschend (Hassine et al., 2017).

Interessanterweise wurde auch eine hypofunktionelle IRAK2-Mutante beschrieben und mit einer erhöhten Überlebensrate bei kolorektalen Karzinomen in Verbindung gebracht (Wang et al., 2014). Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in einer reduzierten TRAF6-Ubiquitinierung, wie erwähnt, ein Schlüsselschritt in der Signaltransduktion, und diese führt in der Folge zu reduzierter NF- $\kappa$ B-Aktivierung und Produktion von Zytokinen, also einer reduzierten Entzündungsreaktion.

Insgesamt zeigt sich, dass die durch IRAKs geregelte Entzündung ein zweischneidiges Schwert darstellt und dass die IRAKs deshalb zwar als therapeutisches Ziel für Krebsbehandlungen in Frage kommen, aber aufgrund der Komplexität ihrer Rolle erst noch weitere Klarheit über ihre grundsätzlichen Funktionsweisen und Mechanismen bestehen muss (Jain et al., 2014).

### 1.7 Ziel der Doktorarbeit

IRAK2 besitzt eine Schlüsselrolle im für Entzündungsreaktionen wichtigen Signalweg des TLR4. Fehlregulationen können entweder durch anhaltende Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Systems zu chronischen Entzündungen, aber auch zu einer nicht ausreichenden Immunantwort führen. Wie oben beschrieben, ist für IRAK2 aufgrund der Substitution einer Aminosäure in der Kinase-Domäne im Vergleich zu IRAK1 noch nicht final geklärt, ob es sich um eine katalytisch aktive Kinase handelt. Ein weiterer Unterschied zu IRAK1, der sich auf diese Substitution zurückführen lässt, ist, dass IRAK1 durch Ubiquitinierung mit K48-

verlinkten Polyubiquitin-Ketten und folgender proteasomaler Degradierung schneller abgebaut wird und sich deswegen auch nur für die initiale Phase der TLR-Antwort verantwortlich zeigt.

Vor diesem Hintergrund hatte die vorliegende Arbeit das Ziel, den Einfluss der katalytischen Aktivität auf die Funktion von IRAK2 im TLR4-Signalweg genauer zu beleuchten. Dafür wurde im IRAK2 das Asparagin wieder durch Asparaginsäure substituiert und damit versucht die Phosphorylierungsaktivität zu steigern bzw. vergleichbar zu IRAK1 wiederherzustellen. Mit dieser Mutante von murinem IRAK2 wurden IRAK2-defiziente 264.7 Makrophagen rekonstituiert und der Einfluss der Mutante auf den Signalweg des TLR4 nach Stimulation mit LPS untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Im folgenden Kapitel werden die verwendeten Materialien und die Firmen, von denen sie bezogen wurden, im Sinne der Übersichtlichkeit weitgehend in Tabellenform aufgelistet.

#### 2.1.1 Antibiotika

Tabelle 1: Antibiotika

Produkt	Hersteller
Ampicillin	AppliChem GmbH
Zeocin	Invitrogen

#### 2.1.2 Antikörper

Tabelle 2: Antikörper

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
Primäre	Anti-IRAK2 (4367S)	Cell Signaling
	Anti-MYC (2278S)	
	Anti-GFP (2956S)	
	Anti-ERK2 (SC-154)	Santa Cruz
Sekundäre	Anti-Kaninchen	Jackson immunoreaction laboratories
	Anti-Maus	
Für FACS-Färbung	Anti-CD40-APC	Bio Legend

#### 2.1.3 Bakterien

Tabelle 3: Bakterien

Produkt	Hersteller
Top F	Invitrogen
DH5 $\alpha$ -Bakterien (E. coli)	Invitrogen

### 2.1.4 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
Acrylamid 4K-Lösung	AppliChem GmbH
Agarose	Roth
Ammoniumpersulfat	AppliChem GmbH
Ampuwa (ddH <sub>2</sub> O)	Fresenius Kabi AG
BigDye, HighDye	ThermoFisher Scientific
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich
DTT (1,4- Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Roth
GenJet™ standard	SignaGen® Laboratories
PVDF-Membran	Merck
LB-Pulvermedium	Invitrogen
Loading Dye	ThermoFisher Scientific
Mager-Milchpulver	AppliChem GmbH
Methanol	Sigma-Aldrich
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	ThermoFisher Scientific
Polybrene®	Santa Cruz
RIPA R0278	Sigma-Aldrich
SDS (Natriumdodecylsulfat)	AppliChem GmbH
Sephadex G-50	Sigma-Aldrich
Temed	AppliChem GmbH
Tris	Roth
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Ultra Salt, Ultra Wash, Ultra Silikon-Beads	MoBio Laboratories
WesternBright Quantum HRP Substrat	ThermoFisher Scientific

### 2.1.5 Enzyme

Tabelle 5: Enzyme

Produkt	Hersteller
BamH I	ThermoFisher Scientific
EcoR I	ThermoFisher Scientific
Pfu-DNA-Polymerase DNA	Promega
Phusion-Polymerase	ThermoFisher Scientific

### 2.1.6 Inhibitoren

Tabelle 6: Inhibitoren

Produkt	Hersteller
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich
Proteasomeninhibitor: MG-132	Calbiochem

### 2.1.7 Kits

Tabelle 7: Kits

Verwendungszweck	Produkt	Hersteller
DNA-Aufreinigung	UltraClean™ DNA Purification Kit	MoBio Laboratories
DNA-Präparation	Gen Elute HP Plasmid Midi Preparation Kit	Sigma-Aldrich
Immunologische Detektion (ECL System)	SuperSignal West Femto Trial Kit	ThermoFisher Scientific

### 2.1.8 Oligonukleotide

Tabelle 8: Darstellung der zur Generierung von Plasmiden verwendeten Primer  
(Alle Oligonukleotide wurden von ThermoFisher Scientific synthetisiert)

Bezeichnung (Positionsnr.)	Sequenz
5mIRAK2[Eco.ATG] (505)	GGAGTGGGAATTCGCGCCATGGCTTGCTACATCTACCAGCTG
3mIRAK2[withinORF] (509)	CCCTGAGCAGATGCTGGCCC
3mIRAK2_StopBam (1609)	AGAGGGGGATCCTCAGGGTCC
5mIRAK2_N333D (1741)	CATCATCCACAGCGACGTTAAGAGTGCCAACGTCTTGCTG
3mIRAK2_N333D (1742)	GGCACTCTTAACGTCGCTGTGGATGATGTCCAGGCTATGC

### 2.1.9 Plasmide bzw. Vektoren

Die komplementäre DNA (cDNA) der aus den Primern konstruierten Test-Gene wurde in bizistronische, retrovirale Vektorplasmide kloniert. Der Ausgangsvektor ist pEGZ-MCS, der im 5'-long terminal repeat (5'-LTR) des Murinen Leukämievirus (MuLV) zur Erhöhung der Transkriptionseffizienz anstelle seiner U3-Region ein Cytomegalievirus (CMV)-Enhancerelement hat. Eine *internal ribosomal entry site* (IRES) ermöglicht die Koexpression des Testgens und eines Markergenprodukts aus Zeocinresistenz und Fluoreszenzprotein (*enhanced green fluorescence protein*, eGFP; eGFP-Zeo). Als Selektionsmarker dient in eukaryontischen Organismen eine Zeocinresistenz, in prokaryontischen dagegen eine Ampicillinresistenz. Innerhalb der *multiple cloning site* (MCS) befinden sich Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme.



### 2.1.10 Puffer und Lösungen

Tabelle 9: Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
FACS-Puffer	PBS mit NaN <sub>3</sub> (0,1 %)
Laemmli-Puffer (5-fach)	Tris-HCl pH 6,8 (250 mM), SDS (10 %), Glycerol (20 %), Bromphenolblau (0,25 %), DTT (500 mM)
PBS	NaCl (8 g), KCl (0,2 g), Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1,44 g), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,24 g), H <sub>2</sub> O (800 ml), NaOH zum Einstellen des pH-Wertes (pH 7,4)
RIPA	Tris-HCl pH 8,0 (50 mM), NaCl (150 mM), NP-40 (1 %), Natriumdesoxycholat (0,5 %), SDS (0,1%)
SDS-Gel Laufpuffer	Tris-HCl pH 8,3 (250 mM), Glycin (1,92 M), SDS (1 %)
SDS-Gel Transferpuffer	Tris (25 mM), Glycin (192 mM), Methanol (10 %)
TAE (50-fach)	EDTA Na <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O (50 mM), Eisessig (1 M), Tris (2 M)
TBST	Tris HCl pH 7,5 (50 mM), NaCl (150 mM), Tween-20 (0,05 % [v/v])

### 2.1.11 Geräte

Tabelle 10: Großgeräte

Geräte	Hersteller
Durchflusszytometer LSR II	Becton Dickinson
EVOS Cell Imaging System	ThermoFisher Scientific
Heizblock Bio TDB-100	Biosan
Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad
Nanodrop 2000	ThermoFisher Scientific
T3 Thermocycler	Biometra
UV-Kammer	Intas Science Imaging
Vortex VF2	Janke & Kunkel Labortechnik
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf

### **2.1.12 Zellkulturen und zugehörige Nährmedien**

Murine RAW 264.7 Makrophagen (RAW)-Zellen wurden in mit 10 % fetalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin-Antibiotikum versetztem Dulbecco's Modifizierten Eagle's Medium (DMEM) gehalten.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten IRAK2-defizienten Zellklone sind ebenfalls RAW-Zellen, bei denen durch Anwendung der CRISPR/Cas9-Technik die Expression des IRAK2-Proteins inhibiert wurde (Joshi, 2017).

Für transiente Transfektionen wurden *Human Embryonic Kidney* (HEK) 293T-Zellen verwendet. Diese wurden in Modifiziertem Eagle's Medium (MEM) gehalten, dem 10 % fetales Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin-Antibiotikum zugesetzt wurden.

## 2.2 Zelluläre Methoden

### 2.2.1 Ermittlung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde durch Anfärben mit einer Trypanblau-Arbeitslösung und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 verdünnt. Im Gegensatz zu lebenden Zellen nehmen tote Zellen das Trypanblau aufgrund von Membranschädigungen auf, wodurch man beide voneinander unterscheiden kann. Circa 10 µL der Verdünnung wurden unter das Deckglas der Zählkammer pipettiert und die lebenden Zellen in mindestens 2 Großquadranten gezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte mittels der Formel:

Zellzahl/ml = Mittelwert gezählter Zellen pro Quadrant x Verdünnungsfaktor x  $10^4$

### 2.2.2 Kultivierung der Zelllinien

293T: Die Zellen wurden zweimal in der Woche routinemäßig verdünnt und dabei auf neue Zellkulturschalen überführt. Dazu wurden die Zellen mit 1 ml ATV abgelöst und in 10 ml MEM-Medium resuspendiert. 1 ml davon wurde in die neue Zellkulturschale überführt und mit 13 ml MEM-Medium aufgefüllt.

RAW-Zellen wurden manuell mit der Rückseite einer blauen Pipettenspitze abgelöst und in DMEM-Medium gehalten, ansonsten kam die gleiche Methodik wie bei den 293T-Zellen zur Anwendung.

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen längere Zeit unter Erhalt ihrer spezifischen Eigenschaften und Merkmale zu lagern, wurden diese geerntet, mit 1 ml Einfriermedium bestehend aus 90 % FCS und 10 % DMSO in ein Kryoröhrchen überführt und anschließend bei -80 °C eingefroren. Ab dem nächsten Tag wurden die Zellen bei -140 °C gelagert. Damit sollten irreversible degenerative Zellveränderungen oder Kontaminationen, die sich bei Zellen in Kultur nach einiger Zeit einstellen können, vermieden werden.

Zum Auftauen wurden die Zellen in ein mit 10 ml des richtigen Zellmediums vorbereitetes 15 ml-Falcon überführt und bei 1600 rpm zentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Zellen in Medium resuspendiert und auf eine neue Zellkulturschale ausplattiert.

## 2.2.4 Transfektion und Transduktion

### Theorie von Transfektion und Transduktion

Unter Transduktion (Infektion) versteht man den Gentransfer von DNA mit Hilfe retroviraler Vektoren. Sind diese Vektoren retroviralen Ursprungs, werden sie als rekombinante Retroviren (rRV) bezeichnet. Zur Herstellung von rRVs wird eine Verpackungszelllinie mit einem retroviralen Plasmid zusammen mit Plasmiden, die für Struktur- und Funktionsproteine sowie für einen Rezeptor kodieren, transient transfiziert. Das retrovirale Plasmid kodiert das rekombinante Genom des rRV bestehend aus dem zu übertragenden Gen, einem Verpackungssignal für die retroviralen Hüllproteine und einem Selektionsmarker. Nach der Transfektion produzieren die Zellen der Verpackungszelllinie Virionen. Mit diesem viralen Überstand werden die Zielzellen infiziert. Dabei integrieren sie die zu übertragende DNA stabil in ihr Genom und exprimieren diese DNA als Proteine.

### Transfektion

Dazu wurden  $3 \times 10^5$  293T-Zellen pro Napf einer 12-Napf-Platte ausplattiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel von MEM auf 2 ml DMEM, das durch Inkubation über Nacht im Brutschrank auf die gleiche Temperatur und den gleichen pH-Wert eingestellt wurde.

Zu dem Transfektionsansatz, der 2 h später pipettiert wurde, gehörte die Virusverpackung, die je nach Art des eingesetzten Plasmids und der später zu infizierenden Zielzellen gewählt wurde: Entweder pHit60/123, pHit60 + VSV oder VSV + MDL + REV. Bei Verwendung von VSV (*vesicular stomatitis virus*) als Virus-Verpackung wurden alle Arbeiten wegen des amphotropen Charakters unter einer S2-Sterilbank durchgeführt. Die Virus-Verpackung und die 3 anderen Bestandteile des Transfektionsansatzes setzten sich folgendermaßen zusammen:

- DMEM 100  $\mu$ L
- Virus-Verpackung 0,5  $\mu$ g jedes Verpackungsplasmids
- Plasmid-DNA 1  $\mu$ g
- GenJet™ 3  $\mu$ L

Dieser Mix wurde nach 10 min Inkubation auf die ausgesäten 293T-Zellen geträufelt und die Platten wurden zum besseren Mischen geschwenkt. Weiterhin erfolgte ein Mediumwechsel zurück von DMEM auf MEM nach 24 h. Der Erfolg der Transfektion konnte anhand des Vorhandenseins des Fluoreszenzmarkers eGFP-Zeo mittels Fluoreszenzmikroskop unter UV-Licht überprüft werden.

### **Infektion**

Nach weiteren 24 oder 48 h wurde der virale Überstand nach Sterilfiltration zur Infektion/Transduktion von RAW-Zellen verwendet.

Die RAW-Zellen wurden manuell mit der Rückseite einer blauen Pipettenspitze abgeschabt und  $3 \times 10^5$  von ihnen zusammen mit 1,5 ml des zuvor sterilfiltrierten viralen Überstandes der 293T-Zellen in einem 50 ml-Falcon vermengt. Die Zugabe von Polybrene® im Verhältnis 1:1000 als Transduktionsverstärker führt zur Erhöhung der Infektionsrate. Ebenfalls zur Erhöhung der Infektionsrate wurden die Zellen nach 15 min Schwenken während der 1 h dauernden Inkubation bei 2200 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden nach dem Verwerfen des Überstandes mit 2 ml DMEM wieder in Kultur genommen und auf 12-Napf-Platten ausplattiert.

#### **2.2.5 Durchflusszytometrie/ Anreicherung erfolgreich infizierter Zellen**

Mit dem Durchflusszytometer (*fluorescence-activated cell sorter*, FACS®) lassen sich fluoreszierende Proteine in Zellen nach erfolgter Infektion nachweisen. Dabei werden die Zellen auch nach Größe (*forward scatter*, FSC) und Granularität (*side scatter*, SSC) aufgenommen. Damit erhält man neben der Infektionsrate auch eine Aussage über den Überlebenszustand der Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das FACS® zur Überprüfung der Infektionsrate verwendet, also der Anteil der Zellen, die erfolgreich infiziert wurden und somit das Markerprotein eGFP-Zeo exprimieren. Dazu wurden RAW-Zellen in FACS®-Röhrchen überführt und mit 3 ml FACS®-Puffer gewaschen: Zu diesem Schritt gehörte 8 min zentrifugieren bei 1600 rpm, Überstand abschütten und wieder mit FACS®-Puffer aufnehmen. Nach Vortexen der Proben erfolgten die Analyse am Durchflusszytometer LSR II und die Auswertung der Daten mit dem FlowJo-Programm<sup>8</sup>. Bei erfolgreicher Infektion wurden die Zellen mittels

Durchflusszytometrie nach bestimmten Charakteristika wie der Fluoreszenz des Markerproteins sortiert und weiter kultiviert.

### **2.2.6 Stimulation**

Um die RAW-Zellen zu stimulieren wurde Lipopolysaccharid (LPS) von *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterien verwendet.  $3 \times 10^5$  RAW-Zellen wurden dazu auf einer 48-Napf-Platte ausplattiert. Für den Vergleich von unstimulierten und stimulierten Zellen wurden pro Infektion mindestens 2 Ansätze verwendet. Zu einem Ansatz wurde mit DMEM verdünntes LPS gegeben. Der zweite Ansatz fungierte als Negativkontrolle ohne LPS. Je nach Fragestellung des Experiments wurden die Zellen dann nach 1, 2, 4, 8, 24, 48 oder 72 h abgenommen.

Es folgte die Färbung mit einem geeigneten Antikörper. Die Zellen wurden dafür mit 3 ml FACS®-Puffer gewaschen und der Antikörper im Verhältnis 1:400 eingesetzt. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen erneut gewaschen und mit 200 µL FACS®-Puffer resuspendiert. Es folgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie und die weitere Auswertung mittels FlowJo-Programm.

## **2.3 Molekularbiologische Methoden: Klonierung**

Bei der DNA-Klonierung werden DNA-Fragmente in einen Klonierungsvektor eingefügt und das so entstandene rekombinante DNA-Molekül in Bakterienzellen (meistens *E. coli*) eingeschleust. Als Klone werden durch Zellteilung entstandene Bakterienkolonien bezeichnet, die aus Zellen mit identischem genetischem Inhalt bestehen. Somit lässt sich ein bestimmtes Gen unbegrenzt amplifizieren. Wird das Gen zuvor in einen geeigneten Vektor eingebracht, lässt sich das Gen auch exprimieren und somit die Bildung des Genproduktes bewerkstelligen (siehe auch Kapitel 2.2.4).

In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR verwendet, um mittels ortsspezifischer Mutagenese eine gezielte Mutation herzustellen und das mutierte Gen dann in einen Plasmidvektor einzubringen. Das Plasmid wurde in Bakterien transformiert und in diesen vervielfältigt. Eine Mini-Präparation diente zur erneuten Isolierung des Plasmids aus den Bakterien. Um zu überprüfen, welche der Plasmide das richtige DNA-Fragment enthalten, wurden diese sequenziert und größere Mengen der richtigen DNA-Plasmide durch eine Midi-Präparation hergestellt. In

diesem Kapitel werden die einzelnen Schritte der Klonierung noch detaillierter beschrieben.

### **2.3.1 Prinzip der PCR**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basiert auf der Eigenschaft der DNA-Polymerase, einen neuen komplementären DNA-Strang aus einem Ausgangsstrang zu bilden. Sie besteht dabei aus einer wiederholten Abfolge von Zyklen bestehend aus Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation. Die DNA wird zuerst durch hohe Temperatur denaturiert. Bei der folgenden Abkühlung lagern sich die Primer an die zu amplifizierenden DNA-Fragmente an. Im abschließenden dritten Schritt katalysiert bei 72 °C eine hitzestabile DNA-Polymerase die Produktion neuer DNA-Fragmente durch das Hinzufügen neuer komplementärer Desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTPs). Dies ermöglicht es exakt eine spezifische Region der Vorlagensequenz zu amplifizieren und am Ende der PCR eine millionenfache Kopie der spezifischen Sequenz zu erhalten.

### **2.3.2 Verwendung der PCR für die ortsspezifische Mutagenese**

Zur Herstellung des mutierten Gens wurden 4 speziell gewählte Primer verwendet: Zwei Außen- und zwei Innen-Primer, welche die gewünschte Mutationsequenz trugen. In einem ersten PCR-Schritt entstanden zwei sich überschneidende Reaktionsprodukte. Dafür wurden zwei separate 30 µL-Ansätze in PCR-Tubes pipettiert:

- DNA (Plasmid)                    0,3 µL (bei 1,7 µg/ µL)
- Außen-Primer                    1 µL
- Innen-Primer                    1 µL
- Puffer (5\*HF)                    6 µL
- Nukleotide (dNTP)              1 µL
- DNA-Polymerase                0,5 µL
- Ampuwa                          20,2 µL

Die beiden DNA-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese isoliert (Kapitel 2.3.3) und mit Hilfe eines Kits von UltraClean aufgereinigt (Kapitel 2.3.4). In einem zweiten PCR-Schritt wurden nun die zwei DNA-Fragmente mit Hilfe der Außen-Primer zusammengesetzt:

- Fragment 1            0,5 µL
- Fragment 2            0,5 µL
- Außen-Primer 1       1 µL
- Außen-Primer 2       1 µL
- Puffer (5-fach HF)    6 µL
- Nukleotide            1 µL
- Polymerase            0,5 µL
- Ampuwa                19,5 µL

Für die beiden PCR-Schritte wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

- 95 °C            1 min
  - 95 °C            30 sec
  - 50-65 °C       30 sec
  - 72 °C            30
  - 72 °C            10 min
  - 4 °C             ∞
- } 25-40 Zyklen

Das entstandene Produkt wurde ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennt, isoliert und aufgereinigt.

### 2.3.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Nach der PCR wurden die mit 3 µL Laufpuffer (*Loading Dye*, ThermoFisher Scientific) versetzten Proben auf einem 1 % Agarosegel aufgetragen. Die Konzentration des Gels kann variieren und ist abhängig von der zu erwartenden Fragmentgröße. Es gilt: Je kleiner das zu erwartende Fragment, desto größer die Agarose-Konzentration des Gels. Zur Herstellung des 1 % Gels wurden 600 mg Agarose abgewogen und mit 60 ml 1-fach TAE-Puffer versetzt. Die entstandene Lösung wurde in der Mikrowelle erhitzt, nach kurzem Abkühlen mit 5 µL Ethidiumbromid versetzt und in einen Gel-Schlitten mit Kämmen gegossen. Nach 30 min wurde das auspolymerisierte Gel in einer Elektrophorese-Kammer mit 1-fach TAE-Puffer bedeckt und mit den Proben beladen. Zum Vergleich wurde zudem ein Marker (Lambda) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 130 V für 10 – 30 min.



Die Wechselwirkung mit Ethidiumbromid lässt DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar werden. Deswegen konnten die entstehenden DNA-Banden der richtigen Größe mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein Eppendorf Tube (Eppi) überführt werden.

#### **2.3.4 Isolation von DNA aus Agarosegelen**

Die Fragmente wurden mit dem Aufreinigungs-Kit (*Ultra Clean™ DNA purification kit*) aufbereitet: Dazu wurde 1 ml *Ultra Salt* Puffer zu den ausgeschnittenen Gelstücken gegeben und bei 56 °C bis zur kompletten Auflösung des Gels erhitzt. Es folgte die Zugabe von 10 µL *Silikon Beads* und Schwenken des Reaktionsgefäßes für 5 min. Die Proben wurden für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Nach Zugabe einer alkoholischen Waschpulver-Lösung und erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand wieder verworfen. Das Pellet ließ man 5 min trocknen und den Rest des Ethanols in den folgenden 5 min verdampfen. Nun wurden 10 µL H<sub>2</sub>O zugegeben und die Silikon-Perlen gründlich resuspendiert. Die DNA-Ausbeute wurde durch anschließendes Erhitzen bei 56 °C für 5 min erhöht. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt enthielt der Überstand das nun aufgereinigte DNA-Fragment.

#### **2.3.5 Restriktionsverdau und Ligation von Insert und Vektoren**

Die Außen-Primer für die PCR enthielten auch die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme. Diese wurden gemäß den vorhandenen Schnittstellen (*multiple cloning sites*, MCS) des Vektors ausgewählt. Zur Vorbereitung einer Ligation wurden das DNA-Fragment und der Vektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut:

- Puffer 3,8 µL
- Restriktionsenzym1 1 µL
- Restriktionsenzym2 1 µL
- DNA 10 µL (2 µg)
- Ampuwa (H<sub>2</sub>O) 14,2 µL

Das verdaute Fragment (Insert) und der verdaute Vektor wurden elektrophoretisch aufgetrennt und wie zuvor mit dem Kit der Firma Ultra Clean™

aufgereinigt (Kapitel 2.3.4). Die Ligation von aufgereinigtem Insert und Vektor erfolgte im Verhältnis 3:1 mittels einer T4 DNA-Ligase bei 16 °C über Nacht.

### **2.3.6 Transformation von Bakterien**

Es folgte die Transformation des Ligationsprodukts in kompetente Bakterien. Dazu wurden 1,5 µL des Ligationsprodukts zu 50 µL des DH5α-Stamms von E. coli-Bakterien gegeben. Es folgten 30 min Inkubation bei 4 °C, 60 s Inkubation bei 42 °C und 2 min Inkubation bei 4 °C. Nach Überführung in 0,5 ml LB-Medium wurde die Bakterienkultur für 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Es folgte das Ausplattieren der Bakterienkultur auf Ampicillin-haltigen Agar-Platten und eine Inkubation bei 37 °C über Nacht.

### **2.3.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen: Mini-Präparation**

Um die Plasmide überprüfen zu können, wurden jeweils Einzelkolonien einer Agar-Platte gepickt und damit 3 ml LB-Medium, das auch mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin versetzt wurde, angeimpft. Der Ansatz wurde unter Schütteln bei 37 °C über Nacht inkubiert. Als nächsten Schritt zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde die Bakterienlösung 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Es folgte die Zugabe von je 100 µL von Resuspensions-Puffer und Lyse-Puffer. Die Lyse wurde bei kontinuierlichem Invertieren auf 5 min beschränkt und durch Zugabe von 150 µL Neutralisations-Puffer beendet. Nach weiteren 10 min Zentrifugieren zum Entfernen der Zelltrümmer und der chromosomalen DNA wurde der DNA-haltige Überstand zu 1 ml Ethanol gegeben. Das Ethanol wurde nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wieder abgesaugt und das Plasmid-Pellet wurde für 5 min getrocknet. Zum Abschluss der Mini-Präparation wurde das Pellet mit 50 µL Ampuwa resuspendiert.

### **2.3.8 Sequenzierung mittels Polymerase-Kettenreaktion**

Zur Überprüfung wurde die Plasmid-DNA erneut mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut und mittels Agarosegel aufgetrennt. Die Plasmid-DNAs, deren verdaute DNA-Fragmente die richtige Bandengröße zeigten, wurden mittels Sequenzierung weiter analysiert. Dazu wurden folgender

10  $\mu\text{L}$ -Ansatz sowie das PCR-Programm zur Amplifizierung des entsprechenden DNA-Fragments verwendet:

**10  $\mu\text{L}$ -Ansatz:**

- DNA 2  $\mu\text{L}$
- Primer 509 1  $\mu\text{L}$
- Ampuwa 5  $\mu\text{L}$
- MixBigDye 2  $\mu\text{L}$

**PCR-Programm:**

- 96 °C 10 sec
- 50 °C 5 sec
- 60 °C 3,5 min } 25 Zyklen
- 20 °C 10 sec
- 4 °C  $\infty$

Das Reaktionsprodukt der PCR wurde mittels Durchlaufen (6 min bei 3000 rpm) einer Sephadex-Säule aufgereinigt, mit 15  $\mu\text{L}$  HighDye-Puffer versetzt und die Basenabfolge der DNA mittels Sequenzierungs-PCR bestimmt.

**2.3.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen: Midi-Präparation**

Wenn der Klonierungserfolg durch die Sequenzierung bestätigt werden konnte, wurde die Menge des Plasmids durch Transformation in Top F-Bakterien und anschließende Midi-Präparation mit dem „*Gen Elute HP Plasmid Midiprep Kit*“ von Sigma-Aldrich nach Herstellerangaben weiter gesteigert.

**2.3.10 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren**

Die Bestimmung der Konzentration an DNA bestimmter Lösungen wurde mittels NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) nach Herstellerangaben durchgeführt.

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

In diesem Kapitel werden die Verfahren beschrieben, wie Proteinextrakte aus Zellen gewonnen wurden und aus diesen Extrakten bestimmte Proteine mittels SDS-Page, Western Blot und nachfolgendem immunologischen Nachweis weiter analysiert wurden.

### 2.4.1 Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten

Für die Herstellung von Proteinextrakten wurden die Zellen ( $1-10 \times 10^6$ ) geerntet und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis ausgeführt. 1 ml RIPA-Puffer wurde mit 1 mM DTT und 10  $\mu$ L Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich) versetzt. Mit 35  $\mu$ L von diesem Mix wurden die Zellen resuspendiert. Nach 20 min auf dem Schüttler und einem 10 min Zentrifugationsschritt bei 1600 rpm wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert. Es folgte die Zugabe von 10  $\mu$ L von 5-fach Laemmli, die Lyse des Proteinextrakts für 10 min bei 95 °C im Heizblock und die Lagerung bei -20 °C.

### 2.4.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page)

Zum Auftrennen des Proteingemisches wurde die SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet.

Dafür wurden ein Trenngel und ein Sammelgel nach der in Tabelle 11 und Tabelle 12 beschriebenen Rezeptur gegossen. Zuerst wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten bis etwa 2,5 cm unter den oberen Rand gegossen und zur Entstehung einer glatten Polymerisationskante mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisieren des Trenngels und Entfernen des Isopropanols wurde das Sammelgel eingefüllt und ein Kamm zur Erzeugung von Taschen luftblasenfrei eingebracht. Nach abgeschlossener Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt. Es folgte das Einsetzen des Gels in die Vertikalkammer des „Mini Protean Tetra Systems“.

Die beiden Pufferreservoirs der Vertikalkammer wurden mit 1-fach Laufpuffer aufgefüllt. Vor Beladen mit den Proteinextrakten wurden die Geltaschen vorsichtig mit einer Spritze ausgespült und gereinigt. Um die Proteine später

anhand ihrer Größe identifizieren zu können, wurden neben den Zellextrakten 3,5 µL des Markers „Page Ruler Plus“ aufgetragen. Zur Fokussierung der Proteine im Sammelgel wurde zuerst für 20 min eine Spannung von 80 V angelegt und diese danach für circa 70 min auf 120 V hochgeregelt.

Tabelle 11: Rezeptur für Sammelgel

<b>Acrylamid-Konzentration</b>	<b>4 %</b>
Gel 30 (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	1 ml
Sammelgel-Puffer 1.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2 ml
10 % APS in ddH <sub>2</sub> O	100 µl
ddH <sub>2</sub> O	4,8 ml
TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	20 µl

Tabelle 12: Rezeptur für Trenngel

<b>Acrylamid-Konzentration</b>	<b>12 %</b>
Gel 30 (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	4,2 ml
Trenngel-Puffer 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2,5 ml
10 % APS in ddH <sub>2</sub> O	100 µl
ddH <sub>2</sub> O	3,3 ml
TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	20 µl

### 2.4.3 Western Blotting

Beim sogenannten *Semi-Dry-Elektroblotting*-Verfahren werden die Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Dafür wurden zuerst die Membran sowie 8 Whatman-Filterpapiere auf die Größe des Trenngels zugeschnitten. Danach wurden die Filterpapiere, die Membran und das Gel nach kurzem Eintauchen in Transferpuffer in folgender Reihenfolge übereinandergelegt: Anode(+), 4 Whatman-Filterpapiere, Membran, Gel, 4 Whatman-Filterpapiere, Kathode(-).

Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Membran und Gel befanden. Die Membran wurde zudem vor dem Eintauchen in Transferpuffer in 100 % Methanol und Ampuwa getränkt. Das Blotten erfolgte für 90 min bei 12 V. Die Membran wurde zur Fixierung der Proteine kurz in 100 % Methanol eingetaucht und luftgetrocknet.

### **2.4.4 Immunologische Detektion mittels Antikörper**

Zum Blockieren unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h unter kontinuierlichem Schwenken in einer 5 % Magermilch-Lösung inkubiert.

Es folgte die Zugabe eines geeigneten primären Antikörpers im Verhältnis 1:1000. Um das Anbinden des ersten Antikörpers an das Zielprotein zu ermöglichen, wurde die Membran über Nacht bei 4 °C unter kontinuierlichem Schwenken inkubiert. Es folgte das Entfernen ungebundener Antikörper durch 3-maliges Waschen mit TBST-Puffer (*tris-buffered saline with Tween20*).

Der sekundäre, Peroxidase-konjugierte Antikörper wurde passend zum primären Antikörper gewählt, im Verhältnis 1:5000 mit TBST eingesetzt und damit die Membran für 2 h bei leichtem Schütteln inkubiert. Es folgte wieder 3-maliges Waschen der Membran mit TBST.

Die Nachweisreaktion erfolgte mit einem *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) System. Die Lösungen des „*SuperSignal West Femto Trial Kit*“ von ThermoFisher Scientific wurden dazu im Verhältnis 1:1 angemischt und auf der Membran gleichmäßig verteilt. Die dadurch angeregte Peroxidase-reaktion führt zur Entstehung einer Chemilumineszenz, die in einer Darkbox aufgenommen wurde.

## **2.5 Statistische Analyse von Daten**

Die statistische Auswertung des mittleren Fluoreszenzintensitäts-Werts (MFI) der FACS-Analysen erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism5. Standardmäßig wurde dabei der ungepaarte, zweiseitige t-Test angewendet und dessen Ergebnisse bei den Mittelwerten (*mean*) mit Standardabweichung (*standard deviation*, SD) dargestellt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant erachtet (ns:  $p > 0,05$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ ).

## 3 Ergebnisse

IRAK2 besitzt eine Schlüsselrolle im für Entzündungsreaktionen wichtigen Signalweg des TLR4. Fehlregulationen dieser Entzündungsreaktion können die Entstehung und Progression von Erkrankungen, insbesondere von Krebs, fördern (Jain et al., 2014). Bevor IRAK2 als therapeutisches Ziel für Krebsbehandlungen in Frage kommen kann, muss erst noch weitere Klarheit über die grundsätzliche Funktionsweise dieser Kinase bestehen. Wie oben beschrieben, ist für IRAK2 aufgrund der Substitution einer Aminosäure in der Kinase-Domäne im Vergleich zu IRAK1 noch nicht final geklärt, ob es sich um eine katalytisch aktive Kinase oder eine inaktive Pseudokinase handelt.

Um die Bedeutung der Kinaseaktivität/-inaktivität für die Funktion von IRAK2 im TLR4-Signalweg weiter zu beleuchten, wurde Asparagin im vermeintlich aktiven Zentrum (Position 333) wieder zur Asparaginsäure [N333D] revertiert. Mit der Mutante wurden IRAK2-defiziente 264.7 Makrophagen rekonstituiert und der Einfluss der Mutation auf den Signalweg des TLR4 nach Stimulation mit LPS untersucht.

### 3.1 Induktion der CD40-Expression wildtypischer RAW 264.7 Makrophagen

Als erster Schritt wurde eine Zelllinie gesucht, bei der sich durch LPS der TLR4-Signalweg induzieren und diese Induktion sich durch eine relativ einfache Methode quantitativ erfassen lässt. Zudem sollte der optimale Wirkungsbereich der zu verwendenden LPS-Konzentration festgestellt werden.

Für die nachfolgenden Versuche wurde die Makrophagenzelllinie RAW 264.7 (im Nachfolgenden als „RAW“ bezeichnet) eingesetzt. Hier führt die Stimulation mit LPS durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu einer Induktion der CD40-Expression. CD40 ist ein kostimulatorisches Transmembranmolekül (Elgueta et al., 2009; Qin et al., 2005), dessen Expression sich durch Anfärben mit einem APC-konjugierten anti-CD40-Antikörper mittels Durchflusszytometer quantitativ erfassen lässt. Um die für weitere Experimente geeignete Menge an LPS zu ermitteln, wurden die RAW-Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen von LPS (50, 150 und 500 ng/ml) für 24 h stimuliert und mittels Durchflusszytometrie

die CD40-Expression bestimmt. Zum Quantifizieren wurde die mittlere Fluoreszenzintensitäts-Wert (MFI) ermittelt und in Relation zum MFI unstimulierter RAW-Zellen gesetzt. Wie Abbildung 3 zeigt, induzierten die verschiedenen LPS-Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede in der CD40-Expression. Um auf alle Fälle im sättigenden Bereich von LPS zu arbeiten, wurde in allen weiteren Experimenten LPS in der Konzentration von 500 ng/ml zur Stimulation der RAW-Zellen gewählt.

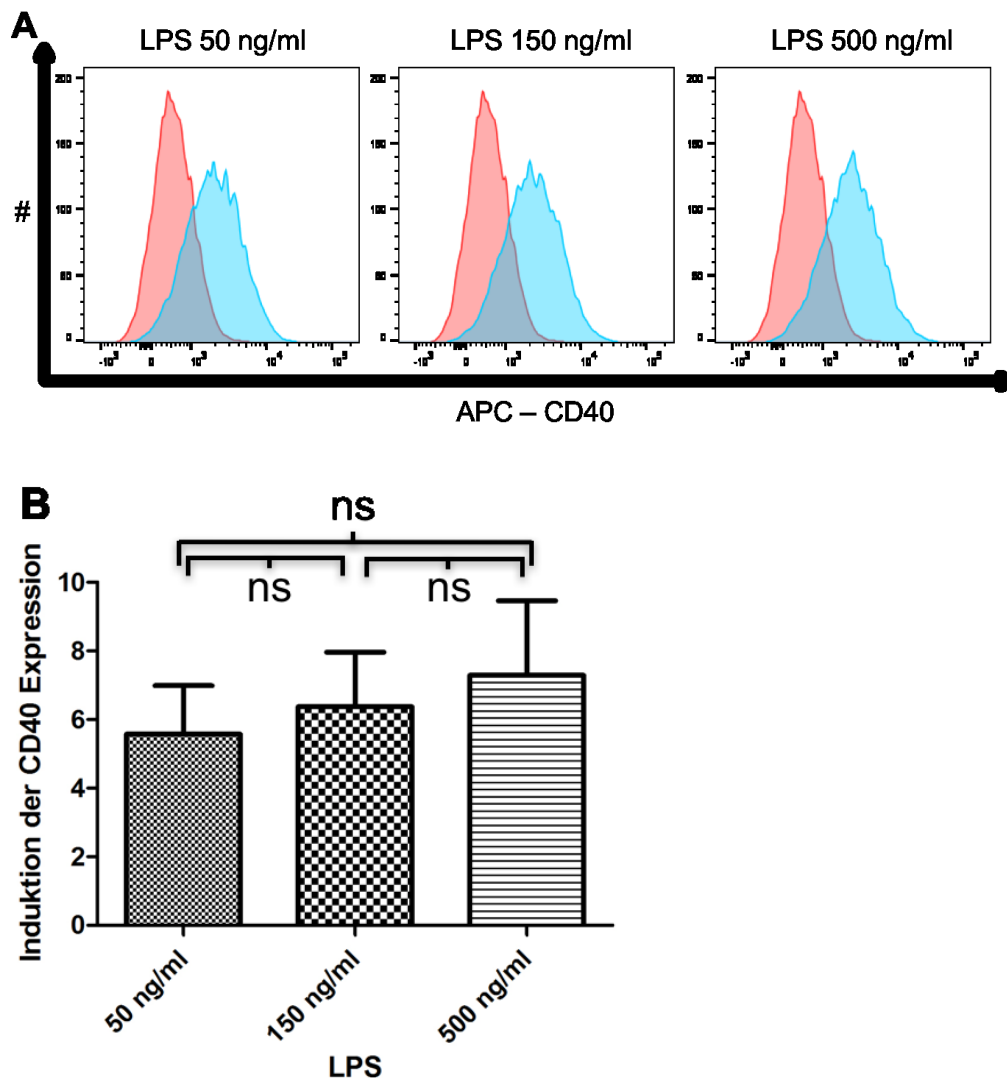


Abbildung 3: CD40-Expression von RAW-Zellen 24 h nach Stimulation mit LPS. Die CD40-Expression wurde am Durchflusszytometer bestimmt. (A) zeigt repräsentativ die Daten eines Einzel-Versuchs als Histogramm dargestellt (Rot: Mediumwert ohne LPS; Blau: nach 24 h LPS-Stimulation); (B) zeigt die Induktion der CD40-Expression (berechnet als Quotient des MFI der stimulierten zum MFI der unstimulierten RAW-Zellen), dargestellt als Mittelwert mit SD aus 3 unabhängigen Experimenten (ns = nicht signifikant). Für detaillierte Werte siehe Anhang Tabelle 13.



Insgesamt erwies sich die Stimulation der RAW-Zellen und die Auswertung der induzierten CD40-Expression als ein reproduzierbares und quantitativ erfassbares Analysewerkzeug bei der Stimulation des TLR4-Signalwegs durch LPS.

### 3.2 Rekonstitution von IRAK2-defizienten Zellen mit IRAK2 wt

Um den Einfluss von IRAK2-Mutanten auf den TLR4-Signalweg zu analysieren, wurden diese Mutanten in RAW-Zellen exprimiert. RAW-Zellen besitzen auch endogenes IRAK2. Um diesen Faktor auszuschließen, wurde ein IRAK2-defizienter RAW-Zellklon verwendet, der zuvor mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems generiert wurde. Die Zellen dieses Klons werden im Folgenden als „RAW Sc17“-Zellen bezeichnet.

Des Weiteren wurde überprüft, ob eine Rekonstitution dieser IRAK2-defizienten RAW Sc17-Zellen mit IRAK2 wt (pEGZ-MYCmIRAK2) möglich ist und sich die CD40-Expression wieder auf ein vergleichbares Niveau wie bei RAW wt-Zellen zurückführen lässt.

Um IRAK2 und seine Mutanten in RAW Sc17-Zellen einzuschleusen, wurden rekombinante Retroviren (rRV) verwendet, die in 293T-Zellen hergestellt wurden. Die rRV kodierten für die IRAK2-Varianten und das Markerprotein eGFP-Zeo, ein Fusionsprotein aus *enhanced green fluorescent protein* und dem *zeocin resistance protein* (im Folgenden einfach als „GFP“ bezeichnet). Die Expression von GFP ist über eine *internal ribosomal entry site* an die Expression von IRAK2 gekoppelt. Neben IRAK2 wt wurde auch eine „leere“ Kontrolle (pEGZ-MCS) als Vergleichswert in jedem Versuch mitgeführt. Die rRV für die „leere“ Kontrolle kodieren nur für GFP.

Um RAW Sc17-Zellen mit vergleichbaren Mengen an integrierten Proviren zu erhalten, wurden die transduzierten Zellen mittels Durchflusszytometrie auf Basis ihrer GFP-Expression sortiert. Die Kontroll-positiven (RAW Sc17\_co) und die IRAK2 wt-positiven (RAW Sc17\_IRAK2) Zellen wurden für 24 h mit 500 ng/mL LPS stimuliert und danach die CD40-Expression der lebenden Zellen gemessen. Wie erwartet zeigten RAW Sc17\_IRAK2-Zellen im Vergleich zu RAW Sc17\_co-Zellen eine viel stärkere CD40-Expression nach LPS-Stimulation (Abbildung 4).

Die restliche Induzierbarkeit der CD40-Expression in RAW Sc17\_co-Zellen ist vermutlich auf endogenes IRAK1 zurückzuführen.

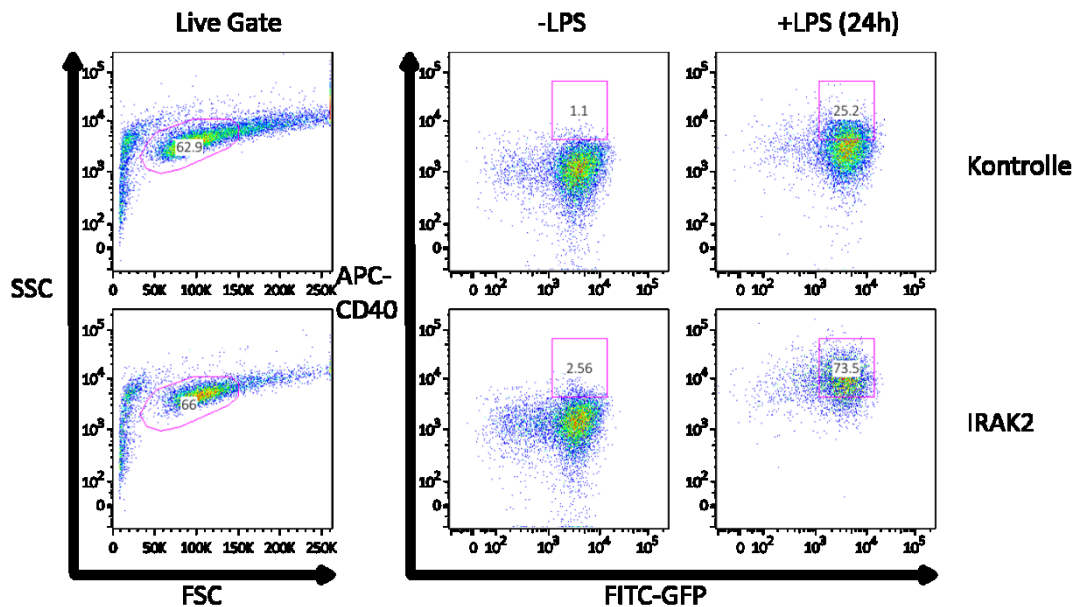


Abbildung 4: Vergleich von für pEGZ-MCS (Kontrolle) oder pEGZ-IRAK2 (IRAK2 wt) kodierende RAW Sc17-Zellen mittels Durchflusszytometer.

Gezeigt sind repräsentative Pseudo-Colour-Plots: links jeweils mit Gate auf die lebenden Zellen; rechts der Vergleich der CD40-Expression vor und nach 24 h Stimulation mit LPS (500 ng/ml). Zur Veranschaulichung einer gesteigerten CD40-Expression wurde hier in den Diagrammen ein Gate auf die APC/CD40-positiven Zellen gesetzt. Dargestellt sind die exemplarischen Daten eines Einzelversuchs.

Für einen besseren Vergleich wurde die x-fache Induktion, also das Verhältnis des MFI der CD40-Expression von Zellen nach LPS-Stimulation zu Zellen ohne Stimulation berechnet. Dies wurde für RAW-Zellen, RAW Sc17-Zellen, RAW Sc17\_co-Zellen (Kontrolle, deren rRV nur für GFP kodieren) und RAW Sc17\_IRAK2-Zellen (mit IRAK2 wt rekonstituiert) durchgeführt.

Dabei konnte festgestellt werden, dass der Wert der RAW Sc17 aufgrund ihrer IRAK2-Defizienz im Vergleich zu RAW wt-Zellen statistisch signifikant erniedrigt war: 2,0-fache Induktion der CD40-Expression der RAW Sc17 zu 7,3-facher Induktion bei den RAW wt-Zellen. Das Ergebnis der nicht infizierten IRAK2-defizienten RAW Sc17-Zellen (2,0-fache Induktion) stimmte mit dem der Kontrollpopulation RAW Sc17\_co (2,3-fach) überein. Zudem zeigte sich, dass die mit IRAK2 wt rekonstituierten RAW Sc17\_IRAK2-Zellen auch tatsächlich in ihrer CD40-Expression nach LPS-Stimulation rekonstituiert waren, da sie einen ähnlichen Wert für die Induktion aufwiesen: 7,6-fach zu 7,3-fach (Abbildung 5).

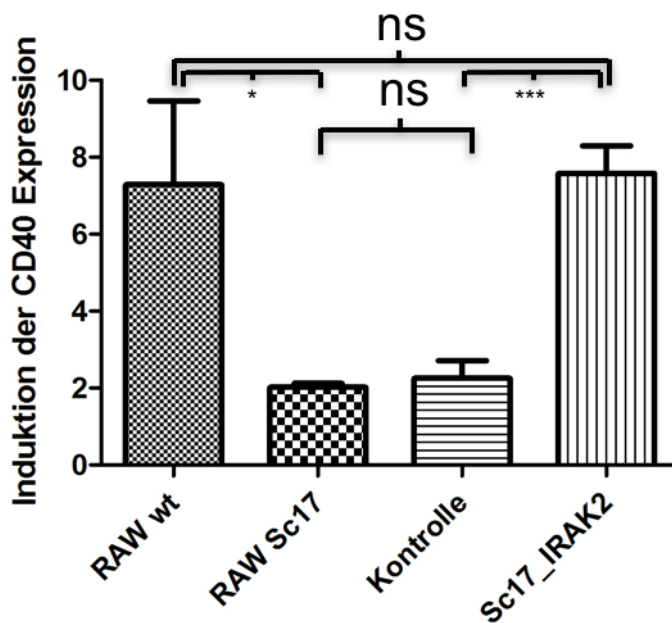


Abbildung 5: Vergleich der Induktion nach 24 h LPS-Stimulation verschiedener Zellen: RAW wt; RAW Sc17; RAW Sc17\_co (Kontrolle); RAW Sc17\_IRAK2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SD aus 3 unabhängigen Experimenten. Für detaillierte Werte siehe Anhang Tabelle 14. Für Zeichen (ns; \*) für p-Werte siehe Seite 33.

Aus diesem Grund wurde das hier verwendete System der Rekonstitution von IRAK2-defizienten RAW Sc17 mit für IRAK2 wt-kodierende rRV als geeignetes System angesehen, um es für weitere Untersuchungen mit veränderten IRAK2-Proteinen zu verwenden und dabei deren Einfluss auf die CD40-Expression zu analysieren.

### 3.3 Klonierung von Plasmiden mit IRAK2-Mutationen

#### 3.3.1 Klonierung eines Plasmids mit der Mutation IRAK2[N333D]

IRAK2 wurde lange Zeit wegen eines Asparagins in der Kinase-Domäne als inaktive Kinase angesehen. Diese Annahme beruhte darauf, dass IRAK1 seine katalytische Funktion verliert, wenn die Asparaginsäure in der Kinase-Domäne durch Asparagin substituiert wird (Vig et al., 1999). Um die Bedeutung der Kinaseaktivität für die Funktion von IRAK2 und die Auswirkungen auf den TLR Signalweg zu untersuchen, wurde diese Mutation hier nun für IRAK2 in umgekehrter Weise durchgeführt, also das Asparagin durch die für die katalytische Funktion vermeintlich wichtige Asparaginsäure substituiert. Das Einbringen der Mutation [N333D] in IRAK2 erfolgte mittels ortsspezifischer Mutagenese mit Hilfe der Primer 1741 und 1742 (für genaue Sequenzen siehe

Tabelle 8) und der Erfolg wurde durch Sequenzierung des entstandenen Plasmids kontrolliert (Abbildung 6).

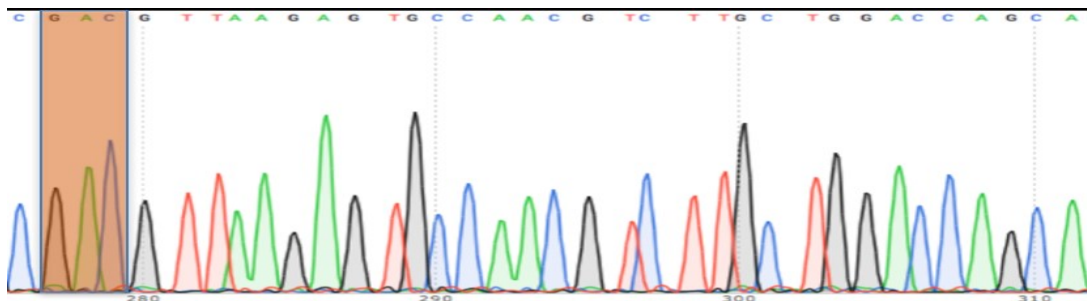


Abbildung 6: Sequenzanalyse der Klonierung von pEGZ-IRAK2[N333D]. Hervorgehoben ist der Bereich der DNA-Sequenz, durch dessen Veränderung auf Proteinebene eine Punktsubstitution des Asparagins an Position 333 zur Asparaginsäure erfolgt. Nukleotidbasen: A = Adenin, T = Thymin, C = Cytosin, G = Guanin.

### 3.3.2 Expression verschiedener IRAK2-Mutanten in RAW Sc17-Zellen

Zur Untersuchung der Mutante IRAK2[N333D] wurde die gleiche Methodik wie für IRAK2 wt verwendet: Zunächst wurde eine transiente Transfektion von 293T-Zellen mit dem retroviralen Plasmid pEGZ-IRAK2[N333D] und mit Plasmiden, die für Struktur- und Funktionsproteine sowie für einen Rezeptor kodieren, durchgeführt. Durch den Nachweis des Fluoreszenzmarkers GFP mittels Fluoreszenzmikroskop wurde der Erfolg der Transfektion überprüft. Mit den generierten rRV wurden RAW Sc17-Zellen infiziert. Der Erfolg der Infektion wurde auf der Basis von GFP mittels Durchflusszytometrie überprüft. Dieses Vorgehen erfolgte für IRAK2[N333D], IRAK2 wt und die „leere“ Kontrolle. Zwei weitere IRAK2-Mutanten, IRAK2[E525A] und IRAK2[K235S], wurden in die Analyse miteinbezogen. Die Substitution der Glutaminsäure an Position 525 durch Alanin [E525A] im murinen IRAK2 verhindert die Bindung an TRAF6. Dies führt zu einer dominant negativen Beeinträchtigung des folgenden Signalwegs (Pauls et al., 2013). Daher wurde das Konstrukt im Weiteren als Negativkontrolle verwendet. Als zusätzlicher Vergleich wurde die Substitution des für die Bindung von ATP wichtigen invarianten Lysins durchgeführt. Anders als in der Literatur beschrieben (Liu et al., 2018; Pauls et al., 2013; Wesche et al., 1999; Zhou et al., 2017), wurde aber das Lysin an Position 235 durch Serin [K235S] und nicht durch Alanin substituiert. Serin besitzt im Gegensatz zu Alanin eine polare Seitenkette. Durch die Substitution des Lysins durch eine Aminosäure mit ebenfalls polarer

Seitenkette lassen sich mögliche Auswirkungen einer Polaritätsänderung ausschließen.

Insgesamt wurden drei Punktmutationen in IRAK2 durchgeführt, die in der Kinase-Domäne liegenden K235S und N333D sowie die Substitution E525A (Abbildung 7).

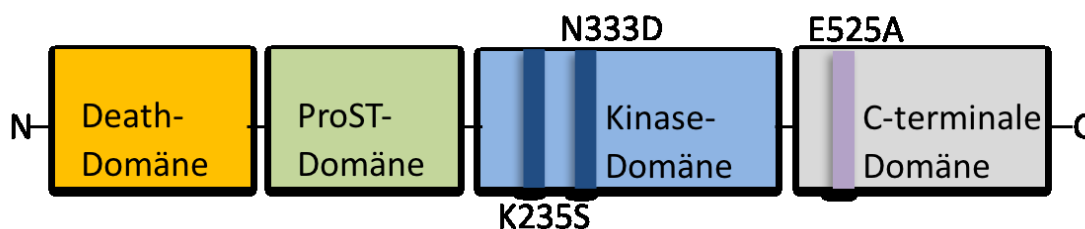


Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung des strukturellen Aufbaus von IRAK2. Hervorgehoben sind die drei durchgeführten Punktmutationen: K235S, N333D und E525A.

### 3.4 Western Blots: Expression der IRAK2-Mutanten

Die Anwesenheit der Proteine der verschiedenen IRAK2-Varianten wurde in Western Blots nachgewiesen. Der Nachweis erfolgte sowohl in 293T-Zellen - nach transienter Transfektion - wie auch in transduzierten RAW Sc17-Zellen. Für die Transduktion wurden für beide Zelllinien die oben beschriebenen rRV eingesetzt. Da alle exogenen IRAK2-Proteine mit einem N-terminalen Myc-tag markiert waren, erfolgte der Nachweis im Western Blot auf Basis dieses tags (Abbildung 8 A). Zur Überprüfung der Infektionsrate diente der Nachweis von GFP.

In beiden Zelllinien ließen sich alle IRAK2-Varianten nachweisen. In 293T-Zellen zeigten sich Doppelbanden für die IRAK2-Proteine. Die obere Bande könnte aufgrund einer Phosphorylierungsmodifikation entstehen. Diese Veränderung war für IRAK2[K235S] und – eher überraschend – auch bei IRAK2[N333D] nur in abgeschwächter Form zu sehen (Abbildung 8 B). Bei den rekonstituierten RAW Sc17 waren für die 4 IRAK2-Proteine jeweils nur Einzelbanden zu beobachten (Abbildung 8 C). Die verringerte Bandenstärke deutet darauf hin, dass die Proteinstabilität von IRAK2[N333D] im Vergleich zu IRAK2 wt und IRAK2[E525A] leicht reduziert sein könnte. Insgesamt wurden aber alle IRAK2-Varianten in der erwarteten Größe von ~65 kDa exprimiert. Zusammengefasst deuten die

Expressionsstudien auf eine vergleichbare Stabilität der IRAK2-Proteinvarianten hin.

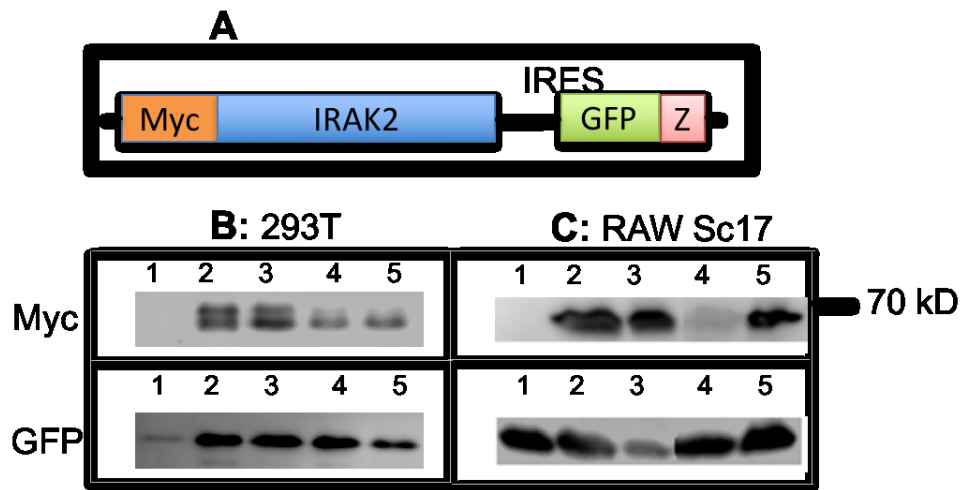


Abbildung 8: Nachweis der Expression der IRAK2-Varianten im Western Blot. (A) Schematische Darstellung der IRAK2 und GFP kodierenden Bereiche der pEGZ-Vektoren. Alle IRAK2-Proteine waren mit einem N-terminalen Myc-tag markiert. Die Expression des Markergenprodukts aus GFP und Zeocinresistenz-Protein erfolgte über eine vorgelagerte *internal ribosomal entry site* (IRES). (B) Western Blot von Extrakten von 293T-Zellen und (C) von RAW Sc17-Zellen. Verwendet wurden folgende Konstrukte: pEGZ-MCS (1), pEGZ-IRAK2 (2), pEGZ-IRAK2[E525A] (3), pEGZ-IRAK2[K235S] (4), pEGZ-IRAK2[N333D] (5). Die IRES-gekoppelte GFP-Expression fungiert als Bezugswert, um die relative Stabilität der IRAK2-Varianten einzuschätzen. Dargestellt sind die Daten eines Einzelversuchs. Quelle: eigene Darstellungen, (C) in Zusammenarbeit mit Viktoria Vaaßen (Biochemie-Bachelorstudentin) entstanden.

### 3.5 Effekt von IRAK2[N333D] auf das NF- $\kappa$ B-System

Die Funktionalität der verschiedenen Proteine wurde anhand der CD40-Expression nach Stimulation mit LPS beurteilt. Im Vergleich wurden die im Western Blot untersuchten RAW Sc17-Zellpopulationen mit vergleichbarem Expressionsniveau der verschiedenen IRAK2-Proteine analysiert.

Hierzu wurden die Zellen für 24 h mit 500 ng/mL LPS stimuliert. Wiederum wurde die relative Induktionsrate der CD40-Expression auf Basis des MFI am Durchflusszytometer ermittelt. Für das Berechnen des jeweiligen MFI wurden nur die *Pacific Blue*- und GFP-positiven Zellen herangezogen (Abbildung 9). Dieses Vorgehen stellte sicher, dass die untersuchten Zellen sowohl für die durch die CRISPR/Cas9-Methode eingebrachte *Guide*-RNA (Marker: *Pacific Blue*) als auch für den Fluoreszenzmarker GFP positiv waren.

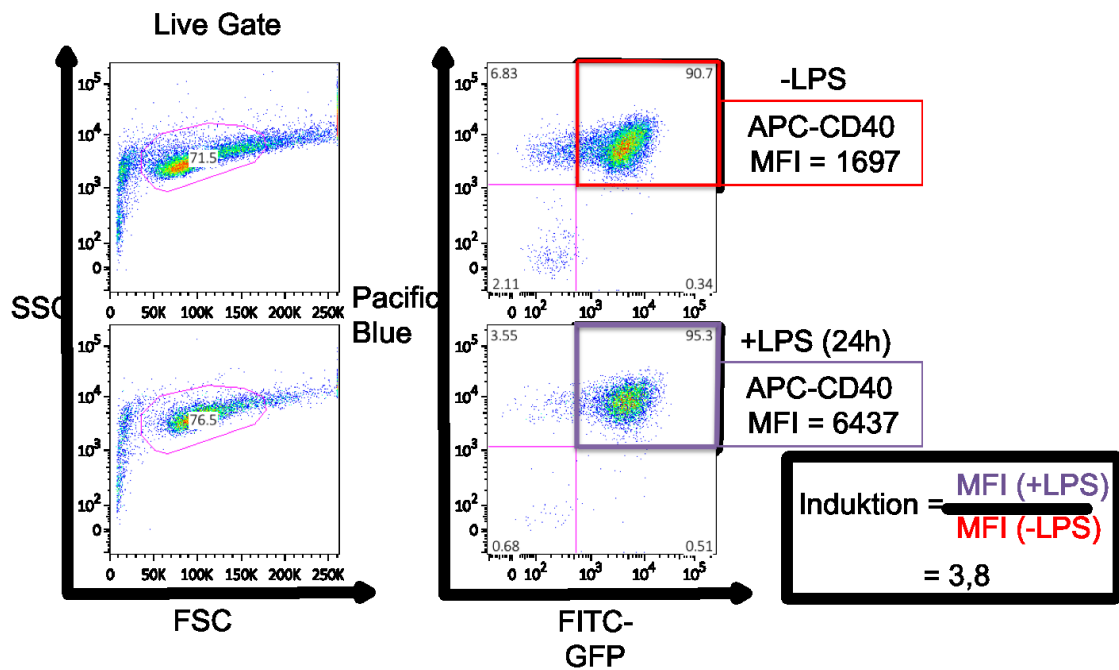


Abbildung 9: Exemplarische Datenerhebung der Induktion der CD40-Expression von RAW Sc17\_IRAK2[N333D]-Zellen.

Repräsentative *Pseudo-Colour-Plots* zur Bestimmung der CD40-Induktion. Nach Setzen von *Gates* auf die jeweils lebenden Zellen (links) wurde ein weiteres Gate auf die *Pacific Blue* und GFP positiven Zellen gesetzt (rechts). Von diesen Zellen wurde der MFI für den CD40-Wert ermittelt. Die Induktion wurde berechnet als Quotient des MFI von stimulierten (24 h mit 500 ng/ml LPS) zu nicht-stimulierten Zellen.

Beim Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Konstrukte fällt auf, dass die CD40-Expression bei RAW Sc17\_IRAK2[N333D]-Zellen mit einer 4,0-fachen Induktion überraschenderweise wesentlich niedriger als in RAW Sc17\_IRAK2 (7,8-fach) ausfiel und sogar ein bisschen niedriger als in RAW Sc17\_IRAK2[K235S] (4,4-fach) war (Abbildung 10). Die CD40-Induktion für IRAK2[E525A] lag wie erwartet im Bereich der nur GFP-positiven Kontroll-Zellen.

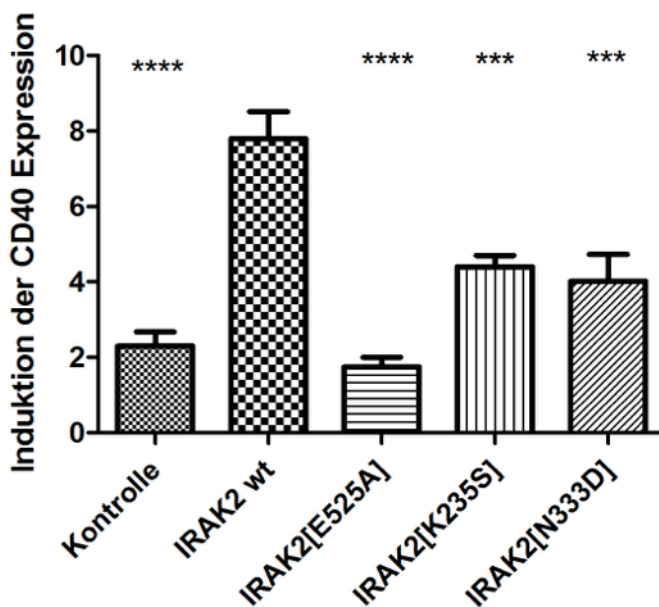


Abbildung 10: Induktion der CD40-Expression von rekonstituierten RAW Sc17-Zellen nach 24 h Stimulation mit LPS (500 ng/ml).

Die Induktion wurde berechnet als Quotient des MFI der stimulierten zum MFI der unstimulierten Zellen des jeweiligen Konstrukts. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SD aus 4 unabhängigen Experimenten. Für detaillierte Werte siehe Anhang Tabelle 15. Zeichen (\*) für p-Werte (S. 33) beziehen sich auf Vergleich zur Induktion von IRAK2 wt-Zellen.

Zusammenfassend lässt sich in dem angewendeten System feststellen, dass durch Substitution des Asparagins an Position 333 durch Asparaginsäure [N333D] im IRAK2 die Aktivität des TLR-Signalwegs, hier gemessen an der CD40-Expression, im Vergleich zu nicht veränderten IRAK2 wt verringert ist.

### 3.5.1 Messung der NF- $\kappa$ B-Expression

Neben der CD40-Expression wurde die NF- $\kappa$ B-Aktivität nach Aktivierung des TLR4-Signalwegs durch LPS gemessen. Die RAW Sc17-Ausgangszellen wurden hierfür mit rRV infiziert, in denen die Expression des Fluoreszenzproteins CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) von einem NF- $\kappa$ B-abhängigen Promoter getrieben wurde (5 NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen). Die Erhebung der Daten der NF- $\kappa$ B-Expression am Durchflusszytometer erfolgte mit der gleichen Methodik wie für die CD40-Expression, nur wurde diesmal der MFI von CFP berechnet, wodurch man eine Aussage über die NF- $\kappa$ B-Aktivität erhielt.

Die generelle Tendenz des Ergebnisses blieb dieselbe wie für die Analyse der CD40-Expression, nur die Induktion der NF- $\kappa$ B-Expression der Zellen mit



IRAK2[K235S] war diesmal im Vergleich mit der IRAK2[N333D]-Mutante minimal geringer: 3,3-fach zu 3,4-fach (Abbildung 11).

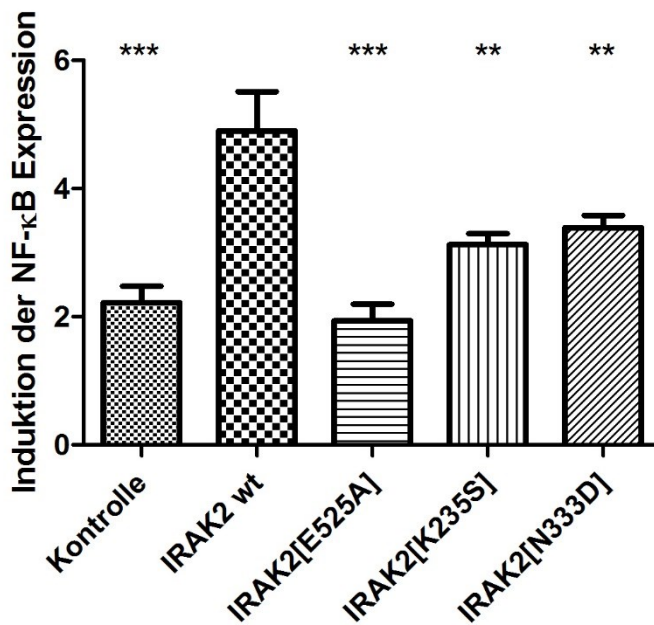


Abbildung 11: Induktion der NF-κB-Expression von rekonstituierten RAW Sc17-Zellen nach 24h Stimulation mit LPS (500 ng/ml).

Die Induktion wurde berechnet als Quotient des MFI der stimulierten zum MFI der unstimulierten Zellen des jeweiligen Konstrukts. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SD aus 4 unabhängigen Experimenten. Für detaillierte Werte siehe Anhang Tabelle 16. Zeichen (\*) für p-Werte (S. 33) beziehen sich auf Vergleich zur Induktion von IRAK2 wt-Zellen.

Insgesamt ergab sowohl die indirekte NF-κB-Messung über die CD40-Expression als auch die direkte NF-κB-Messung über CFP, dass IRAK2[N333D] die LPS-abhängige NF-κB-Aktivierung über den TLR4-Signalweg schlechter ermöglicht als IRAK2 wt. Dies deutet darauf hin, dass die natürlich vorkommende Veränderung des aktiven Zentrums von IRAK2 eine bessere Aktivierung der MyD88-abhängigen NF-κB-Aktivität ermöglicht.

### 3.5.2 Analyse eines weiteren IRAK2-defizienten Zellklons: RAW Sc12

Um die Repräsentativität des oben beschriebenen Effekts sicherzustellen, wurde der Versuch für einen weiteren IRAK2-defizienten RAW-Zellklon wiederholt. Dieser im Folgenden als „RAW Sc12“ bezeichnete Zellklon wurde unabhängig zu den zuvor verwendeten RAW Sc17-Zellen generiert.

Die Untersuchung der RAW Sc12-Zellen ergab tendenziell ähnliche Resultate wie für die RAW Sc17-Zellen (Abbildung 10): So bestätigte sich bei diesem Zellklon, dass die mit für IRAK2 wt-kodierenden rRV infizierten Zellen mit der

3,6-fachen Induktion die höchste Expression von CD40 nach Stimulation mit LPS aufwiesen (Abbildung 12). Auch IRAK2[E525A] war praktisch funktionslos (1,4-fache Induktion). Die Beeinträchtigung des TLR4-Signals der Konstrukte IRAK2[K235S] (3,2-fache Induktion) und IRAK2[N333D] (2,8-fache) im Vergleich zu IRAK2 wt (3,6-fache) blieb zwar erhalten, die Differenz war aber geringer als bei den RAW Sc17. Dies könnte zum einen darin begründet sein, dass das Niveau der Induktionswerte bei den RAW Sc17-Zellen insgesamt deutlich höher als das der RAW Sc12-Zellen ist (Abbildung 10 und 12), wodurch auch der direkte Vergleich zwischen den Ergebnissen beider Zellklone erschwert wird. Zum anderen könnte auch nur der Wert für die RAW Sc12\_IRAK2 zu niedrig ausgefallen sein. Um dies zu überprüfen wurde die Stimulation (24 h) von RAW Sc12\_IRAK2-Zellen mit LPS im folgenden Kapitel nochmal wiederholt.

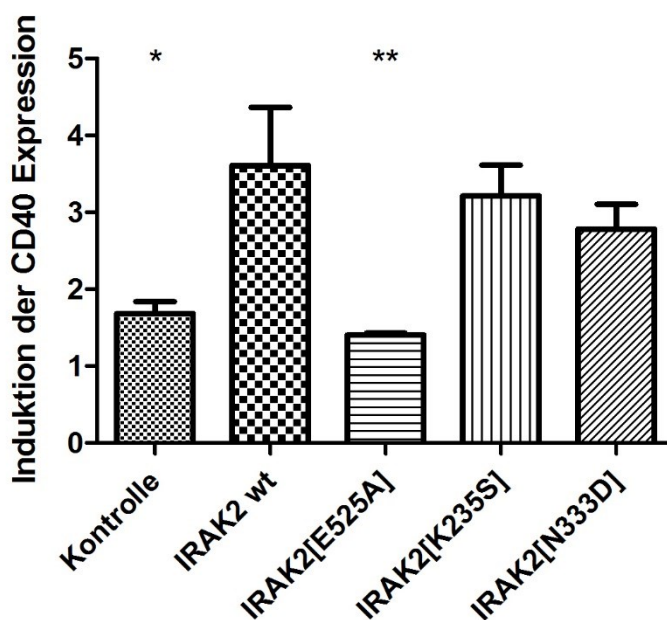


Abbildung 12: Induktion der CD40-Expression von rekonstituierten RAW Sc12-Zellen nach 24h Stimulation mit LPS (500 ng/ml).

Die Induktion wurde berechnet als Quotient des MFI der stimulierten zum MFI der unstimulierten Zellen des jeweiligen Konstrukts. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SD aus 3 unabhängigen Experimenten. Für detaillierte Werte siehe Anhang Tabelle 17. Zeichen (\*) für p-Werte (S. 33) beziehen sich auf Vergleich zur Induktion von IRAK2 wt Zellen.

Insgesamt wich das Ergebnis der Induktion der CD40-Expression bei den RAW Sc12-Zellen zwar im Vergleich zu den RAW Sc17 bei den Absolutwerten ab, die relative Funktionsstärke der IRAK2-Varianten im Vergleich untereinander war aber in beiden Zellklonen gleich.

### 3.5.3 Kinetik der CD40-Expression

Um auszuschließen, dass IRAK2[N333D] nicht nur bei der oben gewählten Dauer der Stimulation (24 h) weniger aktiv als IRAK2 wt ist und um den Induktionswert für RAW Sc12\_IRAK2-Zellen zu überprüfen, wurde die Messung für verschiedene Zeitpunkte (1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 h) nach Stimulation mit LPS (500 ng/ml) in RAW Sc12-Zellen wiederholt. Das Experiment konzentrierte sich bei der Durchführung auf die Untersuchung der Zellen mit IRAK2 wt, IRAK2[N333D] und der Kontroll-Zellen. Die Induktion der CD40-Expression wurde wie zuvor über das Verhältnis des MFI der CD40-Expression zum jeweiligen Messzeitpunkt im Vergleich zum MFI unstimulierter Zellen berechnet. Es zeigte sich, dass die Induktion der CD40-Expression der Zellen mit der IRAK2[N333D]-Mutation nach 24 und 48 h signifikant niedriger ausfiel als die Induktion der Zellen mit IRAK2 wt (Abbildung 13). Nach 8, 24, 48 und 72 h war die Induktion der CD40-Expression in den RAW Sc12\_IRAK2-Zellen signifikant höher als für die Kontroll-Zellen. Die in diesem Versuch für die RAW Sc12\_IRAK2-Zellen nach 24 h Stimulation ermittelte 5,3-fache Induktion deutet darauf hin, dass der in Kapitel 3.5.2 ermittelte Wert (3,6-fach) aufgrund nicht mehr nachvollziehbarer Kulturbedingungen vergleichsweise niedrig ausgefallen war. Insgesamt zeigt das Ergebnis, dass die Mutante IRAK2[N333D] die Weiterleitung der MyD88-abhängigen Signale zu allen Zeitpunkten schlechter bewerkstelligt als IRAK2 wt. Auch dieser Versuch bestätigt die zuvor geäußerte Hypothese, dass die Veränderung des aktiven Zentrums von IRAK2 notwendig war, um eine erhöhte Signalleitung zur ermöglichen.

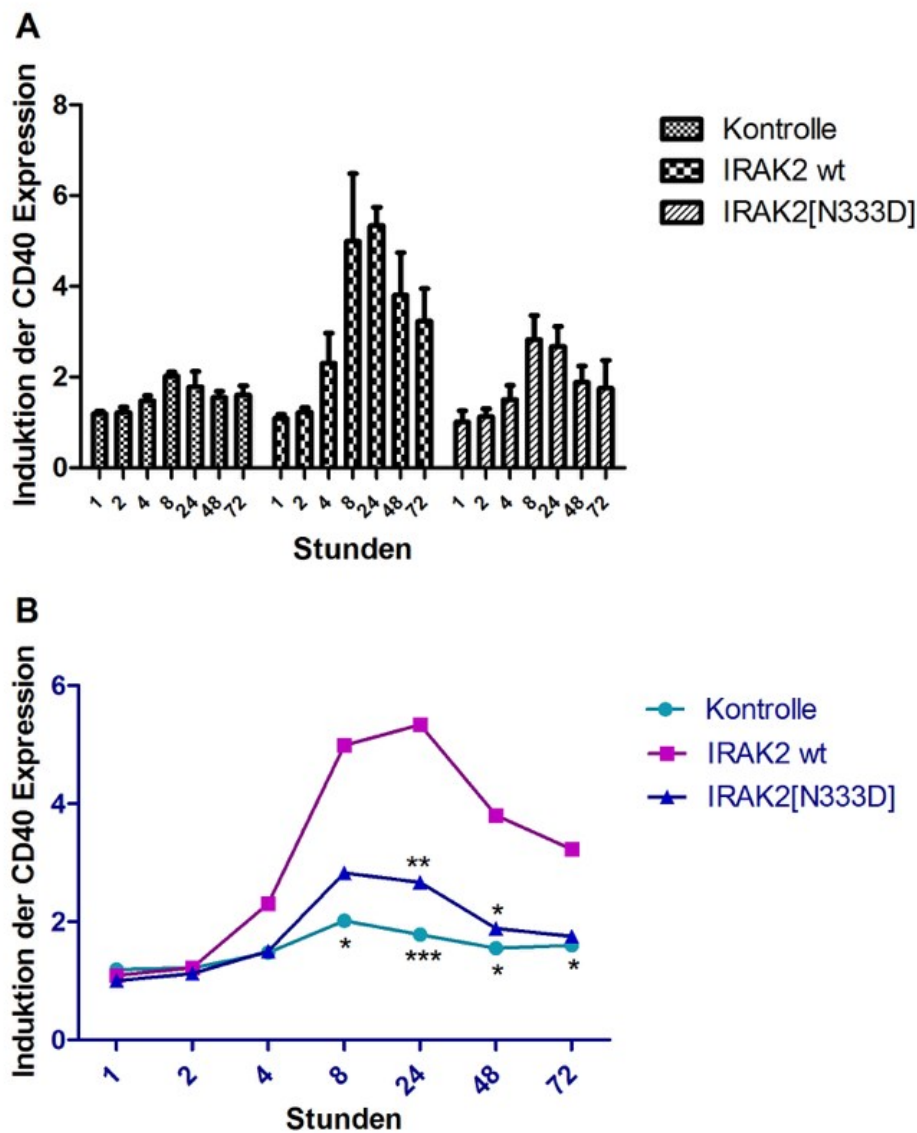


Abbildung 13: Kinetik der Induktion der CD40-Expression von rekonstituierten RAW Sc12-Zellen nach Stimulation mit LPS (500 ng/ml). (A) zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte mit SD, (B) zur besseren Veranschaulichung übereinandergelegt ohne SD. Die Induktion für die gemessenen Zeitpunkte wurde berechnet als Quotient des MFI der stimulierten zum MFI der unstimulierten Zellen des jeweiligen Konstrukts. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Für detaillierte Werte siehe Anhang Tabelle 18. Zeichen (\*) für p-Werte (S. 33) für IRAK2[N333D] und Kontrolle dargestellt, beziehen sich auf Vergleich zur Induktion von IRAK2 wt-Zellen.

## 4 Diskussion

Toll-like Rezeptoren erkennen Pathogene über PAMPs und spielen damit eine zentrale Rolle bei der angeborenen Immunität. Beispielsweise initiiert die Stimulation des TLR4 durch LPS einen Signalweg, der unter anderem in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B endet. NF- $\kappa$ B regt die Expression von Genen an, die für entzündungsfördernde Moleküle kodieren, und führt zu einer gesteigerten Immunabwehr. Durch Fehlregulationen im Signalweg können aber auch chronische Entzündungen entstehen. Diese werden immer wieder mit der Entwicklung von Krebs in Verbindung gebracht (Kawasaki & Kawai, 2014; Ngo et al., 2011; Wang et al., 2014). Grundvoraussetzung für ein regulierendes oder gar therapeutisches Eingreifen in einen Signalweg ist das genaue Verständnis dieses Wegs. Aus diesem Grund wurde die Funktion der an der Regulierung des Signalwegs beteiligten Proteine in den letzten Jahren intensiv untersucht (S. Flannery & Bowie, 2010; Rhyasen & Starczynowski, 2015). Besonderer Fokus lag dabei auch auf IRAK2, da es im Gegensatz zu IRAK1 großen Einfluss auf die späte Phase des TLR4-Signals besitzt und dadurch eher in Verbindung mit chronischen Entzündungen gebracht wird (Jain et al., 2014). Trotz intensiver Forschung ist immer noch umstritten, ob IRAK2 eine inaktive Pseudokinase ist oder eine katalytisch aktive Kinase-Domäne besitzt und welche genauen Folgen dies für die Funktion des Proteins hat.

Um die Bedeutung der Kinaseaktivität für die Funktion von IRAK2 und die Auswirkungen auf den TLR4-Signalweg zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Mutation IRAK2[N333D] analysiert. Ausgangsüberlegung der Mutation war, dass Asparaginsäure bei allen bekannten Kinasen im aktiven Zentrum für deren enzymatische Aktivität absolut essentiell ist. Auch IRAK1 verliert seine enzymatische Funktion, wenn die Asparaginsäure (D) in der Kinase-Domäne durch Asparagin (N) substituiert wird (Vig et al., 1999). Mit der umgekehrten Substitution im IRAK2 von Asparagin an der Position 333 durch Asparaginsäure [N333D] wurde deswegen versucht, die Phosphorylierungsaktivität und katalytische Funktion zu steigern bzw. vergleichbar zu IRAK1 wiederherzustellen.

#### 4.1 Nachweis der geringeren Aktivität von IRAK2[N333D] im Vergleich zu IRAK2 wt

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die CD40-Expression nach Stimulation mit LPS bei Zellen mit IRAK2[N333D] im Vergleich zu Zellen, die mit IRAK2 wt rekonstituiert wurden, überraschenderweise nicht steigern bzw. nicht auf ein ähnliches Niveau wiederherstellen ließ (Kapitel 3.5). Dies bestätigte sich unabhängig sowohl für zwei Zellklone als auch für die direkte und indirekte Messung des NF- $\kappa$ B-Systems über CFP und CD40-Expression.

Die Mutante IRAK2[N333D] wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese in einem retroviralen Vektor generiert. Für die funktionelle Analyse wurde IRAK2[N333D] in 2 unabhängig voneinander generierte IRAK2-defiziente Zellklone (Sc12 und Sc17) der murinen RAW 264.7 Makrophagenzelllinie mit Hilfe rRVs eingeschleust. Durch die Re-Expression von IRAK2 und seinen Mutanten in den beiden Zellklonen wurde ein System etabliert, mit dem der Einfluss der verschiedenen IRAK2-Varianten auf den Signalweg des TLR4 nach LPS-Stimulation quantitativ und reproduzierbar analysiert werden konnte (Kapitel 3.2). Eingeschleustes IRAK2 wt ermöglichte die vollständige Rekonstitution der LPS-abhängigen CD40-Expression der IRAK2-defizienten Zellen (Abbildung 5). Als weiterer Beleg für die Qualität des Systems kann gewertet werden, dass das Ergebnis der nicht infizierten IRAK2-defizienten RAW Sc17-Zellen mit dem der Kontrollpopulation übereinstimmt. Die restliche Induzierbarkeit der RAW Sc17\_co-Zellen ist, wie oben angedeutet, vermutlich auf endogenes IRAK1 zurückzuführen.

Der Einfluss der Mutation auf das NF- $\kappa$ B-System nach LPS-Stimulation (24 h) wurde sowohl indirekt über die CD40-Expression als auch direkt über die NF- $\kappa$ B-getriebene Expression des Reportergens CFP gemessen. CD40 ist ein kostimulatorisches Oberflächenmolekül, dessen Expression durch die Stimulation des TLR hochreguliert wird und das sich durch Anfärben mit einem geeigneten anti-CD40-Antikörper, hier einem APC-konjugierten, mittels Durchflusszytometer quantitativ erfassen lässt. Durch das Berechnen der x-fachen Induktion, also der Normierung des MFI der CD40-Expression von stimulierten zu nicht-stimulierten Zellen, wurde der Vergleich der verschiedenen

Mutationen miteinander und ihrer Auswirkungen auf den Signalweg erleichtert. Neben der Mutation IRAK2[N333D], IRAK2 wt und einer „leeren“ Kontrolle (Zellpopulation infiziert mit rRV, die nur für GFP kodieren) wurden die nicht TRAF6-bindende Mutante IRAK2[E525A] und die nicht ATP-bindende Mutante IRAK2[K235S] in die Analyse miteinbezogen. Um vergleichbare Mengen an integrierten Proviren zu erhalten, wurden infizierte Zellen auf Basis vergleichbarer GFP-Expression mittels Durchflusszytometrie sortiert. Insgesamt erwies sich das verwendete System als geeignete Vorgehensweise, um den Einfluss der IRAK2-Mutationen auf den TLR4-Signalweg reproduzierbar und quantitativ zu analysieren.

#### 4.2 Mögliche Gründe für die geringere Aktivität von IRAK2[N333D]

Für die geringere CD40-Expression der IRAK2[N333D]-Mutante könnten zwei gegensätzliche Gründe ausschlaggebend sein: Zum einen könnte die Mutation im IRAK2 die Phosphorylierungsaktivität bzw. Kinaseaktivität von IRAK2 zwar steigern, aber diese Steigerung eine Modifikation des Proteins wie z.B. eine Ubiquitinierung bedingen und dadurch, vergleichbar wie bei IRAK1, zu einer schnelleren Degradierung führen. Andererseits könnte es sein, dass durch die Mutation die Wiederherstellung der vollen Kinaseaktivität nicht erreicht wurde, sondern dies im Gegenteil zu einer weiteren Beeinträchtigung der Kinaseaktivität und damit zu dem negativen Effekt auf den Signalweg führt.

Zum besseren Verständnis der ersten Hypothese ist eine Darstellung des aktuellen Wissensstands über die Mechanismen bei IRAK1 hilfreich: So gibt es Berichte, dass IRAK1 sowohl durch K48-verlinkte Ubiquitinierung als auch durch K63-verlinkte Ubiquitinierung modifiziert wird (Newton et al., 2008; Ordureau et al., 2008; Rhyasen & Starczynowski, 2015; Windheim et al., 2008). Dabei stand die Markierung durch K48-verlinkte Polyubiquitinketten schon früh als Grund für den schnellen Abbau von IRAK1 fest (Yamin & Miller, 1997), da K48-vernetzte Ubiquitinketten durch das 26S-Proteasom erkannt und in der Folge die so markierten Proteine degradiert werden (Muroi & Tanamoto, 2012; Rhyasen & Starczynowski, 2015). Der Abbau von IRAK1 erfolgt innerhalb 1 h nach Stimulationsbeginn und könnte seinen Sinn in der Vermeidung einer

überschießenden Reaktion z.B. eines septischen Schocks im Zuge einer überhöhten Zytokinproduktion haben (Kawagoe et al., 2008). Danach hält IRAK2 die TLR-Antwort aufrecht (Dunne et al., 2010), da IRAK2 nach LPS-Stimulation stabil bleibt, also keine Degradierung erfährt (Hu, Jacinto, McCall, & Li, 2002). Weshalb sich ein Zusammenspiel von IRAK1 und IRAK2 in der Evolution ergeben hat und nicht die Funktion einer dieser beiden Proteine ausreichend ist, ist nicht geklärt. Schnelle starke initiale Aktivierung des Signalwegs durch IRAK1 und schwächere anhaltende Aktivierung durch IRAK2 könnten eine Erklärung sein.

Phosphorylierungen sind oft der Auftakt für folgende Ubiquitinierungen (Dunne et al., 2010). Bei erfolgreicher Wiederherstellung der Kinaseaktivität bei der N333D-Mutante würde die Phosphorylierungsaktivität im Vergleich zu IRAK2 wt steigen und könnte so zu einer Autophosphorylierung führen. Eine K48-verlinkte Ubiquitinierung mit folgender Degradierung des Proteins könnte die Folge sein. Die niedrigen Werte für die CD40-Expression in IRAK2[N333D] rekonstituierten Zellen könnten in diesem Fall im beschleunigten Abbau von IRAK2[N333D] begründet liegen. Eine erste Analyse der Proteinexpression der IRAK2-Proteine in 293T und RAW-Zellen deuten in diese Richtung (Abbildung 8). Eine detaillierte Analyse war aufgrund des vorgegebenen Zeitrahmens dieser Arbeit nicht mehr möglich. Zur Unterstützung der Hypothese würde es sich anbieten, bei zukünftigen Experimenten die Kinetik des Proteinabbaus von IRAK2[N333D] zu untersuchen. Ferner wäre es äußerst aufschlussreich, zu wissen, ob die hier postulierte Phosphorylierung und Ubiquitinierung von IRAK2[N333D] stattfindet. Die entsprechenden Modifikationen von IRAK2[N333D] könnten mit Hilfe von Kinase Assays und Ubiquitin-spezifischen Western Blots bestimmt werden.

Die zweite Interpretation der Ergebnisse besagt, dass durch die Mutation IRAK2[N333D] die Kinasefunktion nicht nur nicht wiederhergestellt werden konnte, sondern im Gegenteil weiter minimiert bzw. ausgeschaltet wurde. Wie die Mutation IRAK2[K235S] erlaubt auch IRAK2[N333D] nur eine reduzierte Aktivierung der Zellen über TLR4. IRAK2[K235S] verhindert die Bindung von ATP, wodurch eine Kinaseaktivität der Mutante völlig unmöglich erscheint und so der TLR4-Signalweg beeinträchtigt wird (Kawagoe et al., 2008; Pauls et al., 2013;



Yin et al., 2011; Zhou et al., 2017). Da sich die Werte für die CD40-Expression für IRAK2[N333D] sogar niedriger als für IRAK2[K235S] darstellten, ist somit die Interpretation möglich, dass bei IRAK2[N333D] ebenfalls die Kinaseaktivität negativ beeinflusst wurde. Im Einklang mit dieser Interpretation sind die Ergebnisse einer kürzlich veröffentlichten Publikation (Zhou et al., 2017). Dort wurde unter anderem die Mutation IRAK2[N333A] untersucht und deren Auswirkungen auf den TLR4-Signalweg durch die Analyse der Expressionswerte für TNF und CXCL1 mittels ELISA ausgewertet. Die durch Alanin-Substitution (und nicht durch Asparaginsäure-Substitution wie in dieser Arbeit) entstandene Mutante von IRAK2 wird dort als Kinase-inaktiv beschrieben. Die Beeinträchtigung des Signalwegs ähnelt dabei den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen für IRAK2[N333D]. Dies lässt die Interpretation zu, dass durch die Substitution N333D ebenfalls eine Kinase-inaktive IRAK2-Mutante entstanden ist. Für eine abschließende Klärung sind die bereits erwähnten Kinase- und Stabilitätstests von IRAK2[N333D] notwendig. Bei diesen zukünftigen Experimenten sollte ebenfalls die Mutation IRAK2[N333A] in unserem System untersucht werden, um einen direkten Vergleich der Ergebnisse beider Mutanten zu ermöglichen.

#### 4.3 Vergleichskontrollen: IRAK2[K235S] und IRAK2[E525A]

Die Ergebnisse der jetzigen Arbeit mit reduzierter CD40-Expression bei Rekonstitution mit IRAK2[K235S] (Abbildung 10, 11 und 12) bestätigen die erwähnten Literaturergebnisse (Kawagoe et al., 2008; Pauls et al., 2013; Yin et al., 2011; Zhou et al., 2017). Dies steht im Einklang damit, dass IRAK2 - im Kontrast zur ursprünglichen Klassifizierung als „Pseudokinase“ - eine aktive Kinase ist, die somit funktionell auf ATP-Bindung angewiesen ist (Meylan & Tschopp, 2008; Wan et al., 2009; Yin et al., 2011). Dass das Lysin, um eine unerwünschte hydrophobe Wechselwirkung zu vermeiden, in den hier gezeigten Experimenten im Unterschied zur Literatur durch Serin und nicht durch Alanin substituiert wurde (Kawagoe et al., 2008; Pauls et al., 2013; Yin et al., 2011; Zhou et al., 2017), scheint keinen größeren Einfluss zu haben. Alternativ ist es natürlich möglich, dass nur durch ATP-Bindung eine Konformationsänderung von IRAK2

entsteht, die für die volle Aktivität des Proteins nötig ist. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um zwischen den beiden Alternativen zu unterscheiden.

Eine weitere IRAK2-Mutation, die neben IRAK2[K235S] als Negativkontrolle in dieser Arbeit analysiert wurde, ist IRAK2[E525A]. Die dominant negative Beeinträchtigung des Signalwegs durch die bereits bekannte Punktsubstitution kommt durch das Verhindern der Interaktion von IRAK2 mit TRAF6 zustande (Keating et al., 2007; Pauls et al., 2013; Ye et al., 2002). Dies verhindert die Rekrutierung und Polyubiquitinierung von TRAF6 und somit die Rekrutierung und Aktivierung der *downstream* gelegenen Proteine. Dominant negativ bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Überexpression dieser Mutation das NF- $\kappa$ B-System sogar stärker beeinträchtigt als dies bei nicht rekonstituierten IRAK2-defizienten Zellen der Fall ist (Abbildung 10, 11 und 12). Dies spricht dafür, dass die konstitutiv überexprimierte IRAK2[E525A]-Mutante möglicherweise mit der Bindung und/oder Funktion von IRAK1 interferiert und dadurch auch zu einer Blockierung der frühen Phase der NF- $\kappa$ B-Aktivierung beiträgt. Dass die Mutation IRAK2[E525A] auch in unserem System ihren in der Literatur beschriebenen negativen Effekt auf den Signalweg zeigt (Keating et al., 2007; Pauls et al., 2013), bestätigt ihr Verwenden als Vergleichskontrolle zur Überprüfung der Qualität des Systems.

#### 4.4 Bewertung der Expressionskontrolle der IRAK2-Mutanten

Die Resultate der Überexpressions-Kontrolle der IRAK2-Mutanten mittels Western Blots lassen sich im Sinne beider oben ausgeführten Überlegungen interpretieren (Kapitel 4.2). So könnte die im Vergleich zu IRAK2 wt und IRAK2[E525A] schwächere obere Bande für IRAK2[N333D] in den Extrakten von 293T-Zellen zum einen die Folge einer Beeinträchtigung der Phosphorylierungsaktivität sein, aber andererseits auch die Folge davon, dass durch Steigerung der Phosphorylierungsaktivität, gefolgt von sehr schneller Ubiquitinierung, die Menge abnimmt (Abbildung 8 B). Eine Unterscheidung dieser beiden Möglichkeiten ist in zukünftigen Versuchen nach Blockierung der Proteasomen und Verwendung Ubiquitin-spezifischer Western Blots möglich.

Für direkte weiterführende Untersuchungen eignen sich die 293T-Zellen nicht, da sie keinen funktionierenden TLR4 besitzen, der für den LPS-induzierten Abbau der IRAK-Kinasen erforderlich ist (Hu et al., 2002). Ob sich die Bande der RAW Sc17\_IRAK2[K235S] nur aufgrund eines Visualisierungsfehlers schwächer darstellte und warum bei den RAW Sc17 nur Einzelbanden auftraten, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr abschließend festgestellt werden. Insgesamt bestätigt die Expression aller IRAK2-Varianten in der zu erwartenden Größe von ~65 kDa und das Fehlen der IRAK2-Bande bei den Kontroll-Zellen die Anwendung des hier verwendeten Systems (Abbildung 8 B/C).

#### 4.5 Erhöhte Signalleitung durch die entwicklungsgeschichtlich erfolgte Veränderung des aktiven Zentrums von IRAK2

Der negative Einfluss der Mutation IRAK2[N333D] auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach LPS-Stimulation des TLR4 im Vergleich zu IRAK2 wt lässt den Schluss zu, dass die Veränderung des aktiven Zentrums von IRAK2 im Vergleich zu IRAK1 zu einer besseren, d.h. verlängerten Signalleitung führte und somit eine erhöhte und länger anhaltende Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Systems, gefolgt von der Expression von Effektorgenen, ermöglichte. Dies steht im Einklang mit der Erkenntnis, dass IRAK2 für die späten Phasen der TLR-Antworten notwendig ist, IRAK1 dagegen für die frühen (S. M. Flannery et al., 2011; Pauls et al., 2013). Somit kann die verbesserte Signalleitung durch die Veränderung des aktiven Zentrums von IRAK2 als ein Optimierungsschritt in der Entwicklung des Immunsystems hin zu einer effizienteren Immunantwort gewertet werden.

Der grundsätzliche Aufbau von murinem und humanem IRAK2 ist hoch konserviert. Beide scheinen sich jedoch in der Funktion/Rolle zumindest in einigen Zellen zu unterscheiden (S. M. Flannery et al., 2011; Wang et al., 2014). Deswegen müssen zukünftige Untersuchungen erst zeigen, inwieweit die in dieser Arbeit mit den murinen in-vitro Zellen gewonnenen Erkenntnisse sich auf das humane System übertragen lassen. Dennoch ist der Befund für die N333D-Mutation ein weiterer Schritt, um die Funktion des IRAK2-Proteins besser zu verstehen und um IRAK2 in der Zukunft als Ziel therapeutischer Behandlungen anvisieren zu können.

## 5 Zusammenfassung

IRAK2 besitzt eine Schlüsselrolle im Signalweg des TLR4. Fehlregulationen dieses Signalwegs führen zu fehlgeleiteten Immunreaktionen, die auch die Entstehung und Progression von Krebserkrankungen fördern. Bevor IRAK2 als therapeutisches Ziel in Frage kommen kann, muss erst noch weitere Klarheit über die grundsätzliche Funktionsweise dieses Proteins bestehen. So ist für IRAK2 aufgrund der Substitution einer Aminosäure in der Kinase-Domäne im Vergleich zu IRAK1 noch nicht abschließend geklärt, ob es sich um eine aktive Kinase oder eine Pseudokinase handelt und ob diese Veränderung eine Erhöhung oder eine Erniedrigung der Funktion im TLR4-Signalweg nach sich zieht.

Um diese Fragen anzugehen, wurde in dieser Arbeit Asparagin im vermeintlich aktiven Zentrum (Aminosäure 333) wieder zur Asparaginsäure [N333D] revertiert und damit versucht die Phosphorylierungsaktivität zu steigern bzw. vergleichbar zu IRAK1 wiederherzustellen. Das Einbringen der Mutation in IRAK2 erfolgte mittels ortsspezifischer Mutagenese. Mit dieser und anderen Mutanten und mit wildtypischem IRAK2 wurden durch die CRISPR/Cas9-Methode generierte IRAK2-defiziente 264.7 Makrophagen rekonstituiert und damit ein System etabliert, mit dem der Einfluss der Mutation auf den Signalweg des TLR4 nach Stimulation mit LPS quantitativ analysiert werden konnte. Sowohl die indirekte NF- $\kappa$ B-Messung über CD40-Expression als auch die direkte NF- $\kappa$ B-Messung über die NF- $\kappa$ B-getriebene Expression eines Reportergens (*cyan fluorescent protein*) ergab, dass IRAK2[N333D] die LPS-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung über den TLR4-Signalweg schlechter ermöglicht als IRAK2.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die in der Entwicklungsgeschichte aufgetretene Veränderung des aktiven Zentrums von IRAK2 im Vergleich zu IRAK1 zu einer besseren Aktivierung der MyD88-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivität führte und somit eine erhöhte und länger anhaltende Signalleitung ermöglichte. Diese Erkenntnis kann als weiterer Schritt hin zu einem besseren Verständnis der Funktion des IRAK2-Proteins und zu einer

möglichen zukünftigen Verwendung von IRAK2 als Ziel therapeutischer Behandlungen gesehen werden.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Signalwegs des TLR4. ....	6
Abbildung 2: Struktureller Aufbau der IRAKs, sowie die Unterschiede der einzelnen Proteine in Größe, Expressionsort und -muster. ....	9
Abbildung 3: CD40-Expression von RAW-Zellen 24 h nach Stimulation mit LPS. ....	35
Abbildung 4: Vergleich von für pEGZ-MCS (Kontrolle) oder pEGZ-IRAK2 (IRAK2 wt) kodierende RAW Sc17-Zellen mittels Durchflusszytometer. ....	37
Abbildung 5: Vergleich der Induktion nach 24 h LPS-Stimulation verschiedener Zellen: RAW wt; RAW Sc17; RAW Sc17_co (Kontrolle); RAW Sc17_IRAK2. ....	38
Abbildung 6: Sequenzanalyse der Klonierung von pEGZ-IRAK2[N333D]. ....	39
Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung des strukturellen Aufbaus von IRAK2. ....	40
Abbildung 8: Nachweis der Expression der IRAK2-Varianten im Western Blot. ....	41
Abbildung 9: Exemplarische Datenerhebung der Induktion der CD40-Expression von RAW Sc17_IRAK2[N333D]-Zellen. ....	42
Abbildung 10: Induktion der CD40-Expression von rekonstituierten RAW Sc17-Zellen nach 24 h Stimulation mit LPS (500 ng/ml). ....	43
Abbildung 11: Induktion der NF- $\kappa$ B-Expression von rekonstituierten RAW Sc17-Zellen nach 24h Stimulation mit LPS (500 ng/ml). ....	44
Abbildung 12: Induktion der CD40-Expression von rekonstituierten RAW Sc12-Zellen nach 24h Stimulation mit LPS (500 ng/ml). ....	45
Abbildung 13: Kinetik der Induktion der CD40-Expression von rekonstituierten RAW Sc12- Zellen nach Stimulation mit LPS (500 ng/ml). ....	47

---

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antibiotika .....	16
Tabelle 2: Antikörper .....	16
Tabelle 3: Bakterien .....	16
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien .....	17
Tabelle 5: Enzyme .....	18
Tabelle 6: Inhibitoren .....	18
Tabelle 7: Kits .....	18
Tabelle 8: Darstellung der zur Generierung von Plasmiden verwendeten Primer .....	19
Tabelle 9: Puffer und Lösungen .....	20
Tabelle 10: Großgeräte .....	20
Tabelle 11: Rezeptur für Sammelgel .....	32
Tabelle 12: Rezeptur für Trenngel .....	32
Tabelle 13: CD40-Expression von RAW wt-Zellen 24 h nach Stimulation mit 3 verschiedenen LPS-Konzentrationen .....	68
Tabelle 14: Vergleich der CD40-Expression nach 24 h LPS-Stimulation verschiedener Zellen: RAW wt; RAW Sc17; RAW Sc17_co (Kontrolle, rekonstituiert mit pEGZ- MCS); RAW Sc17_IRAK2 (rekonstituiert mit IRAK2 wt) .....	68
Tabelle 15: Induktion der CD40-Expression von rekonstituierten RAW Sc17-Zellen nach 24h Stimulation mit LPS (500 ng/ml) .....	69
Tabelle 16: Induktion der NF- $\kappa$ B-Expression von rekonstituierten RAW Sc17-Zellen nach 24h Stimulation mit LPS (500 ng/ml) .....	69
Tabelle 17: Induktion der CD40-Expression von rekonstituierten RAW Sc12-Zellen nach 24h Stimulation mit LPS (500 ng/ml) .....	70
Tabelle 18: Kinetik der Induktion der CD40-Expression von rekonstituierten RAW Sc12-Zellen nach Stimulation mit LPS (500 ng/ml) .....	70

## 8 Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
AP1	Activation protein1
ATP	Adenosinriphosphat
BCR	B-cell receptor
Bp	Basenpaar
B-Zellen	B-Lymphozyten
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CFP	Cyan fluorescent protein
CMV	Cytomegalie Virus
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
D	Asparaginsäure
DD	Death-Domäne
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Ligase
ECL	Enhanced Chemiluminescence
E. coli	Escherichia coli-Bakterien
EDTA	Ehtylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
ELISA	Enzyme linked immune sorbent assay
Eppi	Eppendorf-Gefäß 1,5 ml
FACS®	Fluorescence activated cell sorter = Durchflusszytometer
FCS	Fetal calf serum = Fetales Kälberserum
GFP	Siehe eGFP, verwendet als Abkürzung für Markerprotein eGFP-Zeo



Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)1-piperacin-ethanolsulfolsäure
HEK 293T	Human Embryonic Kidney 293T-Zelllinie
HOIL	Heme-oxidized iron regulatory protein 2 ubiquitin ligase-1
HOIP	HOIL-1 interagierendes Protein
IFN	Interferon
IKK	Inhibitor der kappa-B Kinase
IL	Interleukin
IRAK	IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase
IRES	Internal ribosomal entry site
IRF	Interferon response factor
JNK	C-Jun N-terminal kinase
K	Lysin
Kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
LB	Lysogeny broth-Medium
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	Long terminal repeat
LRR	Leucin rich repeats = Leucin-reiche Sequenzen
LUBAC	Linear ubiquitination chain assembly complex
MAL	MyD88 adaptor-like
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCS	Multiple cloning site
MHC	Major histocompatibility complex
MEM	Modifiziertes Eagle Medium
MFI	Mittlerer Fluoreszenzintensitäts-Wert
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
MuLV	Muriner Leukämievirus
N	Asparagin
NEMO	NF-kappa-B essential modulator
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NLR	NOD-like Rezeptor
ns	Nicht signifikant
Ori	Origin of replication

PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PRR	Pattern recognition receptor
PVDF	Polyvinylidendifluorid-Membran
RAW	RAW 264.7 Makrophagenzelllinie
RIPK	Receptor-interacting serine/threonine protein kinase
RLR	RIG-I-like Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rounds per minute = Umdrehungen/ min
rRV	Rekombinanter Retrovirus
RT	Reverse Transkriptase
S	Serin
SARM	Sterile- $\alpha$ and armadillo motif containing protein
Sc	Single clone
SD	Standard deviation = Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate = Natriumdodecylsulfat
SHARPIN	SHANK-associated RH domain-interacting protein
TAB	TAK1-bindendes Protein
TAE	Tris Acetat EDTA Puffer
TAK	Transforming growth factor-activated protein kinase
TBK	TANK-bindende Kinase1
TBST	Tris buffered saline with Tween20-Puffer
TCR	T-cell Rezeptor
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	Tumor necrosis factor receptor-associated factor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain containing adaptor inducing IFN- $\beta$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T-Zellen	T-Lymphozyten
U3	Unique 3' Ribonukleinsäuresequenz
UBC	Ubiquitin-conjugating protein (E2)

## 8 Abkürzungsverzeichnis

---

Uev1a	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1A
UV	Ultraviolett
VSV	Vesicular stomatitis virus
wt	Wildtyp
z.B	Zum Beispiel

## 9 Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Cellular and molecular immunology* (Ninth edition ed.). Philadelphia, PA: Elsevier. ISBN: 9780323479783
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783-801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
- Anderson, P. (2008). Post-transcriptional control of cytokine production. *Nat Immunol*, *9*(4), 353-359. doi:10.1038/ni1584
- Boone, D. L., Turer, E. E., Lee, E. G., Ahmad, R. C., Wheeler, M. T., Tsui, C., . . . Ma, A. (2004). The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol*, *5*(10), 1052-1060. doi:10.1038/ni1110
- Chen, Z. J. (2005). Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol*, *7*(8), 758-765. doi:10.1038/ncb0805-758
- Cohen, P. (2014). The TLR and IL-1 signalling network at a glance. *J Cell Sci*, *127*(Pt 11), 2383-2390. doi:10.1242/jcs.149831
- Conze, D. B., Wu, C. J., Thomas, J. A., Landstrom, A., & Ashwell, J. D. (2008). Lys63-linked polyubiquitination of IRAK-1 is required for interleukin-1 receptor- and toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*, *28*(10), 3538-3547. doi:10.1128/mcb.02098-07
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., . . . Chen, Z. J. (2000). Activation of the I kappa B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, *103*(2), 351-361. doi:10.1016/S0092-8674(00)00126-4
- Dunne, A., Carpenter, S., Brikos, C., Gray, P., Strelow, A., Wesche, H., . . . O'Neill, L. A. (2010). IRAK1 and IRAK4 promote phosphorylation, ubiquitination, and degradation of MyD88 adaptor-like (Mal). *J Biol Chem*, *285*(24), 18276-18282. doi:10.1074/jbc.M109.098137
- Elgueta, R., Benson, M. J., de Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y., & Noelle, R. J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*, *229*(1), 152-172. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x
- Flannery, S., & Bowie, A. G. (2010). The interleukin-1 receptor-associated kinases: critical regulators of innate immune signalling. *Biochem Pharmacol*, *80*(12), 1981-1991. doi:10.1016/j.bcp.2010.06.020
- Flannery, S. M., Keating, S. E., Szymak, J., & Bowie, A. G. (2011). Human interleukin-1 receptor-associated kinase-2 is essential for Toll-like receptor-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem*, *286*(27), 23688-23697. doi:10.1074/jbc.M111.248351
- Fujita, H., Rahighi, S., Akita, M., Kato, R., Sasaki, Y., Wakatsuki, S., & Iwai, K. (2014). Mechanism underlying I kappa B kinase activation mediated by the linear ubiquitin chain assembly complex. *Mol Cell Biol*, *34*(7), 1322-1335. doi:10.1128/mcb.01538-13

- Fujita, H., Tokunaga, A., Shimizu, S., Whiting, A. L., Aguilar-Alonso, F., Takagi, K., . . . Iwai, K. (2018). Cooperative domain formation by homologous motifs in HOIL-1L and SHARPIN plays a crucial role in LUBAC stabilization. *Cell Rep*, 23(4), 1192-1204. doi:10.1016/j.celrep.2018.03.112
- Harte, M. T., Haga, I. R., Maloney, G., Gray, P., Reading, P. C., Bartlett, N. W., . . . O'Neill, L. A. (2003). The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J Exp Med*, 197(3), 343-351. doi:10.1084/jem.20021652
- Hassine, H. B., Sghiri, R., Chabchoub, E., Boumiza, A., Slama, F., Baccouche, K., . . . Zemni, R. (2017). IRAK2 is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. doi:10.1007/s10067-017-3906-0
- Hrdinka, M., & Gyrd-Hansen, M. (2017). The Met1-linked ubiquitin machinery: emerging themes of (de)regulation. *Mol Cell*, 68(2), 265-280. doi:10.1016/j.molcel.2017.09.001
- Hu, J., Jacinto, R., McCall, C., & Li, L. (2002). Regulation of IL-1 receptor-associated kinases by lipopolysaccharide. *J Immunol*, 168(8), 3910-3914. doi:10.4049/jimmunol.168.8.3910
- Iwai, K., Fujita, H., & Sasaki, Y. (2014). Linear ubiquitin chains: NF- $\kappa$ B signalling, cell death and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 503. doi:10.1038/nrm3836
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*, 16(4), 343-353. doi:10.1038/ni.3123
- Jain, A., Kaczanowska, S., & Davila, E. (2014). IL-1 receptor-associated kinase signaling and its role in inflammation, cancer progression, and therapy resistance. *Front Immunol*, 5, 553. doi:10.3389/fimmu.2014.00553
- Janeway, C. A., Jr., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216. doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
- Joshi, H. (2017). *Functional dynamics of IRAK2 in macrophages and HECTD1 in B lymphocytes*. Dissertation, Universität Würzburg.
- Kanitz, A., & Gerber, A. P. (2010). Circuitry of mRNA regulation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2(2), 245-251. doi:10.1002/wsbm.55
- Kawagoe, T., Sato, S., Matsushita, K., Kato, H., Matsui, K., Kumagai, Y., . . . Akira, S. (2008). Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol*, 9(6), 684-691. doi:10.1038/ni.1606
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11(5), 373-384. doi:10.1038/ni.1863
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*, 5, 461. doi:10.3389/fimmu.2014.00461
- Keating, S. E., Maloney, G. M., Moran, E. M., & Bowie, A. G. (2007). IRAK-2 participates in multiple toll-like receptor signaling pathways to NF $\kappa$ B via activation of TRAF6 ubiquitination. *J Biol Chem*, 282(46), 33435-33443. doi:10.1074/jbc.M705266200

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. doi:10.1038/227680a0
- Lin, S. C., Lo, Y. C., & Wu, H. (2010). Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*, 465(7300), 885-890. doi:10.1038/nature09121
- Liu, Y., Yin, W., Xu, L., Zhang, H., Liu, Q., & Yin, W. (2018). Identification of a constitutively active mutant mouse IRAK2 by retroviral expression screening. *Mol Biotechnol*, 60(4), 245-250. doi:10.1007/s12033-018-0064-9
- Maloney, G., Schroder, M., & Bowie, A. G. (2005). Vaccinia virus protein A52R activates p38 mitogen-activated protein kinase and potentiates lipopolysaccharide-induced interleukin-10. *J Biol Chem*, 280(35), 30838-30844. doi:10.1074/jbc.M501917200
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*, 9(1), 4-9. doi:10.1016/S0952-7915(97)80152-5
- Meylan, E., & Tschopp, J. (2008). IRAK2 takes its place in TLR signaling. *Nat Immunol*, 9(6), 581-582. doi:10.1038/ni0608-581
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*, 22(2), 240-273, Table of Contents. doi:10.1128/cmr.00046-08
- Muroi, M., & Tanamoto, K. (2012). IRAK-1-mediated negative regulation of Toll-like receptor signaling through proteasome-dependent downregulation of TRAF6. *Biochim Biophys Acta*, 1823(2), 255-263. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.10.003
- Murphy, K. M., & Weaver, C. (2017). *Janeway's immunobiology* (9th edition ed.). New York : London: Garland Science. ISBN: 9780815345510
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P., & Dixit, V. M. (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*, 278(5343), 1612-1615. doi:10.1126/science.278.5343.1612
- Napetschnig, J., & Wu, H. (2013). Molecular basis of NF-kappaB signaling. *Annu Rev Biophys*, 42, 443-468. doi:10.1146/annurev-biophys-083012-130338
- Newton, K., Matsumoto, M. L., Wertz, I. E., Kirkpatrick, D. S., Lill, J. R., Tan, J., . . . Dixit, V. M. (2008). Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell*, 134(4), 668-678. doi:10.1016/j.cell.2008.07.039
- Ngo, V. N., Young, R. M., Schmitz, R., Jhavar, S., Xiao, W., Lim, K. H., . . . Staudt, L. M. (2011). Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*, 470(7332), 115-119. doi:10.1038/nature09671
- O'Neill, L. A. (2008). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev*, 226, 10-18. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00701.x
- Ordureau, A., Smith, H., Windheim, M., Peggie, M., Carrick, E., Morrice, N., & Cohen, P. (2008). The IRAK-catalysed activation of the E3 ligase function of Pellino isoforms induces the Lys63-linked polyubiquitination of IRAK1. *Biochem J*, 409(1), 43-52. doi:10.1042/bj20071365

- Owen, J., Punt, J., Stranford, S. A., & Kubly, J. (2013). *Immunology* (7. ed., internat. ed. ed.). New York, NY: Freeman. ISBN: 9781464137846
- Pauls, E., Nanda, S. K., Smith, H., Toth, R., Arthur, J. S. C., & Cohen, P. (2013). Two phases of inflammatory mediator production defined by the study of IRAK2 and IRAK1 knock-in mice. *J Immunol*, *191*(5), 2717-2730. doi:10.4049/jimmunol.1203268
- Peltzer, N., Darding, M., Montinaro, A., Draber, P., Draberova, H., Kupka, S., . . . Walczak, H. (2018). LUBAC is essential for embryogenesis by preventing cell death and enabling haematopoiesis. *Nature*, *557*(7703), 112-117. doi:10.1038/s41586-018-0064-8
- Qin, H., Wilson, C. A., Lee, S. J., Zhao, X., & Benveniste, E. N. (2005). LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia. *Blood*, *106*(9), 3114-3122. doi:10.1182/blood-2005-02-0759
- Rhyasen, G. W., & Starczynowski, D. T. (2015). IRAK signalling in cancer. *Br J Cancer*, *112*(2), 232-237. doi:10.1038/bjc.2014.513
- Rosati, O., & Martin, M. U. (2002). Identification and characterization of murine IRAK-2. *Biochem Biophys Res Commun*, *297*(1), 52-58. doi:10.1016/S0006-291X(02)02130-7
- Vig, E., Green, M., Liu, Y., Donner, D. B., Mukaida, N., Goebel, M. G., & Harrington, M. A. (1999). Modulation of tumor necrosis factor and interleukin-1-dependent NF-kappaB activity by mPLK/IRAK. *J Biol Chem*, *274*(19), 13077-13084. doi:10.1074/jbc.274.19.13077
- Wan, Y., Xiao, H., Affolter, J., Kim, T. W., Bulek, K., Chaudhuri, S., . . . Li, X. (2009). Interleukin-1 receptor-associated kinase 2 is critical for lipopolysaccharide-mediated post-transcriptional control. *J Biol Chem*, *284*(16), 10367-10375. doi:10.1074/jbc.M807822200
- Wang, H., Flannery, S. M., Dickhofer, S., Huhn, S., George, J., Kubarenko, A. V., . . . Weber, A. N. (2014). A coding IRAK2 protein variant compromises Toll-like receptor (TLR) signaling and is associated with colorectal cancer survival. *J Biol Chem*, *289*(33), 23123-23131. doi:10.1074/jbc.M113.492934
- Wertz, I. E., & Dixit, V. M. (2010). Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *2*(3), a003350. doi:10.1101/cshperspect.a003350
- Wertz, I. E., Newton, K., Seshasayee, D., Kusam, S., Lam, C., Zhang, J., . . . Dixit, V. M. (2015). Phosphorylation and linear ubiquitin direct A20 inhibition of inflammation. *Nature*, *528*(7582), 370-375. doi:10.1038/nature16165
- Wesche, H., Gao, X., Li, X., Kirschning, C. J., Stark, G. R., & Cao, Z. (1999). IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem*, *274*(27), 19403-19410. doi:10.1074/jbc.274.27.19403
- Windheim, M., Stafford, M., Pegg, M., & Cohen, P. (2008). Interleukin-1 (IL-1) induces the Lys63-linked polyubiquitination of IL-1 receptor-associated kinase 1 to facilitate NEMO binding and the activation of IkkappaBalpha kinase. *Mol Cell Biol*, *28*(5), 1783-1791. doi:10.1128/mcb.02380-06

- Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., . . . Akira, S. (2006). Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat Immunol*, 7(9), 962-970. doi:10.1038/ni1367
- Yamin, T. T., & Miller, D. K. (1997). The interleukin-1 receptor-associated kinase is degraded by proteasomes following its phosphorylation. *J Biol Chem*, 272(34), 21540-21547. doi:10.1074/jbc.272.34.21540
- Ye, H., Arron, J. R., Lamothe, B., Cirilli, M., Kobayashi, T., Shevde, N. K., . . . Wu, H. (2002). Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature*, 418(6896), 443-447. doi:10.1038/nature00888
- Yin, W., Wan, Y., Kim, T. W., Yao, P., Xiao, H., Zhou, H., . . . Li, X. (2011). The kinase activity of interleukin-1 receptor-associated kinase 2 is essential for lipopolysaccharide-mediated cytokine and chemokine mRNA stability and translation. *J Interferon Cytokine Res*, 31(5), 415-422. doi:10.1089/jir.2010.0094
- Zhou, H., Bulek, K., Li, X., Herjan, T., Yu, M., Qian, W., . . . Li, X. (2017). IRAK2 directs stimulus-dependent nuclear export of inflammatory mRNAs. *Elife*, 6. doi:10.7554/eLife.29630



## 10 Anhang

Tabelle 13: CD40-Expression von RAW wt-Zellen 24 h nach Stimulation mit 3 verschiedenen LPS-Konzentrationen.

Bemerkung\*: Angegebene Werte entsprechen den APC/CD40-MFI-Werten; \*\*: Angegebene Werte entsprechen der x-fachen Induktion, berechnet aus den zugehörigen MFI-Werten.

LPS-Konzentration	0	50 ng/ml	150 ng/ml	500 ng/ml
Experiment 1*	1303	8471	9627	10238
Experiment 2*	962	6028	6916	8772
Experiment 3*	725	2858	3290	3538
1 Induktion**		6,50	7,39	7,86
2 Induktion**		6,27	7,19	9,12
3 Induktion**		3,94	4,54	4,88
Mittelwert Induktion**		<b>5,10</b>	<b>5,86</b>	<b>7,00</b>

Tabelle 14: Vergleich der CD40-Expression nach 24 h LPS-Stimulation verschiedener Zellen: RAW wt; RAW Sc17; RAW Sc17\_co (Kontrolle, rekonstituiert mit pEGZ-MCS); RAW Sc17\_IRAK2 (rekonstituiert mit IRAK2 wt).

Bemerkung\*: Angegebene Werte entsprechen den APC/CD40-MFI-Werten; \*\*: Angegebene Werte entsprechen der x-fachen Induktion, berechnet aus den zugehörigen MFI-Werten.

Experiment	RAW wt	RAW Sc17	RAW Sc17_co	RAW Sc17_IRAK2
1 (-LPS)*	1303	1754	1465	1773
2 (-LPS)*	962	1235	1255	1315
3 (-LPS)*	725	1099	949	1030
1 (+LPS; 500 ng/ml)*	10238	3708	4041	12567
2 (+LPS; 500 ng/ml)*	8772	2525	2670	11045
3 (+LPS; 500 ng/ml)*	3538	2095	1765	7471
1 Induktion**	7,86	2,11	2,76	7,09
2 Induktion**	9,12	2,04	2,13	8,40
3 Induktion**	4,88	1,91	1,86	7,25
Mittelwert Induktion**	<b>7,29</b>	<b>2,02</b>	<b>2,25</b>	<b>7,58</b>

Tabelle 15: Induktion der CD40-Expression von rekonstituierten RAW Sc17-Zellen nach 24h Stimulation mit LPS (500 ng/ml).

Bemerkung\*: Angegebene Werte entsprechen den APC/CD40-MFI-Werten; \*\*: Angegebene Werte entsprechen der x-fachen Induktion, berechnet aus den zugehörigen MFI-Werten.

Experiment	Kontrolle	IRAK2	IRAK2 [E525A]	IRAK2 [K235S]	IRAK2 [N333D]
1 (-LPS)*	1465	1773	1774	1818	1697
2 (-LPS)*	1255	1315	1242	1320	1357
3 (-LPS)*	949	1030	970	902	1016
4 (-LPS)*	867	1027	1020	1089	857
1 (+LPS; 500 ng/ml)*	4041	12567	2922	7782	6437
2 (+LPS; 500 ng/ml)*	2670	11045	2595	6185	5070
3 (+LPS; 500 ng/ml)*	1765	7471	1714	3643	3529
4 (+LPS; 500 ng/ml)*	2098	8661	1512	5005	4338
1 Induktion**	2,76	7,09	1,65	4,28	3,79
2 Induktion**	2,13	8,40	2,09	4,69	3,74
3 Induktion**	1,86	7,25	1,77	4,04	3,47
4 Induktion**	2,42	8,43	1,48	4,60	5,06
Mittelwert Induktion**	<b>2,29</b>	<b>7,79</b>	<b>1,75</b>	<b>4,40</b>	<b>4,02</b>

Tabelle 16: Induktion der NF- $\kappa$ B-Expression von rekonstituierten RAW Sc17-Zellen nach 24h Stimulation mit LPS (500 ng/ml).

Bemerkung\*: Angegebene Werte entsprechen den APC/CD40-MFI-Werten; \*\*: Angegebene Werte entsprechen der x-fachen Induktion, berechnet aus den zugehörigen MFI-Werten.

Experiment	Kontrolle	IRAK2	IRAK2 [E525A]	IRAK2 [K235S]	IRAK2 [N333D]
1 (-LPS)*	2718	2861	2252	2926	2515
2 (-LPS)*	1900	2276	1720	2302	1873
3 (-LPS)*	1478	1859	1390	1780	1580
4 (-LPS)*	1658	1326	929	1652	1327
1 (+LPS; 500 ng/ml)*	6959	11442	4156	9276	9153
2 (+LPS; 500 ng/ml)*	4335	11768	3642	7560	6243
3 (+LPS; 500 ng/ml)*	3013	9956	3012	5120	5046
4 (+LPS; 500 ng/ml)*	3315	6723	1496	5237	4519
1 Induktion**	2,56	4,00	1,85	3,17	3,64
2 Induktion**	2,28	5,17	2,12	3,28	3,33
3 Induktion**	2,04	5,36	2,17	2,88	3,19
4 Induktion**	2,00	5,07	1,61	3,17	3,41
Mittelwert Induktion**	<b>2,22</b>	<b>4,90</b>	<b>1,94</b>	<b>3,13</b>	<b>3,39</b>

Tabelle 17: Induktion der CD40-Expression von rekonstituierten RAW Sc12-Zellen nach 24h Stimulation mit LPS (500 ng/ml).

Bemerkung\*: Angegebene Werte entsprechen den APC/CD40-MFI-Werten; \*\*: Angegebene Werte entsprechen der x-fachen Induktion, berechnet aus den zugehörigen MFI-Werten.

Experiment	Kontrolle	IRAK2	IRAK2 [E525A]	IRAK2 [K235S]	IRAK2 [N333D]
1 (-LPS)*	1819	3001	1940	1862	2201
2 (-LPS)*	2443	4284	2984	2295	2483
3 (-LPS)*	3067	3919	2714	3544	3733
1 (+LPS; 500 ng/ml)*	2946	11080	2726	6191	6010
2 (+LPS; 500 ng/ml)*	3722	11489	3889	6332	6459
3 (+LPS; 500 ng/ml)*	5718	16934	3883	12576	11693
1 Induktion**	1,62	3,69	1,41	3,32	2,73
2 Induktion**	1,52	2,68	1,30	2,76	2,60
3 Induktion**	1,86	4,32	1,43	3,55	3,13
Mittelwert Induktion**	<b>1,67</b>	<b>3,56</b>	<b>1,38</b>	<b>3,21</b>	<b>2,82</b>

Tabelle 18: Kinetik der Induktion der CD40-Expression von rekonstituierten RAW Sc12-Zellen nach Stimulation mit LPS (500 ng/ml).

Bemerkung\*: Angegebene Werte entsprechen den APC/CD40-MFI-Werten; \*\*: Angegebene Werte entsprechen der x-fachen Induktion, berechnet aus den zugehörigen MFI-Werten.

Stunden	0 (-LPS)	1	2	4	8	24	48	72
1 Kontrolle*	2844	3430	3365	4309	5497	4459	4065	3856
2 Kontrolle*	2331	2901	3146	3639	4925	5085	3928	3969
3 Kontrolle*	2412	2693	2693	3265	4868	3844	3713	4207
1 Kontrolle**		1,21	1,18	1,52	1,93	1,57	1,43	1,36
2 Kontrolle**		1,24	1,35	1,56	2,11	2,18	1,69	1,70
3 Kontrolle**		1,12	1,12	1,35	2,02	1,59	1,54	1,74
Mittelwert Kontrolle**		<b>1,19</b>	<b>1,22</b>	<b>1,48</b>	<b>2,02</b>	<b>1,78</b>	<b>1,55</b>	<b>1,60</b>
1 IRAK2*	3929	4639	5226	11638	25733	22783	19206	15936
2 IRAK2*	3282	3343	3956	7612	15906	16956	10492	9318
3 IRAK2*	2986	3237	3366	4898	10652	15059	9914	8324
1 IRAK2**		1,18	1,33	2,96	6,55	5,80	4,89	4,06
2 IRAK2**		1,02	1,21	2,32	4,85	5,17	3,20	2,84
3 IRAK2**		1,08	1,13	1,64	3,57	5,04	3,32	2,79
Mittelwert IRAK2**		<b>1,09</b>	<b>1,22</b>	<b>2,31</b>	<b>4,99</b>	<b>5,34</b>	<b>3,80</b>	<b>3,23</b>
1 IRAK2[N333D]*	3170	3353	3693	5144	9562	9355	6278	5676
2 IRAK2[N333D]*	3634	2634	3337	4179	8120	7802	5420	4087
3 IRAK2[N333D]*	2650	3223	3397	4602	8552	7698	5800	6235
1 IRAK2[N333D]**		1,06	1,16	1,62	3,02	2,95	1,98	1,79
2 IRAK2[N333D]**		0,72	0,92	1,15	2,23	2,15	1,49	1,12
3 IRAK2[N333D]**		1,22	1,28	1,74	3,23	2,90	2,19	2,35
Mittelwert IRAK2[N333D]**		<b>1,00</b>	<b>1,12</b>	<b>1,50</b>	<b>2,83</b>	<b>2,67</b>	<b>1,89</b>	<b>1,76</b>

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Ingolf Berberich bedanken, der mich auf das interessante Thema aufmerksam gemacht hat und in allen Phasen meiner Arbeit immer für mich ansprechbar war. Danke für Ihre fachliche Betreuung, Motivation, konstruktive Kritik und Hilfsbereitschaft.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Berberich möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima aufrichtig bedanken. Andrea Peters und Kai Böhmer danke ich besonders, da sie mich mit hohem persönlichem Einsatz in die praktische Labortätigkeit eingearbeitet haben und mich auch während der gesamten weiteren Laborzeit mit viel Geduld, Interesse und Hilfsbereitschaft unterstützt haben.

Daneben möchte ich mich herzlich bei Stephanie Haack für die Hilfe bei der statistischen Auswertung bedanken.

Abschließend möchte ich meiner Freundin und meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester danken, die mir mein Studium und diese Arbeit durch ihre ausdauernde Unterstützung und ihren Zuspruch erst ermöglicht haben.