

Entwicklung synthetischer Zytokinrezeptoren für Interleukin-22 und die Tumornekrosefaktor-Superfamilie



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sofie Moßner

aus Düsseldorf

Düsseldorf, Juli 2020

aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller

2. Prof. Dr. rer. nat. Björn Stork

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2020

„Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge sind, wie sie sind.“

Aristoteles

Abkürzungen und Fachbegriffe

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
(v/w)	Volumen pro Volumeneinheit	min	Minuten
(w/w)	Gewicht pro Volumeneinheit	mg	Milligramm
α	Anti/gegen	mL	Milliliter
μL	Mikroliter	mM	Millimolar (mmol/L)
ad	bis zu einem Endvolumen von	mRNA	Messenger RNA
AK	Antikörper	N-Terminal	Aminoterminal
Amp	Ampicillin	nm	Nanometer
APS	Ammoniumpersulfat	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
AS	Aminosäure	PCR	Polymerasekettenreaktion
bp	Basenpaare	qPCR	Real Time/Quantitative PCR
BSA	Rinderserumalbumin	prim.	Primär
ca.	circa	PVDF	Polyvinylidenfluorid
C-Terminal	Carboxyterminal	R	Rezeptor
ddH ₂ O	Zweifach destilliertes Wasser	RNA	Ribonukleinsäure
dH ₂ O	Einfach destilliertes Wasser	RT	Raumtemperatur
Da	Dalton	SDS	Natriumdodecylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	sek.	Sekundär
ECD	Extrazelluläre Domäne	STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	TEMED	Tetramethylethylendiamin
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>	TMD	Transmembrandomäne
et al.	und andere	UpM	Umdrehungen pro Minute
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>	VHH	Nanobody
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	Δ	Deletion
gp130	Glykoprotein 130		
h	Human bzw. Stunde		
ICD	Intrazelluläre Domäne		
IL	Interleukin		
M	Molar (mol/L)		
m	Murin		

Ein-Buchstaben-Aminosäurecode

Neutrale Aminosäuren		Polare Aminosäuren	
A	Alanin	N	Asparagin
G	Glycin	C	Cystein
I	Isoleucin	Q	Glutamin
L	Leucin	M	Methionin
F	Phenylalanin	S	Serin
P	Prolin	T	Threonin
W	Tryptophan	Y	Tyrosin
V	Valin		
Basische Aminosäuren		Saure Aminosäuren	
R	Arginin	D	Asparaginsäure
H	Histidin	E	Glutaminsäure
K	Lysin		

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Fachbegriffe.....	1
Inhaltsverzeichnis.....	3
Zusammenfassung.....	6
Summary.....	7
1. Einleitung.....	8
1.1 Synthetische Rezeptorsysteme als Werkzeug der synthetischen Biologie.....	8
1.2 Zytokine – eine Übersicht.....	11
1.3 gp130 vermittelte Signaltransduktion.....	12
1.4 Interleukin-10 Familie.....	14
1.4.1 Die Rolle von IL-22 im Immunsystem und dessen Regulation.....	15
1.5 Die Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie.....	16
1.5.1 Die Signaltransduktion von TNFR1, TNFR2 und FasR und ihre Wirkungsbereiche.....	18
1.6 Ziel der Arbeit.....	21
2. Material und Methoden.....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Antibiotika.....	22
2.1.2 Antikörper.....	22
2.1.3 Chemikalien.....	23
2.1.4 Geräte.....	25
2.1.5 Kits.....	26
2.1.6 Kulturmedien.....	26
2.1.7 Oligonukleotide.....	26
2.1.8 Plasmide.....	27
2.1.9 Puffer und Lösungen.....	28
2.1.10 Verbrauchsmaterialien.....	30
2.1.11 Zelllinien und Bakterienstämme.....	31
2.1.12 Zytokine.....	31
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	31
2.2.1.1 DNA-Gelelektrophorese.....	31
2.2.1.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	32
2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen.....	32
2.2.1.4 Restriktionsspaltung von DNA.....	32
2.2.1.5 Dephosphorylierung von DNA.....	33
2.2.1.6 Phosphorylierung von DNA.....	33
2.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten.....	33
2.2.1.8 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente <i>Escherichia coli</i> Bakterien.....	33

2.2.1.9	Mini Präparation von Plasmid-DNA.....	34
2.2.1.10	Midi-Präparation von Plasmid DNA.....	34
2.2.1.11	RNA-Isolation	34
2.2.1.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction).....	35
2.2.1.13	Quantifizierende real-time qPCR	37
2.2.1.14	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	38
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	38
2.2.2.1	Herstellung von Zelllysaten.....	38
2.2.2.2	Bestimmung des Proteingehalts mittels Bicinchoninsäure (BCA).....	38
2.2.2.3	SDS-PAGE	38
2.2.2.4	Coomassie Färbung von SDS-Gelen.....	39
2.2.2.5	Western Blot.....	39
2.2.2.6	<i>Strippen</i> von Western Blot-Membranen	40
2.2.2.7	Fc-Tag Affinitätschromatographie	40
2.2.2.8	Hydrolyse des Fc-Tags per TEV-Protease.....	40
2.2.2.9	Size exclusion chromatographie	41
2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	41
2.2.3.1	Kultivierung von adhärennten und Suspensionszellen	41
2.2.3.2	Transfektion von adhärennten Zellen.....	41
2.2.3.3	Retrovirale Transduktion von Ba/F3/gp130-Zellen	42
2.2.3.4	Durchflusszytometrie	42
2.2.3.5	Proliferationsassay	42
2.2.3.6	Stimulationsassay und Ba/F3/gp130-Zellen.....	43
2.2.3.7	Zelltodbestimmung mittels 7-AAD und Annexin V.....	43
2.2.3.8	Bindung GFP an GFP _{VHH}	44
2.2.3.9	Immunpräzipitation	44
2.2.3.10	Stabile CHO K1 Zellen.....	45
2.2.3.11	Kultivierung von CHO K1 Zellen in Rollerbottles	45
3.	Ergebnisse	46
3.1	Expression und Reinigung aktiver synthetischer Liganden.....	46
3.2	Analyse der IL-22 Signaltransduktion	54
3.2.1	Homodimere Signaltransduktion des IL-22R α 1 und IL-10R2.....	61
3.2.2	Analyse der IL-10R2 ICD zur Identifizierung von möglichen Bindemotiven.....	68
3.2.3	IL-10R2-SyCyR bildet aktive Heterodimere mit dem IL-6 Rezeptor gp130	76
3.3	Aktivierung des trimeren TNFR1 und TNFR2 als synthetischen Rezeptor.....	80
3.4	FasR-SyCyR induziert selektiv Apoptose in Ba/F3/gp130-Zellen.....	85
3.5	Modifizierung des SyCyR-Systems für eine klinische Anwendung.....	97
4.	Diskussion.....	100
4.1	Fc-Fusionsproteine aktivieren die Signaltransduktion von gp130	100
4.2	Synthetische Rezeptoren kopieren die IL-22 Signaltransduktion	102

4.3	Der IL-10R2-Homodimer kann eine Signaltransduktion induzieren.....	103
4.4	Das SyCyR-System ist auf höhergeordnete Rezeptoren übertragbar	106
4.4.1	Es gibt keinen <i>cross-talk</i> zwischen dem TNFR1 und TNFR2.....	106
4.4.2	Aktivierung von FasR-SyCyR führt zur Apoptose in Ba/F3/gp130-Zellen.....	108
4.5	Zukünftige Anwendung des SyCyR-Systems	111
5.	Literaturverzeichnis	115
6.	Anhang.....	130
7.	Danksagung.....	139

Zusammenfassung

Für die fortschreitende Entwicklung personalisierter Medizin ist es dringend erforderlich das Immunsystem detaillierter zu verstehen, um etwaige Fehlsteuerung gezielter Therapien zu können. Hierfür ist es unter anderem erforderlich die Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren genauer zu analysieren. Das *Synthetic Cytokine Receptor* (SyCyR)-System stellt eine Möglichkeit dar, die Signalwege der Zytokine ohne Hintergrundaktivierungen zu analysieren. Als extrazelluläre Domäne besitzen die Rezeptoren einen Nanobody gegen grün fluoreszierendes Protein (GFP) oder mCherry, während die Transmembrandomäne und die intrazelluläre Domäne des jeweiligen, zu analysierenden Rezeptors verwendet wird. Das System umfasst neben den synthetischen Rezeptoren auch synthetische Liganden (GFP/mCherry-Fusionsproteine), welche ich im Rahmen dieser Arbeit zunächst modifiziert habe. Die Fusion der Liganden GFP oder mCherry an den Fc-Teil eines IgG Antikörpers ermöglichte dabei die Reinigung der Proteine über eine Protein-A Affinitätschromatographie. Weiter habe ich festgestellt, dass die Distanz der beiden Liganden, welche über die Fc-Domäne dimerisiert werden, ausreicht, um einen Homodimeren SyCyR zu aktivieren. Die Distanz der Liganden spielt dahingehend eine Rolle, dass die Zytokinrezeptoren in einer nahen Juxtaposition vorliegen müssen, um aktiviert zu werden.

Weiterhin habe ich gezeigt, dass das SyCyR-System dazu genutzt werden kann, die Signaltransduktion von IL-22 zu kopieren. Zusätzlich habe ich analysiert, ob die beiden IL-22 bindenden Rezeptoren IL-10R2 und IL-22R α 1 auch dazu in der Lage sind, aktive Homodimere zu bilden. Eine solche Analyse war mittels SyCyRs möglich und offenbarte aktive Homodimere für den IL-10R2. Zusätzlich kann das SyCyR-System dazu genutzt werden, Zytokinrezeptoren verschiedener Klassen oder Familien zu di- oder oligomerisieren, welche endogen keinen gemeinsamen Liganden aufweisen. Hierbei habe ich gezeigt, dass der IL-10R2 auch mit gp130 einen aktiven Heterodimer ausbilden kann.

Zuletzt habe ich analysiert, ob die SyCyR-Methode auch bei trimeren Rezeptoren funktional ist. Hierfür wurden Mitglieder der Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie ausgewählt. Es zeigte sich, dass alle drei Rezeptoren (TNFR1, TNFR2, FasR) als SyCyR aktiviert werden konnten. Der TNFR1 und TNFR2 binden endogen beide an TNF α und es wurde mittels SyCyRs analysiert, ob die Rezeptoren auch als Heterotrimer aktiviert werden können, was jedoch nicht der Fall war. Weiter konnte ich zeigen, dass die SyCyRs auch als Zelltod-vermittelnde Rezeptoren funktionieren, wie die durch den FasR-SyCyR eingeleitete Apoptose zeigte. Hierbei konnte zudem detektiert werden, dass der FasR-SyCyR auch schon als Dimer eine leicht geminderte Aktivität zeigt, welche ebenfalls in der Lage ist, Apoptose zu induzieren.

Summary

Personalized medicine is a rapidly advancing field. However, further research on the immune system is required to target potential misfunctions more efficiently for therapy. Therefore, it is significant to analyze cytokine receptor induced signal transduction more accurately. Synthetic cytokine receptors (SyCyRs) represent tools to analyze cytokine signaling pathways without background activation. The extracellular domains of the SyCyRs are composed of a nanobody directed against either green fluorescent protein (GFP) or mCherry and the transmembrane and the intracellular domain of the receptor of interest. The system needs also synthetic ligands (GFP/mCherry fusion proteins), which I modified in the context of this work. The fusion of the ligands GFP or mCherry to the Fc-part of an IgG antibody facilitated the purification of ligands through Protein-A affinity chromatography. Additionally, the Fc-domain maintains the dimerization of their fusion proteins. I verified that the distance of Fc-mediated dimerization between the ligands is sufficient for the activation of homodimeric SyCyRs. Distance between ligands is crucial to activate the cytokine receptors as they need to be in a close juxtaposition.

Furthermore, I was able to show that one can use the SyCyR-system to phenocopy the signal transduction of IL-22. Moreover, I analyzed if the IL-22 binding receptors IL-10R2 and IL-22R α 1 form active homodimers. Such an analysis was possible through the SyCyRs and revealed active homodimers for the IL-10R2. Additionally, the SyCyR-system helps to bring together cytokine receptors of different classes and families as di- or oligomers without shared natural ligands. As such, we could demonstrate that IL-10R2 and gp130 can form active heterodimers.

Finally, I analyzed if it is possible to transfer the SyCyR method to trimeric receptors. For this purpose, we selected members of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily. I was able to show that all three receptors (TNFR1, TNFR2, FasR) were active as SyCyRs. Natural TNFR1 and TNFR2 both bind to TNF α . Using SyCyRs I further looked whether the receptors can also form active heterotrimers, which was not the case. Moreover, I detected that SyCyRs were also able to induce cell death since the FasR-SyCyR induced apoptosis upon stimulation. Here, we could observe that the FasR-SyCyR is already active as a dimer. This dimeric activation was a little impaired but still able to induce apoptosis.

1. Einleitung

1.1 Synthetische Rezeptorsysteme als Werkzeug der synthetischen Biologie

Zytokine sind kleine, mehrfach glykosylierte Proteine, welche von verschiedenen Zelltypen sezerniert werden und essenziell an der Kontrolle von Autoimmun-, Immunreaktionen, diversen physiologischen Prozessen sowie an der Krebsentwicklung beteiligt sind [1]. Um diese Prozesse besser zu analysieren und personalisierte Therapien zu entwickeln, kommt vermehrt die synthetische Biologie zum Einsatz [2]. Unter synthetischer Biologie versteht man einen um das Jahr 2000 entstandenen Forschungsbereich, welcher sich damit befasst, biologische Systeme mit neuen, maßgeschneiderten Eigenschaften auszustatten. Diese neuen Systeme können unter anderem in der Industrie für die Produktion von z.B. Biokraftstoff verwendet werden, oder aber in der medizinischen Forschung zur Analyse von Krankheiten.

Bereits 1996 wurde an Hand von regulierbaren, synthetischen Rezeptoren der Signalweg des IL-6 signalgebenden Rezeptors gp130 analysiert [3]. Der synthetische Rezeptor bestand hierbei aus der extrazellulären Domäne des Erythropoetin Rezeptors (EpoR) und der TMD und ICD von gp130 [3] (**Abbildung 1**). Aktiviert wurde dieser Rezeptor durch Erythropoetin (Epo), dem natürlichen Liganden des EpoR [3]. An Hand dieses Systems wurde der gp130 Signalweg zwar künstlich aktiviert, jedoch gab es auch Hintergrundsignale durch die Aktivierung des natürlichen Epo-Signalweges [3].

Konstitutiv aktives gp130 kommt in ca. 60 % aller Patienten mit entzündlichen, hepatozellulären Adenomen vor und wurde ebenfalls mittels synthetischer Biologie analysiert [4-6]. Dabei entsteht das konstitutiv aktive gp130 meist durch in-frame Deletionen des IL-6-bindenden Bereiches der ECD von gp130 [4]. Für die Analyse des konstitutiv aktiven gp130 wurde die extrazelluläre Domäne durch Leucin Zipper ersetzt, welche den Rezeptor durch ihre *coiled-coil* Domäne dauerhaft dimerisieren [7] (**Abbildung 1**). Eine weitere Methode zur Generierung von konstitutiv aktivem gp130 wurde 2018 von Lamertz *et al.* publiziert. Hierbei führte die Deletion von drei Fibronektindomänen sowie eine Verkürzung der *stalk*-Region von gp130 zu einer Ligand-unabhängigen, konstitutiv aktiven gp130 Rezeptorvariante [8].

Ein synthetischer Ansatz wurde weiterhin bei der Analyse der Signaltransduktion von IL-35 und IL-39 verwendet, welche geteilte Mitglieder der IL-6 und IL-12 Zytokinfamilien sind [9]. Dies war notwendig, da die beiden Zytokine nicht als rekombinante, biologisch aktive Moleküle verfügbar sind. Zur Analyse der IL-35/39 Signaltransduktion wurden die extrazellulären Domänen von Mitgliedern der IL-6/IL-12-Zytokinfamilien, wie z.B. IL-12R β 1 und IL-12R β 2, mit denen der IL-35/39 responsiven Rezeptoren, wie gp130, IL-12R β 1, IL-12R β 2, WSX-1 und

IL-23R, kombiniert [9] (**Abbildung 1**). Die chimären Rezeptoren konnten dann durch rekombinantes IL-12 aktiviert werden [9]. Dieses synthetische Verbinden von extra- und intrazellulären Domänen ermöglichte die Analyse der IL-35 und IL-39 Signalwege.

Die zunehmende Bedeutung synthetischer Rezeptorsysteme zeigt sich durch die Zulassung der ersten Anti-Tumor-Therapie, welche auf synthetischen Rezeptoren basiert. 2017 hat die *U.S. Food and Drugs Administration* (FDA) *chimeric antigen receptors* (CAR) für die Behandlung von akuter lymphatischer Leukämie (ALL) sowie großzelliger B-Zell Lymphome zugelassen [10-12]. CARs bestehen aus einem Antikörperfragment (*single chain variable fragment*, scFv) als extrazelluläre Domäne, welches gegen das Antigen CD19 gerichtet ist, das auf tumorigenen B-Zellen verstärkt exprimiert wird [13, 14]. Weiterhin besitzen die CARs eine *hinge*-Region, welche die Flexibilität der Antigenbindung erhöht, eine TMD sowie eine zusammengesetzte intrazelluläre T-Zellsignaldomäne [15]. Diese besteht z.B. aus der Region eines CD3 T-Zell Rezeptorkomplexes, der CD3 ζ Kette, oder einem Fc-Rezeptor γ [11, 16-18] (**Abbildung 1**). In der Behandlung werden dem Patienten T-Zellen entnommen und mit der cDNA des CAR transduziert, selektiert, expandiert und dem Patienten dann per Infusion zurückgegeben [19]. Die CAR T-Zellen können dann das Tumorantigen erkennen und bilden CAR-Cluster, welche die CAR T-Zelle aktiviert [1]. Die T-Zelle kann die Tumorzelle dann per Zytotoxizität töten, was gegebenenfalls zu einer Tumorremission führt [20]. Die Aktivierung der T-Zellen führt jedoch in vielen Fällen auch zu einer Überreaktion des Immunsystems, verbunden mit einem *cytokine release syndrom* (CRS) und schweren Nebenwirkungen [19]. Die Reduzierung dieser Nebenwirkung ist zurzeit das Ziel vieler Forschungsgruppen, welche auch hierfür meist einen synthetischen Ansatz verfolgen [21].

Neben synthetischen Rezeptoren wird auch an synthetischen Zytokinen gearbeitet. Zytokine sind stark pleiotrop und können bei verschiedenen Zelltypen andere Wirkungen erzielen [22, 23]. Daher wird unter anderem versucht Zytokine so zu designen, dass sie nur noch an bestimmte Zelltypen binden können [1]. Zytokine besitzen meist zwei Rezeptorbindestellen, um eine Rezeptordimerisierung zu ermöglichen. Die Mutation dieser Bindestellen verändert demnach die Wirkungsweise des Zytokins. Zytokine, bei welchen eine Bindestelle mutiert wurde, sodass sie nicht mehr bindet, werden als dominant-negativ bezeichnet [24]. Die Fusion zwei solcher dominant-negativer Zytokine wird Synthekin genannt. Sie kann die Dimerisierung von zwei Rezeptoren bewirken, welche auf natürlichem Wege nicht miteinander interagieren und dadurch neue Signalwege aktivieren [25]. Synthetische Zytokine können somit ihren endogenen Aufgabenbereich erweitern und durch Veränderungen ihren Wirkungsbereich ausweiten, ihre Stabilität erhöhen oder sich Zugang zu verschiedenen Geweben schaffen [26].

Einen weiteren Ansatz stellt die Verwendung von bispezifischen Antikörpern dar. Diese binden zwei verschiedene Antigene und können so z.B. Proteine zusammenbringen oder auch

T-Zellen zum Tumor führen [27]. Der Großteil dieser bispezifischen Antikörper wird in der Krebstherapie eingesetzt, wobei die eine Seite des Antikörpers z.B. den CD3-Rezeptor von T-Zellen als Antigen besitzt und die andere Seite ein tumorspezifisches Antigen [28]. Durch diese räumliche Rekrutierung soll die T-Zelle dann die Tumorzelle bekämpfen.

Das im Folgenden beschriebene synthetische Rezeptorsystem verwendet sowohl synthetische Rezeptoren, als auch Liganden [29]. Die Rezeptoren bestehen hierbei aus einem Einzeldomänenantikörper (Nanobody, VHH) gegen grün fluoreszierendes Protein (GFP) oder mCherry als extrazelluläre Domäne und der TMD und ICD, des jeweils verwendeten Rezeptors der IL-6 oder IL-12 Zytokinfamilie [29] (**Abbildung 1**). Bei einem Nanobody handelt es sich um die variable Domäne eines Schwere-Ketten-Antikörpers (HcAb). Diese wurden 1993 von Hamers-Castermann und Kollegen im Serum von Camelidae entdeckt [30]. HcAb sind ca. 90 kDa groß und bestehen aus zwei konstanten Domänen, einer *hinge*-Region und einer Antigen-bindenden Domäne, der *variable heavy chain domain* (VHH) oder auch Nanobody genannt [30]. Das Besondere an dieser Domäne ist, dass sie auch isoliert dieselben Bindungsaffinitäten aufweist, wie als vollständiger Antikörper [30]. Auf Grund ihrer geringen Größe von ca. 15 kDa sind Nanobodies gut löslich, stabil und weisen eine sehr gute Gewebepenetration auf [31-34]. Für die hier beschriebenen synthetischen Zytokinrezeptoren (SyCyRs) wurden dieses Antikörperfragment als extrazelluläre Domäne eingesetzt, welche entweder GFP oder mCherry binden [35, 36]. Damit ist es in diesem System möglich, synthetische Zytokine zu verwenden, welche aus Fusionsproteinen aus GFP und mCherry als Homo- oder Heteroprotein bestehen [29]. Die Anwendung dieses Systems für Mitglieder der IL-6/12 Zytokinfamilie hat gezeigt, dass die Signaltransduktion in höchstem Maße zwischen den SyCyRs und den endogenen Rezeptoren übereinstimmt [29]. Durch den Einsatz von nicht-endogenen Proteinen als Ligand ist die dadurch induzierte Signaltransduktion hintergrundfrei und gewährleistet eine Analyse von exakt den Rezeptoren, welche als SyCyR generiert wurden [29].

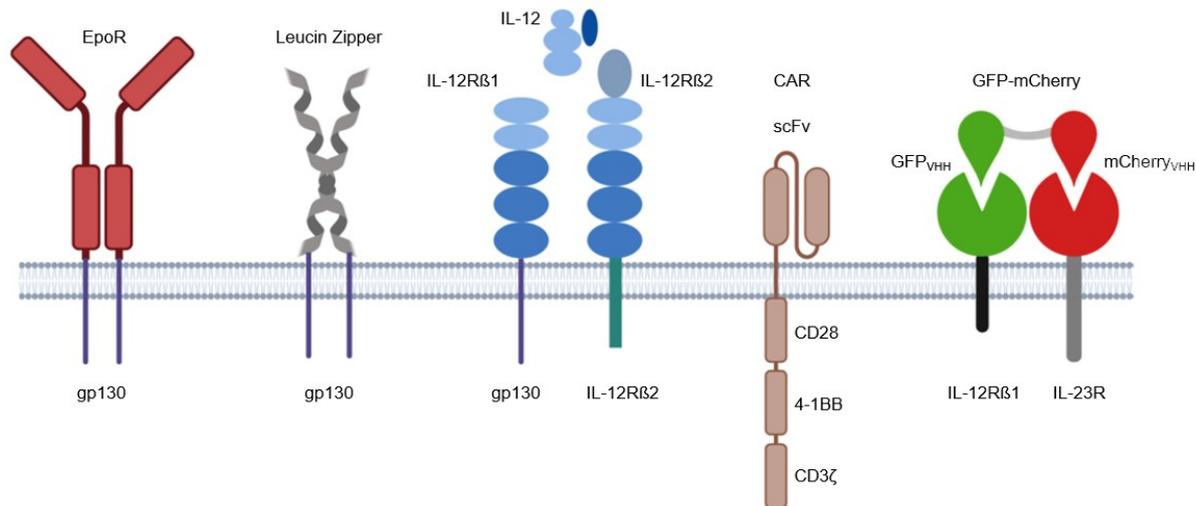


Abbildung 1: Schematische Darstellung verschiedener synthetischer Rezeptorsysteme. Die extrazelluläre Domäne des EpoR (rot) wurde mit der transmembran und intrazellulären Domäne von gp130 (lila) fusioniert, um einen induzierbaren synthetischen Rezeptor zu erhalten [3]. Eine konstitutiv aktive, synthetische Variante von gp130 besitzt als extrazelluläre Domäne Leucin Zipper (grau) [7]. Die extrazellulären Domänen des IL-12R β 1 und IL-12R β 2 (blau) wurden mit verschiedenen TMD und ICD wie z.B. gp130 oder IL-12R β 2 (grün) verbunden, um die Signaltransduktion von IL-35 und IL-39 aufzuklären [9]. CARs besitzt als extrazelluläre Domäne ein scFv gefolgt von diversen T-Zell Signaldomänen (braun) [37]. SyCyRs haben als ECD einen Nanobody gegen GFP (grün) oder mCherry (rot) und werden durch Fusionsproteine aus GFP und mCherry aktiviert. Intrazellulär bestehen sie z.B. aus dem IL-12R β 1 und IL-23R zur Analyse des IL-23 Signalwegs [29]. Die Abbildung wurde mit BioRender generiert.

1.2 Zytokine – eine Übersicht

Bei Zytokinen handelt es sich um eine Gruppe von Polypeptiden, welche eine wichtige Rolle innerhalb der Kommunikation multizellulärer Organismen einnehmen und ein Molekulargewicht von bis zu 25 kDa aufweisen [38]. Zytokine werden, anders als Hormone, nicht in Drüsen gespeichert, sondern von verschiedenen Zelltypen, wie z.B. dendritischen Zellen, Makrophagen, B-Zellen oder auch Untergruppen von T-Zellen sezerniert [39]. Dadurch regulieren Zytokine die Proliferation, Differenzierung und weitere Funktionen der Zelle in einem Konzentrationsbereich von nano- bis picomolar. Zytokine wirken auto-, para-, juxta- oder endokrin durch Bindung an spezifische Rezeptoren. Diese können in drei Gruppen von Transmembranrezeptoren eingeteilt werden: Rezeptortyrosinkinasen, Rezeptoren mit assoziierten Kinasen und G-Protein gekoppelte Rezeptoren [40]. Damit können sie sowohl anti-, als auch proinflammatorisch wirken, während eine fehlerhafte Steuerung der Zytokine zu Krebs, Autoimmunerkrankungen oder chronischen Entzündungen führen kann [41, 42]. Auf Grund von z.T. hohen Sequenzhomologien haben Zytokine eine gewisse Redundanz, wodurch verschiedene Zytokine ähnliche Reaktionen im Organismus hervorrufen können [38, 43]. Zytokine werden zum einen auf Basis ihrer biologischen Reaktionen (pro-, antiinflammatorisch) und zum anderen entsprechend ihrer verwendeten Rezeptoren oder Proteinstrukturen klassifiziert [44]. Dadurch ergibt sich eine Einteilung in z.B. Interferone (IFN),

Interleukine (IL), Chemokine, *colony-stimulating factors* (CSF) und *tumor necrosis factors* (TNF) [43, 45].

Nach der Bindung des Zytokins an seinen spezifischen Rezeptor wird von diesem intrazellulär eine Signaltransduktion ausgelöst. Auch die Rezeptoren werden auf Grundlage ihrer strukturellen Eigenschaften in verschiedene Klassen unterteilt: Zytokinrezeptoren Klasse I und II, Chemokinrezeptoren, Rezeptortyrosinkinasen, Rezeptor-Serin/Threoninkinasen, TNF-Rezeptoren, IL-1 und IL-17 Familie Rezeptoren [46]. Bei Klasse I Rezeptoren, zu welchen auch die IL-6 Familie zählt, erfolgt die Signaltransduktion vorwiegend über den Jak-STAT-Signalweg [47-49].

Januskinasen (Jak) gehören zu den Proteintyrosinkinasen (PTK) und werden über die Phosphorylierung ihrer Tyrosine aktiviert, wodurch intrazellulär am Rezeptor weitere Signalmoleküle aktiviert und Signalkaskaden eingeleitet werden [49]. Bisher wurden in Säugetieren vier verschiedene Januskinasen identifiziert (Jak1-3, Tyk2), welche alle sieben *Jak-homology* Domänen (JH) aufweisen [48]. Während die JH1 eine katalytische Tandem-Kinase-Domäne besitzt, interagiert die JH2 direkt mit STAT-Molekülen, als sogenannte Pseudokinase-Domäne [50]. Über ihren N-Terminus binden die Januskinasen an den Rezeptor und werden durch dessen Homo- oder Heterodimerisierung phosphoryliert und somit aktiviert [48, 51]. Die phosphorylierten Tyrosine der Januskinase sind dann Bindestellen für *signal transducer and activators of transcription* (STAT) Proteine, welche hier über eine SH2 (*Scr homology 2*) Domäne binden [49]. Die folgenden sieben STAT Moleküle wurden bisher in Säugetieren identifiziert: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6 [48]. Durch die Phosphorylierung der STAT Moleküle werden diese ebenfalls aktiviert und bilden Dimere, welche dann als Transkriptionsfaktoren wirken [52]. Phosphorylierungen werden in der Zellbiologie häufig als Modifizierung zur Regulation von Signalwegen verwendet [53].

1.3 gp130 vermittelte Signaltransduktion

Beim Glykoprotein 130 (gp130) handelt es sich um einen Zytokinrezeptor, welcher ubiquitär exprimiert wird und mit vielen Zytokinen, wie z.B. denen der IL-6- und IL-12-Zytokinfamilie, als β -Rezeptor interagiert [54-56]. Der 130 kDa große Transmembranrezeptor gehört zur Klasse I der Zytokinrezeptoren und besteht extrazellulär aus einer Immunglobulin (Ig) ähnlichen Domäne und fünf Fibronectin Typ III (FN III) Domänen, einer Transmembran- (TMD) und einer intrazellulären Domäne (ICD) (**Abbildung 2**) [57, 58]. Die Januskinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 assoziieren an die Box1/2 Motive des Rezeptors und phosphorylieren sich durch die Dimerisierung von gp130 gegenseitig [38, 59, 60]. Durch eine Aktivierung des gp130 Rezeptors können der Jak/STAT, MAPK und PI3K Signalweg induziert werden [61, 62].

gp130 ist das verbindende Mitglied zwischen der IL-6 und der IL-12 Zytokinfamilie. Während z.B. IL-27 oder IL-39 gp130 als β -Rezeptor zur Ausbildung von Heterodimeren verwenden, sind IL-6, IL-11 und IL-35 die einzigen Zytokine, welche gp130 Homodimere für ihre Signaltransduktion aktivieren [55, 63-65]. Im Falle von IL-6 und IL-11 binden die Zytokine an ihren α -Rezeptor, welcher dann als Komplex mit dem Zytokin an gp130 bindet. Bindet das Zytokin an den membranständigen α -Rezeptor und dann an gp130, wird hierbei vom klassischen Signalweg gesprochen [66]. Diese Art der Signaltransduktion ist auf Hepatozyten, B-Zellen, Neutrophilen, Makrophagen und Monozyten beschränkt, da nur diese den α -Rezeptor exprimieren [67-69]. Im Gegensatz zum IL-6R und IL-11R wird gp130 ubiquitär exprimiert und kann durch einen Komplex aus IL-6/11 und dem löslichen α -Rezeptor (sIL-6R, sIL-11R) ebenfalls aktiviert werden. Dies wird dann als Trans-Signalweg bezeichnet. Der lösliche α -Rezeptor wird durch die proteolytische Aktivität von ADAM-Proteasen generiert, dem sogenannten Shedding [70-72]. Dadurch entsteht ein hexamerer Komplex aus zwei gp130 Rezeptoren, zwei α -Rezeptoren und zwei Zytokinen [73, 74]. Diese Komplexbildung bringt die gp130 Rezeptoren in unmittelbare Nähe, wodurch es zu einer Transphosphorylierung der Januskinasen kommt [60, 75]. Diese wiederum phosphorylieren dann intrazelluläre Tyrosine von gp130, wodurch diese zu Bindestellen für STAT-Moleküle werden und die phosphorylierten STATs dann als Transkriptionsfaktoren wirken [52, 60, 75] (**Abbildung 2**).

Die durch gp130 aktivierten Signalwege werden durch verschiedene negative Rückkopplungen gesteuert [76]. *Suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) ist hierbei eines der wichtigsten regulatorischen Proteine. Durch die Bindung von SOCS an das phosphorylierte Tyrosin 759 (human) hemmt dieses die Jak Aktivität und somit die durch IL-6/11 induzierten Signalkaskaden [76-78].

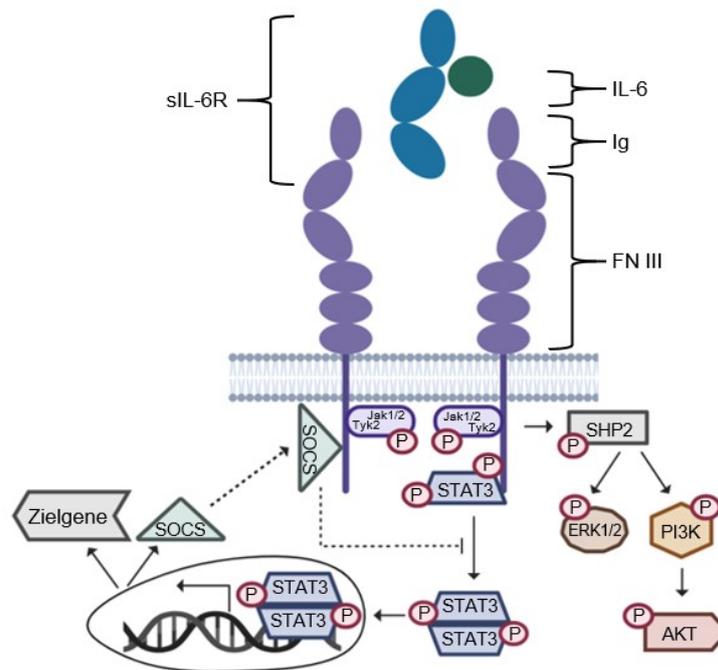


Abbildung 2: Darstellung der über IL-6 vermittelten Signaltransduktion. Durch die Bildung eines hexameren Komplexes aus je zwei Zytokinen, α -Rezeptoren (IL-6R) und gp130 werden die intrazellulären Januskinasen des gp130 Rezeptors transphosphoryliert. Hier vereinfacht dargestellt durch IL-6 (grün), den löslichen IL-6R (sIL-6R, blau) und gp130 (lila). Diese phosphorylieren wiederum Tyrosine der ICD, welche die Aktivierung der STAT/MAPK/PI3K Signalwege ermöglichen. SHP2 reguliert hierbei den MAPK und PI3K Signalweg. STAT3 bildet phosphoryliert einen Homodimer und bewirkt somit die Transkription von Zielgenen. SOCS ist eines dieser Zielgene, welches wiederum bei anhaltender Signaltransduktion die Aktivierungsstelle der Januskinasen blockiert und damit die Signalkaskade hemmt. Die Abbildung wurde mit BioRender generiert und modifiziert nach Eulenfeld *et al.* 2012 [79] und Negahdaripour *et al.* 2016 [80].

1.4 Interleukin-10 Familie

Die Zytokine der IL-10 Familie sind dieser auf Grund ihrer hohen strukturellen Ähnlichkeit, der gemeinsamen Nutzung von Klasse II Zytokinrezeptoren sowie ihrer vergleichbaren Signaltransduktion zugeordnet [81]. Der IL-10 Familie gehören sechs bzw. neun Vertreter an: IL-10, IL-22, IL-26, IL-19, IL-20 und IL-24, wobei letztere der IL-20 Unterfamilie zugeordnet werden [82]. Drei weitere Zytokine werden ebenfalls der IL-10 oder aber der Interferonfamilie, welche ebenfalls Klasse II Zytokinrezeptoren nutzen, zugeordnet: IL-28A (IFN- λ 1), IL-28B (IFN- λ 2), IL-29 (IFN- λ 3) [83-85] (**Abbildung 3**). Die Zytokine der IL-10 Familie werden sowohl von Zellen des angeborenen, als auch von denen des erworbenen Immunsystems produziert und weisen neben regulatorischen auch effektorische Funktionen auf [81]. Alle Zytokine sind aus sechs α -Helices mit verbindenden Schleifen aufgebaut, wobei vier Helices ein klassisches links-gängiges vier-Helix-Bündel ausbilden, welches für alle helikalen Zytokine charakteristisch ist [86-88]. Innerhalb der Familie gibt es nur zwei β -Rezeptoren IL-10R2 und IL-20R2, wobei je einer von allen Zytokinen verwendet wird. IL-10 bindet an den IL-10R1 und IL-10R2, während IL-22 die Rezeptoren IL-22R α 1, IL-10R2 verwendet und IL-26 den IL-20R1 und den IL-10R2 rekrutiert [89-92]. IL-24 und IL-20 verwenden den IL-20R2 als β -Rezeptor

und können sowohl an den IL-20R1 als auch an den IL-22R α 1 binden, während IL-19 nur mit dem IL-20R1 und dem IL-20R2 interagiert [93-96]. IL-28A, IL-28B und IL-29 teilen sich ebenfalls den IL-10R2 und den IFNLR1 (IL-28R) [83-85, 97, 98] (**Abbildung 3**). Die α -Rezeptoren der IL-10 Familie weisen alle eine hohe Affinität zu ihren Zytokinen auf, während die β -Rezeptoren nur eine schwache Affinität zum Liganden zeigen [99]. Dadurch bestimmen die α -Rezeptoren nicht nur die Spezifität gegenüber den Zytokinen. Durch ihre beschränkte Expression auf wenige Zelltypen bestimmen sie auch die Zielspezifität der induzierten Signalwege [81]. Die Bindung des Liganden an den α -Rezeptor erhöht die Affinität zum jeweiligen β -Rezeptor und erst die Bildung des vollständigen Komplexes aus α -Rezeptor, β -Rezeptor und Zytokin aktiviert dann die nachgeschalteten Signalkaskaden [81].

Die Signalkaskaden werden weitergeleitet über Jak1, welches mit dem α -Rezeptor assoziiert ist, und Tyk2, welches mit dem β -Rezeptor assoziiert ist [83, 100]. Die Signaltransduktion wird dann hauptsächlich über STAT3 weitergeführt, wobei für IL-10 und IL-22 in bestimmten Zellen auch eine Aktivierung von STAT5 und STAT1 gezeigt werden konnte [81].

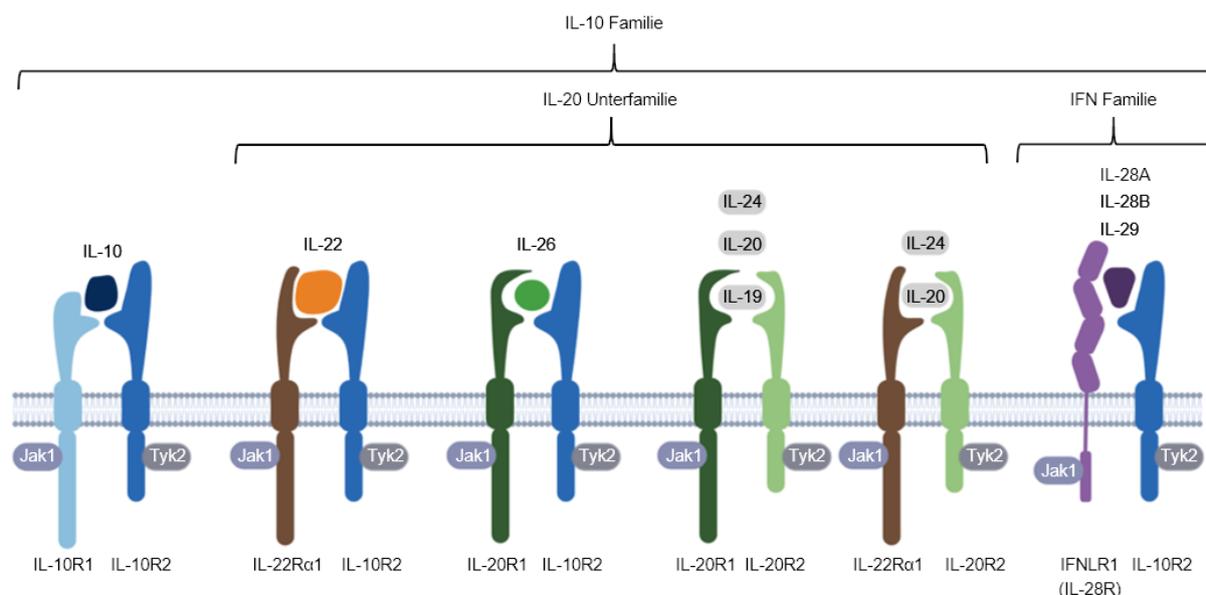


Abbildung 3: Zytokine und Rezeptoren der Interleukin-10 Familie. IL-10 (dunkelblau) bindet an den IL-10R1 (hellblau) und den IL-10R2 (blau). IL-22 (orange) rekrutiert ebenfalls den IL-10R2 und den IL-22R α 1 (braun). Auch IL-26 (grün) bindet an den IL-10R2 und den IL-20R1 (dunkelgrün). Der IL-20R1 wird ebenfalls von IL-19, IL-20 und IL-24 (grau) rekrutiert, welche als β -Rezeptor den IL-20R2 (hellgrün) verwenden. IL-24 und IL-20 können ebenfalls an eine Kombination aus dem IL-22R α 1 und dem IL-20R2 binden. Die Interferone IL-28A, IL-28B und IL-29 (dunkelviolett) binden einen Heterodimer aus dem IL-10R2 und dem IFNLR1 (IL-28R, hellviolett). Alle α -Rezeptoren sind mit Jak1 assoziiert, während Tyk2 an die β -Rezeptoren bindet. Die Abbildung wurde mit BioRender generiert und modifiziert nach Renaud et al. 2003 [85] und Niess et al. 2018 [82].

1.4.1 Die Rolle von IL-22 im Immunsystem und dessen Regulation

IL-22 gehört innerhalb der IL-10 Familie zu den am besten untersuchten Zytokinen und verstärkt sowohl die Zellregeneration als auch die Wundheilung [81]. IL-22 wird vornehmlich von T-Zell-Untergruppen und Gruppe 3 innate lymphoiden Zellen (ILC3) sekretiert [101]. Die

Sekretion von IL-22 wird durch Zytokine, wie z.B. IL-23 und Zytokinen der IL-1 Familie reguliert, welche diese durch eine direkte Interaktion mit ILC3s fördern [102-104]. Weiterhin kann der IL-22 Signalweg durch das IL-22 *binding protein* (IL-22BP) reguliert werden. Dabei handelt es sich um einen löslichen Rezeptor-Antagonisten, welcher Strukturen der extrazellulären Domäne des IL-22R α 1 besitzt und die Aktivität von IL-22 durch dessen Bindung neutralisiert [91, 92, 105].

Der IL-22R α 1 wird bevorzugt auf Epithelzellen exprimiert, welche die Grenze zu feindlichen Geweben mit Pathogenen bilden [83, 106]. Die Mehrheit der vorklinischen Studien schreibt IL-22 daher eine schützende Rolle gegenüber verschiedenen Pathogenen, wie z.B. Bakterien, Hefen, Viren und Parasiten zu [106-108]. So verstärkt IL-22 die angeborene, unspezifische Immunabwehr durch eine verstärkte Expression der antimikrobiellen Proteine β -Defensin-2 und -3 sowie von Psoriasin in Keratinozyten [109]. Ferner gibt es auch Pathogene, welche den IL-22 Signalweg dazu benutzen, ihre Infektion auszubreiten [106-108]. Die essenzielle Rolle von IL-22 innerhalb der Pathogenabwehr wurde hauptsächlich an Hand einer Studie mit IL-22 defizienten Mäusen analysiert, welche mit dem Bakterium *Citrobacter rodentium* infiziert wurden [103]. IL-22 induziert die Aktivierung verschiedener Moleküle, wie z.B. antimikrobielle Peptide (Reg Familie), Claudin-2 oder Fukosyltransferase 2, welche wiederum verschiedene Kontrollmechanismen gegen Pathogene steuern [103]. Weiterhin fördert IL-22 die systemische Immunabwehr durch die Aktivierung diverser anti-mikrobieller Mechanismen in der Leber [81]. Zusätzlich verstärkt IL-22 die Expression von Chemokinen von Epithelzellen und hilft dadurch wahrscheinlich bei der Rekrutierung von Leukozyten zum Ort der Infektion [110, 111]. Durch eine hohe IL-22R Expression auf Geweben und Organen kann IL-22 Zelltod und Zellschaden durch Entzündungsreaktionen und Infektionen verhindern und die Wundheilung sowie Homöostase verstärken [106, 108, 112]. Jedoch zeigten weitere Studien, dass IL-22 auch das Wachstum von bestehenden Tumoren durch die Aktivierung von STAT3 fördern kann, insbesondere bei Darmkrebs [113, 114]. Zurzeit laufen drei klinische Studien mit IL-22-basierten Therapien, welche die protektiven und regenerativen Eigenschaften von IL-22 bei Entzündungsreaktionen untersuchen [81].

1.5 Die Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts beobachtete William Coley, dass Tumore in manchen Sarkoma Patienten verschwanden, wenn diese von Bakterien infiziert wurden. Später wurde festgestellt, dass bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) für die Induktion der Tumornekrose verantwortlich waren [115]. Der für diese Reaktion verantwortliche Stoff wurde allerdings erst 1975 von Carswell *et al.* charakterisiert, welcher das Molekül *tumor necrotizing factor* nannte, heute: *tumor necrosis factor* (TNF) [116]. Die TNF-Superfamilie besteht zurzeit aus 19 Liganden und 29 Rezeptoren [117, 118]. Die Aktivierung dieser Komplexe beeinflusst die

Proliferation, Differenzierung, proinflammatorische Reaktionen sowie Apoptose und weitere Arten des Zelltods [117]. In den 80er Jahren wurde daher TNF in der Krebstherapie eingesetzt, um Zelltod in Krebszellen auszulösen [119]. Dies verursachte jedoch stattdessen letale Entzündungsreaktionen [119]. Die Ergebnisse daraus führten zu dem wichtigen Erkenntnis, TNF-Inhibitoren bei chronischen Entzündungsreaktionen wie z.B. rheumatischer Arthritis einzusetzen [117].

Eine Strukturanalyse der TNF Liganden konnte zeigen, dass es sich hierbei um Typ II Transmembranproteine handelt, welche alle ein strukturell ähnliches Motiv enthalten, die TNF Homologie Domäne (THD) [120, 121]. Diese THD ist für die Bindung an die Cystein-reiche Domäne (CRD) der TNFR und für die Trimerisierung der Liganden verantwortlich [122, 123]. Die Bindung von trimeren TNF Liganden an ihre trimerisierten Rezeptoren wurde zuerst anhand der Bindung von Lymphotoxin- α (LT α) an den TNFR1 gezeigt und später auch für weitere Mitglieder der TNFR-Superfamilie bestätigt [118, 124-126]. Die Rezeptoren liegen hierbei schon vorher als prä-assoziierte Trimere vor [127]. Die Liganden werden als membranständige Proteine synthetisiert und durch Proteolyse in ihre lösliche Form gebracht. Eine Ausnahme bildet LT α , welches direkt als lösliches Protein exprimiert wird [128, 129]. Hauptsächlich Antigen-präsentierende Zellen, wie dendritische Zellen, B-Zellen oder Makrophagen, aber auch natürliche Killerzellen produzieren TNF Liganden [122].

Die meisten TNFR sind Typ I Transmembranproteine, mit Ausnahme von manchen Typ III Proteinen, wie z.B. der BAFF-Rezeptor (BAFF-R), *B cell maturation antigen* (BCMA) oder der *transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor* (TACI) [117]. Ihre extrazelluläre Domäne wird durch die CRD charakterisiert, welche sechs Cysteine enthält, die drei Disulfidbrücken ausbilden [122, 123]. Auf Grund ihrer Struktur können TNFR in zwei Gruppen unterteilt werden: Todesrezeptoren und Nicht-Todesrezeptoren. Todesrezeptoren zeichnen sich durch eine 80 AS lange Sequenz in der intrazellulären Domäne des Rezeptors aus, welche *Death Domain* (DD) genannt wird [130]. Wichtige Todesrezeptoren sind z.B. der TNFR1, FasR und der *TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1 und 2* (TRAIL) [131]. Die DD der Rezeptoren interagiert mit Adapterproteinen, welche einen *death inducing signaling complex* (DISC) bilden, der wiederum zur Aktivierung von Caspasen und somit zur Induktion der Apoptose führt [132]. Nicht-Todesrezeptoren rekrutieren unterdessen meist *TNF-associated factor* (TRAF) Proteine und initiieren damit Signalwege, welche zu Proliferation, Zellüberleben und Zytokinproduktion führen [40, 133]. Durch ihre Wirkung über Adapterproteine kann die Aktivierung von TNFR je nach Zelltyp und Kontext zelluläre Antworten von Zelltod bis Überleben auslösen [133].

Die gemeinsame Nutzung von Liganden und Rezeptoren innerhalb der TNFR-Superfamilie generiert ein enormes Kommunikationsnetzwerk zwischen Zelltypen und Geweben, welches für die Regulierung der Immunität und Homöostase wichtig ist [117].

1.5.1 Die Signaltransduktion von TNFR1, TNFR2 und FasR und ihre Wirkungsbereiche

TNF α , TNFR1 und TNFR2 gehören zu den am meisten untersuchten Mitgliedern der TNF-Superfamilie und beide Rezeptoren werden durch TNF α aktiviert [117]. Dieses kann sowohl in der membranständigen, der juxtakrinen, oder aber in der löslichen Form vorliegen, welche durch Proteolyse mittels der Matrix-Metalloproteinase *TNF-converting enzyme* (TACE, ADAM17) erfolgt [128]. Der TNFR1 besitzt eine DD und zählt somit zu den Todesrezeptoren, während dem TNFR2 diese fehlt und er dadurch zur Gruppe der Nicht-Todesrezeptoren gehört [134]. Die Bindung von TNF α an den TNFR1 führt daher meist zu Zelltod und Entzündungen, wobei die Bindung an den TNFR2 zu Überleben und Geweberegeneration führt [134, 135]. Die beiden Rezeptoren unterscheiden sich weiterhin durch ihre Expression. Der TNFR1 wird ubiquitär exprimiert, der TNFR2 nur auf Immunzellen, Neuronen oder Endothelzellen [134, 136].

Beide Rezeptoren können den proinflammatorischen *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) Signalweg aktivieren, wobei sie sich in der anfänglichen Signaltransduktion aufgrund ihrer anderen intrazellulären Domänen unterscheiden [117]. Die DD des TNFR1 bindet an das Adapterprotein *TNFR1-associated death domain* (TRADD), welches wiederum TRAF2/5 rekrutiert, um dann mit dem *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1* (RIPK1) den sogenannten Komplex 1 für die weitere Signalkaskade zu bilden [137-139]. Die Bildung dieses Komplex 1 durch TRADD und RIPK1 ist essenziell für die gesamte Signaltransduktion des TNFR1 [135]. Unterdessen bindet der TNFR2 direkt TRAF1/2 und aktiviert anschließend die gleiche Signalkaskade wie der TNFR1 [133]. Im Folgenden wird der Inhibitor I κ B phosphoryliert und dann degradiert, wodurch er nicht mehr an den Transkriptionsfaktor NF- κ B binden kann und dieser die Transkription seiner proinflammatorischen Zielgene initiiert [140] (**Abbildung 4**). Des Weiteren reguliert dieser Signalweg die angeborene und erworbene Immunantwort bei einer Infektionsabwehr [135].

Der TNFR1 kann nicht nur den NF- κ B Signalweg aktivieren, sondern auch zwei Formen von Zelltod auslösen: Apoptose und Nekroptose [117]. Apoptose ist eine streng regulierte Art von Zelltod, welche bei der Gewebeentwicklung und zellulären Homöostase wichtig ist und durch eine Caspasekaskade aktiviert wird [141]. Im Gegenteil dazu handelt es sich bei Nekroptose um eine ungeordnete Art des Zelltodes, bei welcher zelluläre Komponenten in das betroffene Gewebe freigelassen werden und schwere Entzündungen hervorrufen [142, 143]. Welche Art Zelltod oder, ob der NF- κ B Signalweg, durch die Aktivierung des TNFR1 ausgelöst wird, hängt

von der Ubiquitinierung des RIPK1s und der Caspaseaktivität ab [144, 145]. Es gibt drei verschiedene Komplexe, welche alle mit Zelltod resultieren, wobei Komplex IIa und IIb Apoptose und IIc Nekroptose induzieren [146]. Im Folgenden wird nur auf TNFR1-induzierten Zelltod durch Apoptose eingegangen, da Nekroptose in den während dieser Arbeit verwendeten Zelllinien nicht analysiert werden konnte.

Wenn RIPK1 nicht oder nur wenig ubiquitiniert ist, oder die Ubiquitinierung entfernt wird, dann destabilisiert dies den am TNFR1 gebundenen Komplex und er dissoziiert [145]. Das freie RIPK1 initiiert dann die Bildung des zytosolischen Komplex IIa, welcher aus TRADD, *Fas-associated death domain* (FADD), *FLICE-like inhibitory protein* (FLIP_L) und Pro-Caspase-8 besteht [146]. Die Bildung dieses Komplexes bewirkt die Aktivierung der Caspase-8, welche wiederum Caspase-3 aktiviert und somit Apoptose auslöst [147]. Der Komplex IIb wird durch das Fehlen der Ubiquitinierung initiiert und beinhaltet, anders als der Komplex IIa, kein TRADD [148-150] (**Abbildung 4**). Bei beiden Komplexen ist die Inaktivierung von RIPK1 durch Degradierung mittels Caspasen entscheidend, um Apoptose zu induzieren und Nekroptose zu inhibieren [151, 152].

Ein weiteres Mitglied der Todesrezeptoren ist der Fas-Rezeptor (FasR). Dieser wurde 1989 von Peter Kramer als ein Protein entdeckt, welches Zelltod bei Krebszellen auslöst [153]. Der dazugehörige Ligand (FasL) wurde 1993 als Typ II Transmembranprotein identifiziert, welches hauptsächlich auf aktivierten T-Zellen oder natürlichen Killerzellen (NK) exprimiert wird [154, 155]. Wie auch TNF α kann FasL durch Matrix-Metalloproteasen in eine lösliche Form gebracht werden [156]. Der FasR ist ein Typ I Transmembranprotein und liegt, wie auch TNFR1/2, als prä-assoziierter Trimer vor, was für die apoptotische Signaltransduktion notwendig ist [157]. Die Bindung von FasL an den FasR bewirkt die Rekrutierung verschiedener Adapterproteine an der DD und führt somit zur Ausbildung des DISC, welcher dann sehr schnell Apoptose induziert [158, 159] (**Abbildung 4**). Der genaue Mechanismus dieser Bindung ist noch nicht geklärt, jedoch wird vermutet, dass die Bindung des Liganden eine Konformationsänderung in der DD bewirkt, welche wiederum eine Clusterbildung des Liganden begünstigt. Diese Cluster aus mehreren Fas Liganden und Rezeptoren rekrutieren dann FADD und initiieren die DISC Bildung [160]. Pro-Caspase-8 ist ein Teil dieses DISC und die Nähe mehrerer Pro-Caspasen-8 bewirkt ihre Autoaktivierung, woraufhin Caspase-8 vom DISC freigelassen und Pro-Caspase-3 aktiviert wird, um Apoptose zu induzieren [141, 161].

Lange Zeit wurde der FasR ausschließlich als stärkster Todesrezeptor der TNFR-Superfamilie gehandelt [117]. Innerhalb der letzten Jahre wurde jedoch von mehreren Gruppen nachgewiesen, dass der Rezeptor zusätzlich auch physiologische Funktionen wie Inflammation, Wachstum, Proliferation und Differenzierung übernehmen kann [162-165].

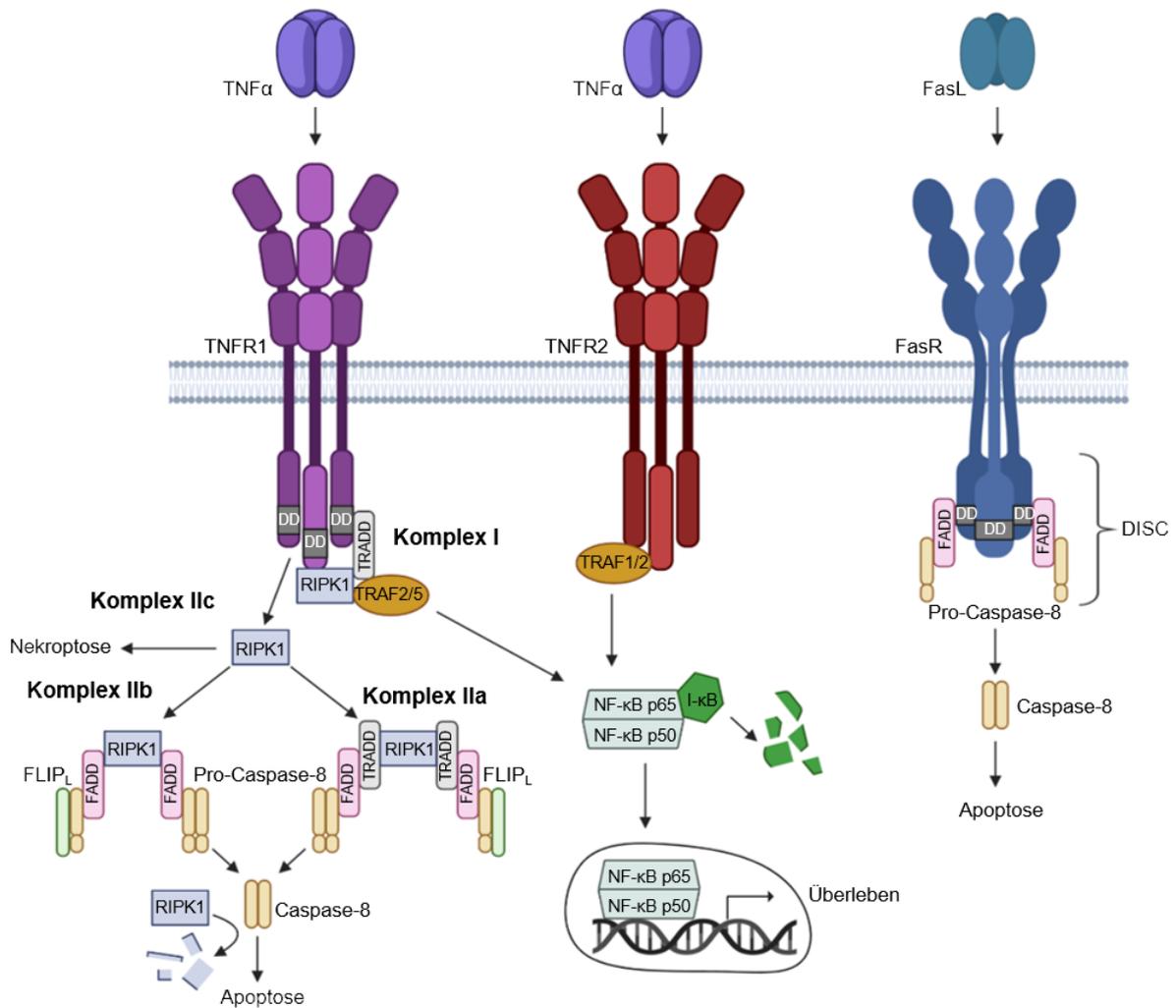


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Signaltransduktion des TNFR1, TNFR2 und FasR. Durch die Bindung an TNF α (violett) wird der TNFR1 (lila) aktiviert und kann vier verschiedene Signalwege aktivieren. Durch den Komplex I aus TRADD (grau), TRAF2/5 (braun) und RIPK1 (blau) wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B (grün) aktiviert und Zielgene für das Überleben der Zelle werden transkribiert. Der Komplex IIa besteht aus RIPK1, TRADD, FADD (rosa), Pro-Caspase-8 (orange) und FLIP_L (grün) und induziert eine durch eine Caspase-Kaskade ausgelöste Apoptose. Der Komplex IIb aktiviert ebenfalls diesen Signalweg, jedoch fehlt in diesem Komplex TRADD. Über den Komplex IIc kann der TNFR1 Nekroptose induzieren. Der TNFR2 (rot) bindet ebenfalls an TNF α (violett) und induziert über TRAF1/2, wie auch der TNFR1, den NF- κ B Signalweg. Der FasR (blau) bindet an den FasL (petrol) und bildet einen DISC bestehend aus FADD und Pro-Caspase-8 aus. Dieser bewirkt dann ebenfalls die Induktion von Apoptose. Die Abbildung wurde mit BioRender generiert und modifiziert nach Dostert *et al.* [117] und Cabal-Hierro *et al.* [133].

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, das synthetische Zytokinrezeptor-System (SyCyR) weiterzuentwickeln. Dabei soll zunächst die Generierung der synthetischen Liganden verbessert werden. Statt die SyCyRs wie zuvor mit konditioniertem CHO K1 Zellkulturüberstand zu aktivieren, sollen die synthetischen Liganden als Fc-Fusionsproteine in CHO K1 Zellen exprimiert werden. Die Fc-Domäne ermöglicht es dabei, die rekombinanten Proteine über eine Protein-A Affinitätschromatographie zu reinigen. Des Weiteren soll untersucht werden, ob eine Fc-Dimerisierung der synthetischen Zytokine die adäquaten Bedingungen für eine Dimerisierung der SyCyRs bereitstellt.

Zusätzlich soll analysiert werden, ob das SyCyR-System dazu verwendet werden kann, die Signaltransduktion von IL-22 zu kopieren. Darüber hinaus soll zudem begutachtet werden, inwiefern die beiden IL-22 bindenden Rezeptoren IL-10R2 und IL-22R α 1 dazu in der Lage sind, als Homodimer aktiviert zu werden.

Die Weiterentwicklung des SyCyR-Systems beinhaltet zudem eine Expansion zu einer möglichen Aktivierung von Tri- oder Oligomeren. Hierfür sollen die Rezeptoren TNFR1, TNFR2 und der FasR, welcher alle der TNFR-Superfamilie angehören, als SyCyRs analysiert werden. Die TNFR-Superfamilie zeichnet sich dadurch aus, dass ihre Rezeptoren als Trimer oder höher geordnetes Cluster aktiviert werden. Es ist daher von Nöten, höher geordnete synthetische Liganden zu generieren, welche weiterhin dazu in der Lage sind, die jeweiligen SyCyRs zu aktivieren. Zudem bietet die TNRF-Superfamilie die Möglichkeit, Januskinase-unabhängige Signalwege zu analysieren, welche das Überleben der Zellen sicherstellen oder aber deren Zelltod veranlassen. Dies soll in der folgenden Arbeit analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

Tabelle 1 umfasst alle in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Antibiotika und ihrer jeweiligen Konzentration.

Antibiotika	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration	Hersteller
		Agarplatten: 200 µg/mL	
Ampicillin	100 mg/mL	Flüssigmedium: 100 µg/mL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hygromycin B	100 mg/mL	1 mg/mL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin	10000 U/mL	60 mg/L	Genaxxon, Ulm, Deutschland
Puromycin	1 mg/mL	1,5 µg/mL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin	10 mg/mL	100 mg/L	Genaxxon, Ulm, Deutschland
G418	50 mg/mL	1,125 mg/mL	Genaxxon, Ulm, Deutschland

2.1.2 Antikörper

Für diese Arbeit eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 2 gelistet.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Antikörper und ihre verwendeten Konzentrationen.

Durchflusszytometrie	Stocklösung	Verdünnung	Hersteller
Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4) Rabbit mAb (Alexa Fluor® 488 Conjugate) #2846	k.A.	1:500	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
HA-Tag (C29F4) Rabbit mAb #3724	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
Myc-Tag (71D10) Rabbit mAb (Biotinylated) #3946	k.A.	1:100	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
DYKDDDDK Epitope Tag Antibody	k.A.	1:100	R&D Systems, Minneapolis, USA
Purified Rat Anti-Mouse IL-10 Clone JES5-2A5 (RUO)	1,0 mg/mL	2:100	BD, Franklin Lakes, USA
Western Blot	Stocklösung	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen-α-Phospho-STAT3 IgG (Tye705, D3A7, XP®), (MAB 9145)	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
Maus-α STAT3 (MAB 9139)	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP® Rabbit mAb #4370	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA

p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody #9102	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
Myc-Tag (71D10) Rabbit mAb (Biotinylated) #3946	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
Phospho-IkBa (Ser32) (14D4)	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
IkBa (Ser32) (44D4)	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
HA-Tag (C29F4) Rabbit mAb #3724	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
Anti-human IgG1 Fc #31423	0,8 mg/mL	1:5000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Caspase-3 (8G10) Rabbit mAb	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
Phospho-Tyk2 (Tyr1054/1055) Antibody #9321	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
Tyk2 Antibody #9312	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
Phospho-Jak2 (Tyr1007/1008) Antibody #3771	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
Jak2 (D2E12) XP® Rabbit mAb #3230	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
Phospho-Jak1 (Tyr1034/1035) Antibody #3331	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
GFP (4B10) Mouse mAb #2955	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
mCherry Antibody (PA5-34974)	0,32 mg/mL	1:1000	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Jak1 (6G4) Rabbit mAb #3344	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
α-Maus IgG-POD, Ziege	2 mg/mL	1:2000	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Ziege-α-Kaninchen IgG-HRP konj.	0,4 mg/mL	1:2000	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

2.1.3 Chemikalien

Während dieser Arbeit benutzte Chemikalien befinden sich in der folgenden Tabelle.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien und ihrer Hersteller.

Chemikalien	Hersteller
7- Aminoactinomycin D (7-AAD)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Annexin V PE	ImmunoTools, Oldenburg, Deutschland
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Complete Proteaseinhibitor	Roche, Severin, Schweiz
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
dNTP Mix (25 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
ECL TM Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Chicago, USA
Express DNA Ladder 100-5000 bp	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler TM 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
HD-Green	INTAS, Göttingen, Deutschland
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	VWR International BVBA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
LB-Medium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Loading-Dye Solution (6x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
MG132	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
NP-40	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PageRuler TM Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Protein-A-Agarose	Roche, Severin, Schweiz
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris	Bethesda Research Laboratories, New Jersey, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypan Blue Dye 0,4%	Bio-Rad, München, Deutschland
Turbofect TM Transfektionsreagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

2.1.4 Geräte

Geräte, welche für diese Arbeit benutzt wurden, sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Übersicht der eingesetzten Geräte und ihrer Hersteller.

Gerät	Hersteller
ÄKTA Start	GE Healthcare, Chicago, USA
Analysewaage Precisia 100M-300C	Precisia, Hartenstein, Deutschland
Autoklav Laboklav 25	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle, Deutschland
BD FACSCanto II	Becton Dickson GmbH, Heidelberg, Deutschland
CO ₂ -Inkubator HERAccl® 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ECL ChemoCam Imager	INTAS, Gottingen, Deutschland
Einmal-Zählkammer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Fluorometer Infinite® M200 PRO	Tecan, Männedorf, Deutschland
Gefrierschrank Forma® 900	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Geldokumentationssystem	INTAS, Gottingen, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München, Deutschland
Heizbad Julabo sw21	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Rostock, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer mit Heizung	Heidolph Instr. GmbH, Schwabach, Deutschland
Messpipetten	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Mikropipetten Research®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle Optiquick	Moulinex (Krupps), Offenbach, Deutschland
Minizentrifuge	Axon, Kaiserslautern, Deutschland
NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PCR Thermozykler peqStar	Peqlab, Erlangen, Deutschland
AB17500 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pH-Meter	Sartorius, Ratingen, Deutschland
Pipetus®-Akku	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Rollenmischer SRT 9D	Bibby Scientific, Staffordshire, England
Spannungsquelle Power Pac™ Basic	Bio-Rad, München, Deutschland
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterilbankpumpe	HLC BioTech, Bovenden, Deutschland
TC10 Automated Cell Counter	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermomixer® comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™	Bio-Rad, München, Deutschland
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland
Vortexer	Neolab, Heidelberg, Deutschland

2.1.5 Kits

In Tabelle 5 befinden sich alle während dieser Arbeit verwendeten Kits.

Tabelle 5: Auflistung der eingesetzten Kits und ihrer Hersteller.

Kit	Hersteller
BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CellTiter-Blue Cell Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Gene JET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
RNeasy purification Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
iTaq™ Universal SYBR green One-Strep Kit	BioRad, Hercules, USA

2.1.6 Kulturmedien

Für die Kultivierung von Bakterien und eukaryotischen Zellen wurden die in Tabelle 6 gelisteten Medien verwendet.

Tabelle 6: Im Rahmen der Arbeit benutzte Kultivierungsmedien und ihre Komponenten.

Kulturmedium	Zusammensetzung
DMEM ⁻	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium, high Glucose (4,5 g/L) with stable Glutamine</i>
DMEM ^{+/+}	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium, high Glucose (4,5 g/L) with stable Glutamine + 10% FBS, 1%; Penicillin/Streptomycin</i>
LB-Agar	0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, Trypton, 1,5% Agar-Agar
LB-Medium	0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, Trypton

2.1.7 Oligonukleotide

Für Klonierungen, quantitative real-time PCR sowie zur Sequenzierung wurden Primer verwendet, welche bei der Firma Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg, Deutschland) hergestellt wurden (Tabelle 7). Weitere zur Sequenzierung verwendete Oligonukleotide stammen von der Firma Seqlab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Göttingen, Deutschland).

Tabelle 7: Sequenzen und Name verwendeter Oligonukleotide für Klonierungen, qPCR und Sequenzierungen (seq).

Kennung	Name	Sequenz (5'-3')
SB33	PD-1 fw	CAG GAT ATC TTA AGC CAC CAT GCA G
SB34	PD-1-SOE-gp130	GCA CAC AGG CAC CAC GAT GGC CAC CAG GGT

SB35	gp130-SOE-PD-1	GGC CAG TTC CAA ACC CTG GTG GCC ATC GTG
SB36	gp130 rev	GAC GAT ATC CTC GAG TCT AGA TCA CTC
SB78	IL-10R2 EcoRI fw	CAG GAA TTC CGG ACA GGC AAT GAC GAA ATA
SB79	IL-10R2 d330 NotI rev	CAG GCG GCC GCT CAG ACT CCA GCT CCC GAG GCC CT
SB81	IL-10R2 d310 NotI rev	CAG GCG GCC GCT CAC ATC TGC TTG CTG CCT TCA GA
SB82	IL-10R2 d280 NotI rev	CAG GCG GCC GCT CAA ACG TGC TGT GAT GGG GGT GG
SB83	IL-10R2 d255 NotI rev	CAG GCG GCC GCT CAC TTG GTC TTC TTA TAA ATG AG
SB84	hFasR DD E256G fw	AAT GGT GTC AAT GGA GCC AAA ATA GAT
SB85	hFasR DD E256G rev	ATC TAT TTT GGC TCC ATT GAC ACC ATT
	Mutagenese IL-10R SH3	
SB88	fw	CCT CAG AGC CCG CGT CTG ATG CAG GGC CTC GGG AG
	Mutagenese IL-10R SH3	
SB89	rev	CTC CCG AGG CCC TGC ATC AGA CGC GGG CTC TGA GG
SB100 (qPCR)	qPCR GAPDH fw	GAA GGG CTC ATG ACC ACA GT
SB101 (qPCR)	qPCR GAPDH rev	CAT TGT CAT ACC AGG AAA TGA GCT
SB102 (qPCR)	qPCR Pim-1 fw	GAT CAT CAA GGG CCA AGT GT
SB103 (qPCR)	qPCR Pim-1 rev	CCA TCT TGG TGA CCC AGT CT
DF85 (seq)	5'pMOWS	AGC CCT TTG TAC ACC CTA AGC
DF86 (seq)	3'pMOWS	AGC AAT AGC ATG ATA CAA AGG
T7 (seq)	5'pcDNA3.1	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
BGH-rev (seq)	3'pcDNA3.1	TAG AAG GCA CAG TCG AGG

2.1.8 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten und bestellten Plasmide sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten und bestellten Plasmide sowie deren bakterielle Resistenz.

Plasmid	Referenz	Resistenz
pcDNA3.1	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	Ampicillin
pMOWS-puro-GFP	Ketteler <i>et al.</i> , 2002 [166]	Ampicillin
pMOWS-hygro-GFP	Suthaus <i>et al.</i> , 2010 [167]	Ampicillin
pCR-Script	Stratagene, San Diego, USA	Ampicillin
pcDNA3.1-ICD hFasR	BioCat, Heidelberg, Deutschland	Ampicillin
pcDNA3.1-TEV-Fc	BioCat, Heidelberg, Deutschland	Ampicillin
pcDNA3.1-PDL-1	BioCat, Heidelberg, Deutschland	Ampicillin
pcDNA3.1-myc-GFP _{VHH} gp130	[29]	Ampicillin
pMOWS-puro-myc-GFP _{VHH} gp130	[29]	Ampicillin
pcDNA3.1-myc-GFP _{VHH} IL-22R α 1	[168]	Ampicillin
pMOWS-puro -myc-GFP _{VHH} IL-22R α 1	[168]	Ampicillin
pcDNA3.1-myc-GFP _{VHH} IL-10R2	[168]	Ampicillin
pMOWS-puro-myc-GFP _{VHH} IL-10R2	[168]	Ampicillin
pcDNA3.1-HA-mCherry _{VHH} IL-10R2	[168]	Ampicillin
pMOWS-hygro-HA-mCherry _{VHH} IL-10R2	[168]	Ampicillin

2.1.9 Puffer und Lösungen

Die in dieser Arbeit eingesetzten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Zusammensetzung der hergestellten Puffer und Lösungen.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
10x Standard Restriktionspuffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
10x T4 DNA Ligasepuffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Annexin V <i>binding buffer</i>	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Coomassie Entfärbelösung	10 % (V/V) Essigsäure 25 % (V/V) Ethanol
Coomassie Färbelösung	0,05 % (w/V) Coomassie-Brilliant-Blau R-250 10 % (V/V) Essigsäure 25 % (V/V) Ethanol
Essigsäure	11,5% Essigsäure (99,9%)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	10% APS
Blockierlösung	5% Magermilchpulver in TBS-T
BSA-Lösung	5% BSA in TBS-T
Citratpuffer pH 5,5	0,068 mM Zitronensäure 0,182 mM Natriumcitrat
Citratpuffer pH 3,2	0,215 mM Zitronensäure 0,0315 mM Natriumcitrat
Desthiobiotin	2,5 mM Desthiobiotin in PBS
Ethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
FACS-Puffer	0,5% BSA in PBS
Gibco® fötales bovines Serum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IP-Lysepuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA 150 mM NaCl 1 mM Natriumfluorid 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid 1 % Brij 97 1 Complete Proteaseinhibitor Tablette in 20 mL H ₂ O
5 x Lämmli (nicht-reduzierend)	125 mM Tris-HCl 50 % (m/V) Glycerol 10 % (m/V) SDS 1 Spatelspitze Bromphenolblau
5 x Lämmli (reduzierend)	125 mM Tris-HCl 50 % (m/V) Glycerol 10 % (m/V) SDS 5 % (m/V) β-Mercaptoethanol 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Lysepuffer Jak2	10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl

	0,5 mM EDTA 1 mM Na ₃ VO ₄ 0,5% NAP-50 10 mM MgCl ₂ 1 Complete Proteaseinhibitor Tablette auf 50 mL
Natriumcitrat 0,1 M	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Orange G Ladepuffer	30% Glycerin 50 mM EDTA 0,25% Orange G
<i>Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 137 mM NaCl, pH 7,4
Reaktionsmix	50 mM HEPES, pH 7,4 100 mM NaCl 10% Sucrose 0,1% CHAPS 2 mM CaCl ₂ 13,35 mM DTT 70 µM Ac-DEVD-AMC
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4% SDS
SDS-PAGE Laufpuffer	0,4 M Tris-HCl, pH 8,25 0,1 M Glycin 0,1% SDS
SDS-PAGE Probenpuffer	0,4 M Tris-HCl, pH 6,8 40% Glycerin 8 % SDS 65 mM β-Mercaptoethanol 0,02 % Bromphenolblau
<i>Solution 1 (S1) für DNA-Minipräparation</i>	1 M Tris-HCl, pH 7,4 0,5 M EDTA 4 M NaOH 10% SDS 1:1000 RNase
<i>Solution 2 (S2) für DNA-Minipräparation</i>	4 M NaOH 10% SDS
<i>Solution 3 (S3) für DNA-Minipräparation</i>	3 M Kaliumacetat
<i>Stripping Puffer</i>	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 2% SDS 0,1% β-Mercaptoethanol
TAE-Puffer	0,4 M Tris-HCl, pH 8,8 0,01 M EDTA 0,2 M Essigsäure
TBS-T	5 M NaCl

	200 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,05% Tween 20
Transferpuffer	250 mM Tris-HCl, pH 8,0 2 M Glycerin 0,01% SDS 5% Methanol
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4% SDS
<i>Tris Buffered Saline</i> (TBS)	5 M NaCl 200 mM Tris-HCl, pH 7,5
Trypsin/EDTA-Lösung	1:10 Trypsin/EDTA (10x) in PBS
Zitronensäure 0,1 M	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

2.1.10 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Liste der benutzten Verbrauchsmaterialien und ihrer Hersteller.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Amicon Ultra	Merck, Darmstadt, Deutschland
Falcon Reaktionsgefäße (15 mL und 50 mL)	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
Kyoröhrchen	VWR, Randor, USA
MabSelect™ HiTrap™	GE Healthcare, Chicago, USA
Microtubes (1,5 mL und 2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
NAP-25	GE Healthcare, Chicago, USA
Nitrilhandschuhe	Ansell, München, Deutschland
PCR Kappen Gr. 125	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
PCR Tubes 0,2 mL	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PVDF-Transfermembran	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rollerbottle	IBS integra bioscience, Zizers, Schweiz
StrepTrap™ HP	GE Healthcare, Chicago, USA
Superdex200	GE Healthcare, Chicago, USA
Whatman-Papier	VWR, Randor, USA
Zellkulturschale 10 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale 6-well	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
Zellkulturschale 12-well	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
Zellkulturschale 96-well	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
Zellkulturschale 10 cm ² (adhärent)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale 6-well (adhärent)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale 96-well (adhärent)	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.11 Zelllinien und Bakterienstämme

Zur Klonierung und Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* XL1-Blue (endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [: TN10 proAB+ lacIqΔ(lacZ)M15] hsdR17(rk-mK+)) verwendet (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Zusätzlich wurden folgende eukaryotische Zelllinien verwendet (Tabelle 11).

Tabelle 11: Liste der in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zellen.

Zelllinie	Herkunft	Zellart	Hersteller
Ba/F3/gp130	Murine prä B-Zelllinie	Suspensionszellen	Immunex, Seattle, USA (Gearing <i>et al.</i> , 1994)
Phönix-Eco	Humane embryonale Nierenzellen	Adhärente Zellen	DKFZ, Ursula Klingmüller, Heidelberg, Deutschland
CHO K1	Hamster Ovarzellen	Adhärente Zellen	DSMZ ACC110, Braunschweig, Deutschland
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen	Adhärente Zellen	DSMZ ACC635, Braunschweig, Deutschland

2.1.12 Zytokine

Die in dieser Arbeit verwendeten Zytokine sind in Tabelle 12 zusammengestellt.

Tabelle 12: Lister der hier verwendeten Zytokine.

Endogene Zytokine	Stammkonzentration [µg/mL]	Herkunft
Hyper-IL-6	5	AG Scheller
IL-22	100	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA-Gelelektrophorese

Zur gröÙenspezifischen Analyse wurden Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese in einem 1%igen Agarosegel durch ein elektrisches Feld voneinander getrennt. Dabei zieht die Anode die negativ geladene DNA an. Das Agarosegel fungiert hierbei als Molekularsieb, bei welchem kleinere DNA-Fragmente schneller zur Anode wandern als große DNA-Fragmente. Die gröÙenspezifisch getrennte DNA wird durch HD Green sichtbar gemacht, welches in die DNA interkaliert unter UV-Licht fluoresziert und diese somit sichtbar macht. Hierfür wurde die Agaroselösung mit 0,0002 % HD Green versetzt. Das gröÙenspezifische DNA-Bandenmuster wurde mit Hilfe eines Geldokumentationssystems der Firma INTAS (Göttingen, Deutschland) dokumentiert.

2.2.1.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, welche zuvor mittels Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt wurden, wurden bei 365 nm auf einem UV-Tisch visualisiert und das gewünschte Fragment mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten. Das Gelstück mit dem entsprechende DNA-Fragment wurde in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und gemäß Herstellerangaben mittels NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit isoliert.

2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mittels NanoDrop 2000 spektroskopisch bestimmt. Die Reinheit der DNA- oder RNA-Proben wurde hierbei ebenfalls über das Absorptionsverhältnis A260/A280 bestimmt. Für DNA sollte dieser Wert bei mehr als 1,8 und bei RNA bei ca. 2,0 liegen. Die Konzentration von Proteinen erfolgte über eine Absorptionsmessung bei 280 nm. In diesem Wellenlängenbereich absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Prolin. Da diese Aminosäuren jedoch nicht in allen Proteinen mit derselben Häufigkeit vorkommen, wurde die Konzentration von Proteinen nach der Absorptionsmessung wie folgt berechnet:

$$\text{Konzentration} \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = \frac{A_{280}}{\varepsilon \left[\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \right]} \times 1 \left[\text{cm} \right] \times \text{Molekulargewicht} \left[\text{Da} \right]$$

Der Wert ε steht hierbei für den Extinktionskoeffizienten, welcher für jedes Protein ermittelt wird und die Anzahl der aromatischen Aminosäuren widerspiegelt.

2.2.1.4 Restriktionsspaltung von DNA

Zur Kontrolle von neu generierter Plasmid-DNA mittels Restriktionsspaltung wurden Restriktionsenzyme der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) eingesetzt. Hierbei wird die Plasmid-DNA durch die Spaltung der entsprechenden Phosphodiesterbindung an spezifischen, palindromischen Sequenzen geschnitten. Es können dabei, je nach verwendetem Restriktionsenzym, DNA-Fragmente mit (*sticky ends*) oder ohne Überhänge (*blund ends*) entstehen. Die Restriktion von je 10 μg Plasmid-DNA erfolgte mit 10 U des gewünschten Restriktionsenzym und dem jeweiligen, vom Hersteller empfohlenen Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 μL für ca. 3 – 4 h oder über Nacht bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 4 μL 6-fach DNA-Ladepuffer gestoppt und der Reaktionsansatz mit Hilfe eines Agarosegels ausgewertet. Die Restriktion mit zwei Enzymen erfolgte entweder in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer oder nacheinander, falls die Enzyme nur in unterschiedlichen Puffern aktiv sind. Hierfür wurden die als erstes verwendeten Enzyme zunächst nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert.

2.2.1.5 Dephosphorylierung von DNA

Zur Vermeidung einer Religation nach einer Restriktionsspaltung wurden das 5'-Ende dephosphoryliert. Dazu wurde 1 U FastAP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zu dem hitzeinaktivierten Restriktionsansatz gegeben und dieser für 1 – 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Hitzeinaktivierung der FastAP bei 75 °C für 5 min gestoppt.

2.2.1.6 Phosphorylierung von DNA

Während Vektoren vor der Ligation am 5'-Ende dephosphoryliert wurden, muss das jeweilige *insert* dort phosphoryliert werden. Bei einem über Restriktionsenzyme generiertem *insert* geschieht dies durch das jeweilige Restriktionsenzym, während PCR-Produkte nachträglich phosphoryliert werden müssen. Hierfür wird eine T4-Polynukleotidkinase verwendet, welche den Transfer einer Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat auf eine 5'-Hydroxygruppe katalysiert. Dies erfolgte, wie im Folgenden gezeigt, mittels PNK Reaktion:

132 µL PCR-Produkt
15 µL Ligase Puffer
3 µL PNK
ad 150 µL ddH₂O

Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert, das Enzym direkt 5 min bei 75 °C inaktiviert und anschließend transformiert, wie unter 2.2.1.8 beschrieben.

2.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxy- und einem 5'-Phosphatende wurden zwei DNA-Fragmente und der ATP-Hydrolyse ligiert. Das eingesetzte *insert* und die Vektor-DNA wurden dafür zuvor mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten. Für die Ligation wurde das *insert* im molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt und die beiden DNA-Fragmente mittels 1 U T4-Ligase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und 2 µL Ligasepuffer in einem Gesamtvolumen von 20 µL ligiert. Bei einer *sticky end* Ligation erfolgte die Ligation bei Raumtemperatur für 2 h, bei einer *blund end* Ligation wurde der Ansatz zusätzlich mit 2 µL einer 50 %-igen (m/v) PEG4000 Lösung versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

2.2.1.8 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *Escherichia coli* Bakterien

Zur Transformation wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* XL-1 Blue Zellen verwendet, welche als 30 µL Aliquots bei –80 °C verfügbar waren. 10 min vor einer Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend 1 µL Plasmid-DNA oder 10 µL Ligationsansatz hinzugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock bei 42 °C für 1 min und anschließend wieder eine Inkubation von 5 min auf Eis. Den Zellen wurden 500 µL warmes LB-Medium zugegeben. Anschließend wurden die Zellen 1 h bei 37 °C

und 1200 rpm regeneriert. 150 μL der Zellsuspension wurden auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.9 Mini Präparation von Plasmid-DNA

Zur Kontrolle der transformierten Plasmid-DNA wurde je ein *E. coli* Klon über Nacht in 2 mL LB-Medium mit Selektionsantibiotikum bei 37 °C und 12000 rpm inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde dann mittels Mini-Präparation isoliert. Hierfür wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert (15.000 g, 5 min, RT) und das Pellet in 100 μL kaltem S1-Puffer resuspendiert. Es folgte die alkalische Lyse durch die Zugabe von 200 μL S2-Puffer für ca. 5 min, welche durch die Zugabe von 150 μL kaltem S3-Puffer und mehrfaches Invertieren gestoppt wurde. Die vollständige Denaturierung der zellulären Proteine erfolgte während der 10-minütigen Inkubation auf Eis durch das im S3-Puffer enthaltene Kaliumacetat. Die Plasmid-DNA befand sich nach der anschließenden Zentrifugation (18.000 g, 15 min, 4 °C) im Überstand und konnte so von den denaturierten Proteinen im Pellet getrennt werden. Die Zugabe von 900 μL 100 %igem Ethanol fällt die Plasmid-DNA und nach einer Inkubation auf Eis von 5 min wurde die Proben erneut zentrifugiert (18.000 g, 15 min, 4 °C). Die Plasmid-DNA wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen (18.000 g, 5 min, 4 °C) und das Plasmid-DNA Pellet ca. 10 min bei 37 °C in Schüttler getrocknet und anschließend in 30 μL $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ resuspendiert.

2.2.1.10 Midi-Präparation von Plasmid DNA

Eine Midi-Präparation wurde durchgeführt, um eine höhere Ausbeute an Plasmid-DNA zu erhalten. Hierfür wurden 100 mL LB-Medium, mit entsprechendem Selektionsantibiotikum, mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 140 rpm inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde durch Zentrifugation (4.000 g, 15 min, 4 °C) pelletiert, der Überstand verworfen und die Plasmid-DNA mittels NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel Düren, Deutschland) extrahiert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 100 μL $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ resuspendiert und die Konzentration gemessen, wie in 2.2.1.3 beschrieben.

2.2.1.11 RNA-Isolation

RNA wurde aus pelletierten und in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Zellen isoliert. Bei Proben, welche anschließend per Microarray analysiert werden sollten, erfolgte diese laut Herstellerangaben mit dem RNeasy purification Kit von QIAGEN (Hilden, Deutschland). Die RNA Isolation von Proben, welche per qPCR analysiert wurden, erfolgte laut Herstellerangaben mit Hilfe des NucleoSpin RNA II Kits von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland). Die RNA-Konzentration wurde anschließend wie unter 2.2.1.3 beschrieben bestimmt.

2.2.1.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction)

Die Amplifikation von bestimmten DNA-Bereichen einer Plasmid-DNA erfolgte über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Für die Reaktion wurde die Ausgangs-Plasmid-DNA (*template*), eine hitzestabile DNA-Polymerase, entsprechende Puffer, spezifische Oligonukleotide (Primer) und freie Nukleotide in einem PCR-Ansatz zusammengegeben.

PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Zur Generierung neuer DNA-Fragmente für Klonierungen wurde die *Phusion High-Fidelity* Polymerase von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) verwendet, welche eine Korrekturlesefunktion beinhaltet (*proof reading*) und somit falsch integrierte Nukleotide mittels einer 3' – 5' Exonuklease-Aktivität aus der amplifizierten DNA entfernt.

Im Folgenden ist ein beispielhafter Reaktionsansatz dargestellt:

1 µL *template* DNA (ca. 0,5 pg Plasmid-DNA)
 10 µL HF oder GC Puffer
 0,4 µL *forward* Primer (100 pmol)
 0,4 µL *reverse* Primer (100 pmol)
 1 µL dNTP Mix (10 mM)
 1 µL *Phusion High-Fidelity* Polymerase
 36,2 µL ddH_2O

Die Reaktion wurde standardmäßig mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung	98 °C	2 min	
Denaturierung	98 °C	10 sec	
<i>Annealing</i>	60 °C	15 sec	x 30 Zyklen
Elongation	72 °C	15-30 sec/kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	
Kühlung	4 °C	∞	

PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel (2.2.1.1) analysiert und eine Gelextraktion durchgeführt (2.2.1.2). Für eine anschließende Ligation wurde das PCR-Produkt wie unter 2.2.1.6 beschrieben phosphoryliert.

SOE-PCR

Die Fusion der extrazellulären Domäne von PD-1 an die transmembran und intrazelluläre Domäne von gp130 erfolgte über eine *splicing by overlapping extension-PCR* (SOE). Bei dieser Methode werden bei der initialen Amplifikation der zwei Fragmente, welche miteinander verbunden werden sollen, im Bereich der Fusion Überhänge amplifiziert, welche jeweils komplementär zueinander sind. In der zweiten Fusions-PCR werden beide Fragmente dann gemeinsam eingesetzt und über den jeweils außenliegenden Primern miteinander verbunden. Für diese Reaktion wurde die *Pfu* Polymerase mit *proof reading* Aktivität verwendet.

Im Folgenden ist ein beispielhafter Reaktionsansatz dargestellt:

1 μL *template* DNA (ca. 0,5 pg Plasmid-DNA)
 5 μL Pfu Puffer (mit 20 mM MgSO_4)
 3 μL *forward* Primer (10 μM)
 3 μL *reverse* Primer (10 μM)
 1 μL dNTP Mix (10 mM)
 0,5 μL Pfu Polymerase (2,5 U/ μL)
 36,5 μL ddH_2O

Die Reaktion wurde standardmäßig mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	
<i>Annealing</i>	60 °C	1 min	x 30 Zyklen
Elongation	72 °C	2 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	
Kühlung	4 °C	∞	

Mutagenese PCR

Die gezielte Mutagenese einzelner Basen erfolgte über eine *site directed mutagenesis PCR*. Dabei wurden Oligonukleotide verwendet, welche den gewünschten Basenaustausch ca. mittig in ihrer Sequenz aufweisen. Bei der PCR wurde dann nicht nur ein Bereich, sondern die gesamte Plasmid-DNA amplifiziert. Zunächst erfolgte dies getrennt in zwei Reaktionsansätzen mit einmal nur dem *forward* und einmal nur dem *reverse* Primer, wodurch je nur ein DNA-Strang amplifiziert wurde. In der zweiten PCR-Runde wurden dann beide Ansätze gemischt und die Plasmid-DNA somit wieder doppelsträngig. Es folgte ein Verdau mit *DpnI*, welches Methylierungen der *template* DNA erkennt und diese durch die Restriktion zerstört. Dieser Schritt gewährleistet, dass bei der anschließenden Transformation (2.2.1.8) von 5 μL PCR-Produkt hauptsächlich die mutierte Plasmid-DNA und nicht das *template* transformiert wurden.

Im Folgenden ist ein beispielhafter Reaktionsansatz aufgezeigt:

- A** 1 μL *template* DNA (ca. 0,5 pg Plasmid-DNA)
 10 μL HF Puffer
 0,4 μL *forward* Primer (100 pmol)
 1 μL dNTP Mix (10 mM)
 1 μL *Phusion High-Fidelity* Polymerase
 36,5 μL ddH_2O
- B** 1 μL *template* DNA (ca. 0,5 pg Plasmid-DNA)
 10 μL HF Puffer
 0,4 μL *reverse* Primer (100 pmol)
 1 μL dNTP Mix (10 mM)
 1 μL *Phusion High-Fidelity* Polymerase
 36,5 μL ddH_2O

Die Reaktion wurde standardmäßig mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung	98 °C	4 min	
Denaturierung	98 °C	1 min	
<i>Annealing</i>	60 °C	1 min	x 15 Zyklen
Elongation	72 °C	15-30 sec/kb	
Finale Elongation	72 °C	12 min	
Kühlung	4 °C	∞	

2.2.1.13 Quantifizierende real-time qPCR

Mittels dieser PCR ist es möglich, Transkriptmengen in Form von cDNA zu quantifizieren und somit Rückschlüsse auf die Aktivierung der analysierten Gene zu ziehen. Die Methode beruht dabei auf dem Prinzip, dass PCR-Produkte immer in Abhängigkeit zur jeweilig eingesetzten Matrizenmenge stehen, da diese ab einer gewissen Zyklusanzahl exponentiell zunimmt. Je mehr RNA demnach von einem Transkript gebildet wurde, desto früher ist die Amplifikation des durch die Primer definierten Genabschnitts messbar. Die Messung der PCR-Produkt-Zunahme erfolgte in Echtzeit durch einen im of iTaq™ Universal SYBR green One-Step Kit (BioRad, Hercules, USA) enthaltenen Fluoreszenzfarbstoff, welcher in die cDNA interkaliert. Bei der Verwendung dieses Kits wurde RNA eingesetzt (statt cDNA), da die Reverse Transkriptase sowie alle benötigten Komponenten im Kit enthalten sind. Die Fluoreszenz wurde während der PCR im AB17500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemessen. Sie steht in Relation zu der Menge gebildeter cDNA.

Im Folgenden ist ein beispielhafter Reaktionsansatz dargestellt:

2 µL RNA (50 ng/µL)
 5 µL Puffer iTaq SYBR
 0,25 µL *forward* Primer
 0,25 µL *reverse* Primer
 0,125 µL SYBR Enzym
 2,4 µL _{dd}H₂O

Die Reaktion wurde standardmäßig mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

cDNA Synthese	50 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	15 sec	
<i>Annealing</i>	60 °C	1 min	x 40 Zyklen

Die erhaltenen Fluoreszenzdaten wurden mit Hilfe der 75000 Software von Applied Biosystems (Foster City, USA) als C_T-Wert bestimmt und für die Berechnung der relativen Transkriptmengen verwendet.

Berechnung der relativen Transkriptmengen

Zur Bestimmung der Transkriptmengen wurden die ermittelten C_T-Werte in Bezug auf das Referenzgen *Gapdh* berechnet, welches zu allen Bedingungen in den Zellen gleich stark

exprimiert wird und als sogenanntes *housekeeping gene* bezeichnet wird. Der dadurch erhaltene ΔC_T -Wert verringert gegebenenfalls Schwankungen der für die qPCR eingesetzten Transkriptmengen und ermöglicht Vergleiche zwischen verschiedenen Zellen und Bedingungen. Die Berechnung wurde dann wie folgt durchgeführt:

$$\text{Verhältnis} = \frac{\left((\text{Effizienz}_{\text{Zielgen}} \times 0,01) + 1 \right)^{Ct_{\text{Zielgen}}}}{\left((\text{Effizienz}_{\text{Referenzgen}} \times 0,01) + 1 \right)^{Ct_{\text{Referenzgen}}}}$$

2.2.1.14 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzen von neu generierter Plasmid-DNA wurden durch Sequenzierungen der Firma Microsynth Seqlab (Göttingen, Deutschland) kontrolliert. Dort nicht vorhandene, gleichwohl erforderliche Oligonukleotide wurden zusammen mit den DNA-Proben zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Für die Lyse von Suspensionszellen wurden diese durch Zentrifugation bei 1500 rpm, 5 min, RT pelletiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und entweder direkt lysiert oder aber bis zur Lyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Zellen wurden je nach Pelletgröße in 60 – 200 μL Jak2 Lysepuffer resuspendiert. Die Zellen wurden für 1 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Rotation lysiert und anschließend bei 10.000 g, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt mittels BCA-Assay bestimmt.

2.2.2.2 Bestimmung des Proteingehalts mittels Bicinchoninsäure (BCA)

Die Proteinkonzentration der - wie zuvor beschrieben - hergestellten Zelllysate wurde nach Herstellerangaben mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Im ersten Schritt wird in alkalischem Medium in Anwesenheit von Proteinen Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert. Anschließend reagiert im zweiten Schritt die Bicinchoninsäure mit Cu^+ und bildet einen lila gefärbten Komplex. Dieser BCA/Cu-Komplex bildet sich proportional zur Proteinkonzentration und die Absorption wurde bei 562 nm gemessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration der Zelllysate wurde eine Eichgerade mit BSA hergestellt und ebenfalls gemessen. Für diesen Assay wurden die Lysate 1:20 in H_2O verdünnt und je 25 μL in Doppelbestimmung eingesetzt.

2.2.2.3 SDS-PAGE

Die Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch eine diskontinuierliche *sodium dodecyl sulphate* (SDS) Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Denaturierung der Proteine erfolgte vor der Gelbeladung in 5 x Lämmli-Puffer bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min. Das Polyacrylamid fungiert hierbei als Molekularsieb, wodurch kleine Proteine

schneller laufen als größere. Die Proteine besitzen hierbei keine Struktur mehr, da das im Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol für eine Lösung der Disulfidbrücken sorgt und restliche Interaktionen durch das Kochen gelöst wurden. Im Puffer ist ebenfalls SDS enthalten, welches sich proportional der Proteingröße anlagert und dem gesamten Protein eine negative Ladung entsprechend ihrem Molekulargewicht verleiht. Die Größentrennung erfolgt dann durch das Anlegen einer elektrischen Spannung von 95 Volt. 10 bis 15 %ige SDS-Polyacrylamidgele wurden mit einer Stärke von 1,5 mm verwendet. Beladen wurden die Gele mit 20 μ L Probe, welche einen Proteingehalt von 2,5 μ g/ μ L aufwiesen.

Es wurden auch SDS-Polyacrylamidgele mit nicht-reduzierenden Proben gemacht. Hierbei enthielt der verwendete 5 x Lämmli-puffer kein β -Mercaptoethanol, wodurch die Disulfidbrücken der Proteine fortbestanden. Bei der Größentrennung werden Proteine aus verschiedenen Untereinheiten dann nicht mehr voneinander getrennt, sondern laufen als ein Protein.

2.2.2.4 Coomassie Färbung von SDS-Gelen

Nach der Größentrennung durch ein SDS-Polyacrylamidgel wurden Proteine durch eine Inkubation mit Coomassie Färbelösung visualisiert. Das Coomassie bindet hierbei an die basischen Aminosäuren der Proteine und macht diese durch die Interkalierung sichtbar. SDS-Polyacrylamidgele wurden 30 min mit Coomassie Färbelösung leicht schüttelnd inkubiert und anschließend über Nacht mit Coomassie Entfärbelösung gewaschen, um nicht im Protein gebundenes Coomassie aus dem Gel zu entfernen.

2.2.2.5 Western Blot

Die zuvor im SDS-Polyacrylamidgel voneinander getrennten Proteine wurden für eine Western Blot Analyse auf eine PVDF-Membran transferiert. Dies erfolgte durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen der Proteine mit der PVDF-Membran in einem Trans-Blot-Turbo semi-dry Transfer-System von BioRad (München, Deutschland). Die PVDF-Membran wurde vor dem Transfer 2 min in Methanol aktiviert und anschließend ca. 1 min in Transferpuffer gewaschen. Whatmann-Papier wurde ebenfalls in Transferpuffer getränkt und 3 Lagen unter die aktivierte PVDF-Membran gelegt. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde auf die Membran gelegt und mit weiteren 3 Lagen Whatmann-Papier bedeckt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 25 Volt, anschließend wurde die Membran mindestens 3 h in ca. 10 mL Blockierlösung bei RT inkubiert. Die Blockierlösung sorgt dafür, dass freie Proteinbindestellen der Membran blockiert werden und somit keinen Hintergrund bei der Detektion erzeugen können. Die Membran wurde mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C, je nach Herstellerangaben, in 5 % BSA-TBS-T oder 5 % Milch-TBS-T unter Rotation inkubiert. Nach 3-maligem Waschen der Membran für je 10 min mit TBS-T wurde der sekundäre Antikörper für mindestens 1 h zugegeben. Anschließend wurde die Membran erneut 2 x mit TBS-T und 1 x mit TBS gewaschen und die Proteine mittels ECL Prime Western Blot Detection Reagent nach Herstellerangaben

detektiert. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte am INTAS Chemo Cam Imager (INTAS, Göttingen, Deutschland).

2.2.2.6 Strippen von Western Blot-Membranen

Eine PVDF-Membran, welche bereits mit einem primären und einem sekundären Antikörper inkubiert und dieser zuvor detektiert wurde, kann nach Entfernen erneut mit einem anderen primären und sekundären Antikörper analysiert werden. Das Entfernen der gebundenen Antikörper erfolgt für 30 min bei 60 °C in einem Wasserbad. Hierfür wurde die PVDF-Membran in 50 mL *stripping* Puffer gegeben. Anschließend wurde die Membran 3 x mit TBS-T gewaschen und erneut 3 h mit ca. 10 mL Blockierlösung inkubiert. Die Inkubation mit dem neuen primären Antikörper erfolgte erneut über Nacht bei 4 °C und Rotation. Die Detektion erfolgt wie unter 2.2.2.5 beschrieben.

2.2.2.7 Fc-Tag Affinitätschromatographie

Zellkulturüberstände von CHO K1 Zellen, welche sezernierte Proteine mit einem Fc-Tag enthielten, wurden über eine Affinitätschromatographie mit Protein-A gereinigt. Dabei macht man sich die spezifische Bindung von IgG-Fc an Protein-A zunutze, welche pH-abhängig ist. Hierfür wurden MabSelect™ HiTrap™ Säulen der Firma GE Healthcare (Chicago, USA) verwendet. Nach Äquilibrierung des Systems (ÄKTA Start, GE Healthcare, Chicago, USA) und der Säule mit H₂O und anschließend PBS wurden 1 L Zellkulturüberstand mit einer Flussrate von 1 mL/min geladen. Dabei bindet nur das gewünschte Protein mit Fc-Tag an die Säulenmatrix, während weitere Proteine durchlaufen. Um unspezifische Proteine von der Säule zu entfernen, wurde diese nach dem Laden des Überstandes mit ca. 20 mL PBS gewaschen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte dann durch eine Senkung des pH-Wertes, auf zunächst 5,5 und dann 3,2, durch entsprechende Citratpuffer. Dieser Abfall des pH-Wertes bewirkt, dass die Bindung des Fc-Tags an Protein-A gelöst wird und das Zielprotein somit eluiert wurde. Das Eluat wurde dabei fraktionsweise gesammelt. Fraktionen, welche das Zielprotein enthalten, wurden vereinigt und anschließend mit einem Amicon Ultra (Merk, Darmstadt, Deutschland) auf ein Volumen von ca. 500 µL konzentriert. Es folgte ein Umpuffern des Proteins in PBS mit Hilfe einer NAP-25 Säule (GE Healthcare, Chicago, USA) nach Herstellerangaben. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte im Anschluss per NanoDrop Messung (2.2.1.3).

2.2.2.8 Hydrolyse des Fc-Tags per TEV-Protease

Proteine, welche über eine Fc-Affinitätschromatographie gereinigt wurden, enthalten zwischen dem Protein und dem Fc-Tag eine TEV-Protease Schnittstelle. Da der Fc-Tag eine Dimerisierungsdomäne ist, kann es von Nutzen sein, diesen nach der Reinigung zu entfernen, um eine Dimerisierung des gereinigten Proteins zu umgehen. Hierfür wurden 10 µg TEV-Protease pro 100 µg des gereinigten Proteins gegeben und die Hydrolyse über Nacht bei 4°C

durchgeführt. Der hydrolysierte Fc-Tag wurde anschließend über eine Protein-A Affinitätschromatographie entfernt, bei welcher nur der Fc-Tag an die Säulenmatrix bindet und das gereinigte Protein sich im Durchfluss befand. Der Durchfluss wurde dann mit einem Amicon Ultra der Firma Merk (Darmstadt, Deutschland) auf ein Volumen von 500 μ L konzentriert. Die TEV-Protease wurde anschließend durch eine *size exclusion chromatographie* (SEC) von dem gereinigten Protein getrennt.

2.2.2.9 Size exclusion chromatographie

Die Größentrennung von Proteinen erfolgte mittels einer *size exclusion chromatographie* (SEC), bei welcher die TEV-Protease von gereinigten Proteinen getrennt werden sollte. Bei dieser Chromatographie wird eine poröse Matrix als Säulenmaterial verwendet, welche mit Proteinen interagieren kann. Kleine Proteine haben dabei eine längere Verweilzeit, da sie mit mehr Poren der Matrix interagieren. Je größer die Proteine sind, desto schlechter können sie mit den kleinen Poren der Matrix interagieren und dementsprechend schnell eluieren sie. Für diese Reinigung wurde eine Superdex200 Säule der Firma GE Healthcare (Chicago, USA) verwendet, welche zuvor 1 h mit entgastem PBS äquilibriert wurde. Das Proteingemisch wurde in einem Volumen von 500 μ L auf die Säule gegeben und das Eluat fraktionsweise gesammelt. Entsprechende Fraktionen mit dem gewünschten Protein wurden vereinigt und wie zuvor beschrieben konzentriert. Die Reinigung erfolgte ausschließlich in PBS, wodurch ein späteres Umpuffern nicht notwendig war. Eine SEC kann zudem zur Größenbestimmung von Proteinen durchgeführt werden. Hierbei bedient man sich der Verweilzeit von Standardproteinen und berechnet mit Hilfe dieser und der gemessenen Verweilzeit des gewünschten Proteins dessen Molekulargewicht.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung von adhärennten und Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden in 10 cm Petrischalen in 10 mL DMEM^{+/+} mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 kultiviert. Selektionsantibiotika wurden alle zwei Wochen entsprechend zugegeben. Alle sieben Tage wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:10000 passagiert. Adhärennte Zellen wurden ebenfalls in 10 cm Zellkulturschalen in 10 mL DMEM^{+/+} kultiviert. Je nach Zelllinie wurden sie dauerhaft mit Selektionsantibiotikum in einem Verhältnis von 1:1000 alle 3-4 Tage passagiert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ sowie in einer gesättigten Wasserdampfatosphäre kultiviert.

2.2.3.2 Transfektion von adhärennten Zellen

Adhärennte Zellen wurden am Tag -1 mit einer Konzentration von 2×10^6 Zellen pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Am Tag 0 wurden 5 μ g Plasmid-DNA mit 10 μ L Turbofect (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in 1 mL DMEM^{-/-} gemischt und 15 min bei RT inkubiert.

Anschließend wurde die Mischung tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 6 h erfolgte bei CHO K1, nicht aber bei HEK293T, Zellen ein Mediumswechsel. Am Tag 2 wurde die Transfektion der Zellen kontrolliert.

Phönix-Eco Zellen wurden am Tag -1 mit einer Konzentration von 8×10^5 Zellen in einem 6-well ausgesät. 1 μg Plasmid-DNA wurden am Tag 0 mit 2 μL Turbofect und 200 μL DMEM^{-/-} für 15 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben. 6 h nach der Transfektion wurde das Medium mit DMEM^{+/+}, 30% FCS gewechselt. Am Tag 1 wurden die Überstände zur retroviralen Transduktion von Ba/F3/gp130-Zellen verwendet.

2.2.3.3 Retrovirale Transduktion von Ba/F3/gp130-Zellen

Ba/F3/gp130-Zellen wurden retroviral mit Überständen transfizierter Phönix-Eco Zellen transduziert. Dazu wurden 250 μL Phönix-Eco Überstand, 1×10^5 Zellen in 50 μL und 30 μg Polybrene (Sigma-Aldrich, Sternheim, Deutschland) gemischt und 2 h bei 300 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 mL DMEM^{+/+} mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 aufgenommen und in einer 6-Well Zellkulturschale kultiviert. Transduzierte Zellen wurde durch eine Antibiotikaselektion mit 1 mg/mL Hygromycin B (24 h nach Transduktion) oder/und 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin (48 h nach Transduktion) über 2-3 Wochen selektiert.

2.2.3.4 Durchflusszytometrie

Zur Kontrolle der Transduktion von Ba/F3/gp130-Zellen wurde die Oberflächenexpression der entsprechenden Rezeptoren mittels Durchflusszytometrie überprüft. Diese Methode beruht darauf, dass ein optisches Signal von den Zellen ausgeht und beim Durchkreuzen des Lichtstrahls registriert wird. Für die Analyse wurden je zwei Antikörper verwendet, der Primärantikörper bindet den Rezeptor, dieser wird vom Sekundärantikörper gebunden und ist mit einem Fluorophor für die Detektion gekoppelt. 5×10^5 Zellen wurden mit 1 mL FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 50 μL FACS-Puffer mit entsprechendem Primärantikörper resuspendiert. Die Zellen wurden 1 h bei RT inkubiert, erneut mit 1 mL FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 50 μL FACS-Puffer mit Sekundärantikörper resuspendiert. Erneut folgte eine Inkubation bei RT für 1 h im Dunkeln. Die Zellen wurden wieder mit 1 mL FACS-Puffer gewaschen und final in 500 μL FACS-Puffer resuspendiert. Die Analyse erfolgte am FACS Canto II. Die Daten wurden mit FlowJo_V10 Software ausgewertet.

2.2.3.5 Proliferationsassay

Der Zellviabilitätsassay wurde mit stabil transduzierten Ba/F3/gp130-Zellen zur Analyse der Proliferation durchgeführt. Hierbei wird durch die Zugabe von Resazurin dessen Reduktion zum fluoreszierenden Resorufin gemessen, welches in der Reagenz CellTiter-Blue enthalten ist. Die Detektion von Resorufin bei 560 nm erfolgte mit einem Tecan Infinite M200 PRO Reader. Zuvor wurden Ba/F3/gp130-Zellen 3 x mit PBS gewaschen und anschließend mit

einer Zellzahl von 5×10^4 Zellen pro mL in DMEM^{+/+} resuspendiert. Die Zellen wurden mit dem jeweiligen Zytokin und/oder Inhibitor versetzt und in einem Volumen von 100 μ L in einer 96-Well Zellkulturplatte für 72 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Der Assay wurde durch die Zugabe von 20 μ L CellTiter-Blue Lösung gestartet und direkt die Fluoreszenz gemessen (Zeitpunkt 0). Es wurde alle 20 min für maximal 120 Minuten gemessen und anschließend der Zeitpunkt 0 von der letzten Messung subtrahiert. Der Versuch erfolgte immer in Drei- bis Vierfachbestimmung.

Konzentrationsabhängige Proliferation

Ein Proliferationsassay wurde ebenfalls durchgeführt, um die Viabilität von Ba/F3/gp130-Zellen in Abhängigkeit von steigenden Konzentrationen eines Zytokins zu bestimmen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe des Zytokins von 1 μ g/mL bis 0,0004 ng/mL hergestellt. Zur Kontrolle wurde zusätzlich die Proliferation bei 10 ng/mL Hyper-IL-6 und ohne Zytokin gemessen. Anschließend wurde der Assay wie zuvor beschrieben für 72 h inkubiert und gemessen. Zusätzlich wurde die effektive oder inhibitorische Konzentration 50 (EC₅₀/IC₅₀) des Zytokins für die analysierte Zelllinie bestimmt.

2.2.3.6 Stimulationsassay und Ba/F3/gp130-Zellen

Die Phosphorylierung und damit Aktivierung von z.B. STAT3 oder Erk1/2 wurde mittels eines Stimulationsassays analysiert. Hierfür wurden Ba/F3/gp130-Zellen 5 x mit PBS gewaschen und anschließend in serumfreiem Medium (DMEM^{-/-}) resuspendiert. Das *starving* der Zellen von 3 - 4 h erfolgte in einem Volumen von 1 mL auf einer 12-Well Platte. Im Folgenden wurden die Zellen mit dem jeweiligen Zytokin für entsprechende Zeiten von 15 – 120 min stimuliert, pelletiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei der Verwendung der Inhibitoren P6 und MG132 wurden diese jeweils 30 Minuten vor der Stimulation zu den Zellen gegeben. Im Falle einer Stimulation von FasR-SyCyR Zellen wurden diese nicht *gestarvt*, sondern einmal zentrifugiert, in DMEM^{+/+} Medium resuspendiert und direkt für 6 h stimuliert. Hierbei wurde allen Bedingungen 10 ng/mL Hyper-IL-6 zugefügt. Die Lyse der Zellen erfolgte wie unter 2.2.2.1 beschrieben.

2.2.3.7 Zelltodbestimmung mittels 7-AAD und Annexin V

Bei 7-Aminooactinomycin D (7-AAD) handelt es sich um eine fluoreszierende Chemikalie, welche eine hohe Affinität zu DNA ausweist. Wenn bei Zellen Apoptose oder eine andere Art von Zelltod ausgelöst wird, wird ihre Zellmembran löchrig und 7-AAD kann diese passieren und an die DNA der Zellen binden. Dies ist bei lebendigen Zellen nicht möglich, weshalb 7-AAD zur Bestimmung der Vitalität von Zellen eingesetzt werden kann und bei einer Wellenlänge von 543 nm mittels Durchflusszytometrie bestimmt wird.

Bei Annexin V handelt es sich ebenfalls um ein Fluorophor-gekoppeltes Reagenz, welches apoptotische Zellen detektieren kann. Im Gegensatz zu 7-AAD bindet Annexin V mit hoher Affinität an das Lipid Phosphatidylserin. In vitalen Zellen kommt dieses Lipid nur an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran vor. Wenn Zellen allerdings apoptotisch werden, verändert sich auch die Zellmembran und Phosphatidylserin transloziert an die extrazelluläre Seite der Membran. Hier kann Annexin V dann an dieses binden und diese Bindung kann bei einer Wellenlänge von 585 nm gemessen werden.

Die Analyse der Vitalität von Ba/F3/gp130-Zellen erfolgte durch eine kombinatorische Inkubation der Zellen mit 7-AAD und Annexin V. Für eine Analyse nach 24 h wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen, bei 48 h $1,25 \times 10^5$ und bei 72 h $6,2 \times 10^4$ Zellen pro Well eingesetzt und mit den entsprechenden Zytokinen für die jeweilige Zeit inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen, wobei die Positivkontrolle für Zelltod hierbei mit 70%-igem Ethanol gewaschen wurde. Die Zellen wurden dann in 300 μL Annexin V Binding Puffer resuspendiert, 0,5 μL Annexin V zugegeben, gevortext und 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde 1 μL 7-AAD dazugegeben und anschließend 400 μL Annexin V Binding Puffer. Die Analyse erfolgte dann mittels Durchflusszytometrie im Kanal PE-A für Annexin V und PerCP-Cy5-5-A für 7-AAD und die Daten wurden mit FlowJo_V10 Software ausgewertet.

2.2.3.8 Bindung GFP an GFP_{VHH}

Die Bindung von GFP-Fc an den GFP_{VHH} wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Zellen wurden dafür 1 h bei 37 °C mit 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GFP-Fc inkubiert. Anschließend wurden sie 3 x mit PBS gewaschen und in 500 μL PBS resuspendiert. Die Bindung wurde dann durch die Messung des GFP-Signals im FITC-A Kanal nachgewiesen. Die Daten wurden mit FlowJo_V10 Software ausgewertet.

2.2.3.9 Immunpräzipitation

Co-transfizierte HEK293T Zellen wurde 48 h nach der Transfektion in IP-Lysepuffer 30 min auf Eis lysiert. Die Lysate wurden 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zellysate wurden dann je mit dem α -Jak1 (1:50), α -Jak2 (1:1000) oder α -Tyk2 (1:50) Antikörper bei 4 °C über Nacht unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden 50 μL Protein-A-Agarose zu jedem Ansatz dazugegeben und für weitere 2 h unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Die Proben wurden drei Mal mit IP-Lysepuffer gewaschen, in 50 μL 2,5xLaemmli resuspendiert und 10 min bei 95 °C inkubiert. Die Analyse der Interaktion zwischen der Kinase und dem Rezeptor erfolgte mittels Western Blot.

2.2.3.10 Stabile CHO K1 Zellen

Zur Expression der synthetischen Zytokine wurden stabil transfizierte CHO K1 Zellen verwendet. Hierfür wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion (siehe Abschnitt 2.2.3.2) mit 1,125 mg/mL des Antibiotikums G418 selektiert. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurde alle 3 – 4 Tage das Medium gewechselt und neues G418 zugegeben. Anschließend wurden die Zellen auf einer 96-Well Platte ausgesät mit einer Konzentration von 0,5 Zellen pro Well. Auch hier erfolgte ein Mediumswechsel alle 3 – 4 Tage, wobei die Proteinexpression und Sekretion in den Überstand nach 7 Tagen analysiert wurde. Einzelzellklone, welche eine hohe Expression aufwiesen, wurden erst auf 6-Well überführt, erneut kontrolliert und dann in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert.

2.2.3.11 Kultivierung von CHO K1 Zellen in Rollerbottles

Nachdem stabile CHO K1 Zellen generiert wurden, welche das betreffende Protein in den Überstand sezerniert, wurden diese Zellen auf 14 - 15 cm Zellkulturschalen überführt und für ca. 4 Tage kultiviert. Die Zellen wurden dann abgelöst und in einem Volumen von 400 mL in Rollerbottles überführt. Diese wurden unter Rotation bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen haben sich an der Flaschenoberfläche angesiedelt und nach 3 – 4 Tagen wurde das Medium abgenommen und das Produktionsmedium (DMEM^{+/-/-} mit low IgG FCS und G418) zugegeben. Über einen Zeitraum von 6 Wochen wurde alle 3 – 4 Tage das Produktionsmedium gewechselt, wobei der entnommene Überstand einmal 10 min bei 1000 g und einmal für 30 min bei 10000 g zentrifugiert und anschließend bei -80 °C gelagert wurde. Die Reinigung der Proteine aus dem Zellkulturüberstand erfolgte dann wie bereits beschrieben (2.2.2.7).

3. Ergebnisse

3.1 Expression und Reinigung aktiver synthetischer Liganden

Das SyCyR-System basiert, wie bereits in Abschnitt 1.1 beschrieben, auf der Verwendung von synthetischen Rezeptoren und Liganden. Bisher wurden hierfür als Liganden GFP und mCherry verwendet, welche über einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind. Die Proteine wurden in CHO K1 Zellen exprimiert und die Konzentration per ELISA bestimmt. Zur Stimulation der SyCyRs wurden definierte Mengen der CHO K1 Zellüberstände eingesetzt [29]. Nachteilig bei der Verwendung von Zellkulturüberständen war hierbei, dass sie auch andere Proteine enthalten und diese bei *in vivo* Versuchen z.B. Immunreaktionen auslösen können. Die Proteine wurden weiterhin in Bakterien exprimiert, um größere Mengen zu erhalten. Die gereinigten Proteine wiesen jedoch eine schlechte Stabilität auf. Insbesondere Trimere wurden nur in Fragmenten exprimiert. Im Folgenden wurde daher die Expression der synthetischen Liganden optimiert. Die Ergebnisse dieses Abschnitts wurden bereits in PLOS ONE veröffentlicht [169].

Die Expression erfolgte weiterhin in CHO K1 Zellen, da die Proteine hier eine hohe Stabilität aufwiesen. Um eine Reinigung der exprimierten Proteine zu gewährleisten, wurden GFP und mCherry über einen Linker, welcher eine TEV Proteaseschnittstelle enthält, mit der Fc-Domäne eines humanen IgG-Antikörpers fusioniert (**Abbildung 5A**, Sequenz siehe Anhang **Abbildung 64**, **Abbildung 65**).

Die Fusionsproteine wurden kloniert, in CHO K1 Zellen transfiziert und stabile Klone generiert. Dies erfolgte über eine Antibiotikaselektion mit G418, wobei eine Einzelklonselektion durchgeführt wurde. Der Klon mit der stärksten Proteinexpression wurde dann für die weitere Expression des Fusionsproteins ausgewählt. Hierfür wurden die Zellen in einem Rollerbottle-System kultiviert und alle 3 – 4 Tage das Medium gewechselt. Die erhaltenen Überstände wurden für die spätere Proteinreinigung bei -80 °C gelagert. Je 1 L Zellkulturüberstand wurde mittels Affinitätschromatographie mit Protein-A-Sepharose gereinigt. Die Ausbeute betrug hierbei sowohl für GFP-Fc als auch für mCherry-Fc 1,23 mg/L. Die Fc-Domäne eines IgG Antikörpers kann nicht nur als Affinitätstag für Proteinreinigungen verwendet werden, sondern ist auch eine Dimerisierungsdomäne, was in einem reduzierenden und einem nicht-reduzierenden Coomassiegel für GFP-Fc und mCherry-Fc gezeigt werden konnte (**Abbildung 5B**). Ob der durch die Dimerisierung der Fc-Domäne generierte Dimer in der Lage ist, synthetische Rezeptoren zu aktivieren, wurde mit SyCyRs für den humanen gp130 Rezeptor (GFP_{VHH}gp130, mCherry_{VHH}gp130) getestet, welcher in Ba/F3/gp130-Zellen stabil exprimiert wurde (**Abbildung 5C**). Die SyCyRs wurden durch die Fusion eines Nanobodies gegen GFP oder mCherry (GFP_{VHH}, mCherry_{VHH}) an 13 AS der ECD sowie der vollständigen TMD und ICD

des gp130 Rezeptors generiert (Sequenz siehe Anhang **Abbildung 67**). Die gp130-SyCyRs eigneten sich für diese Analyse, da sie als Dimer aktiv sind und ihre Signaltransduktion bekannt ist. Weiterhin erfolgte ein direkter Vergleich mit der endogenen Signaltransduktion von gp130 innerhalb derselben Zelllinie.

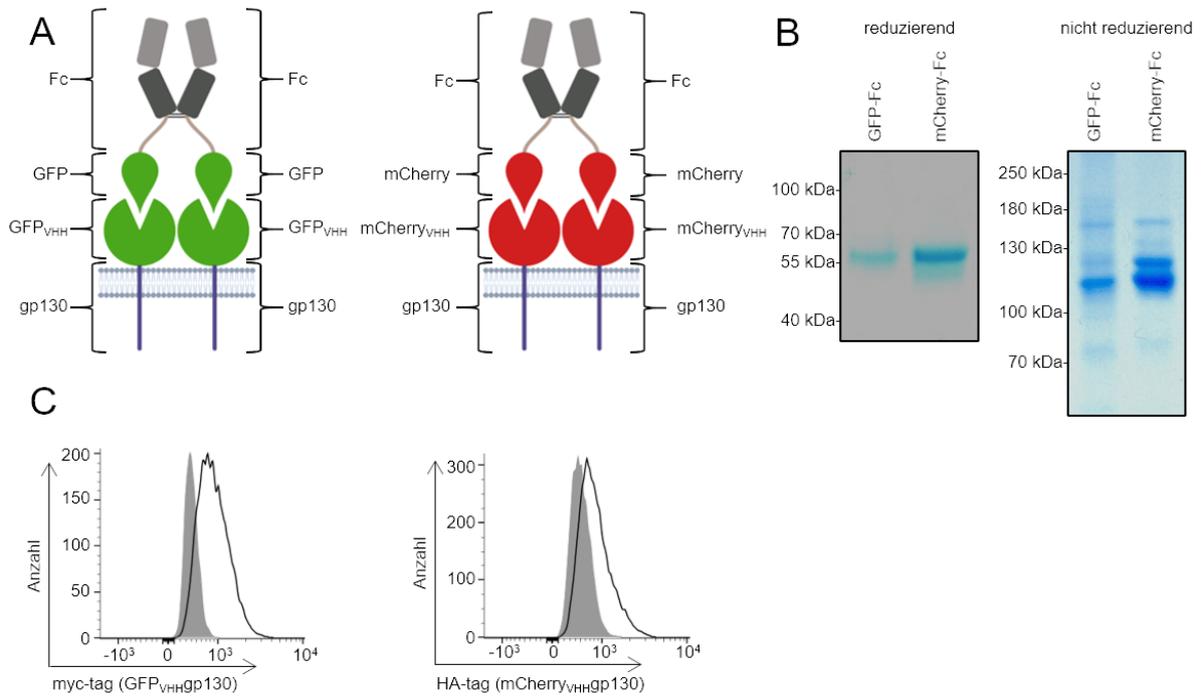


Abbildung 5: Proteinreinigung von synthetischem GFP-Fc und mCherry-Fc. (A) Schematische Darstellung der Bindung von GFP-Fc (grün, grau) und mCherry-Fc (rot, grau) Dimeren an GFP_{VHH}gp130 (grün, lila) und mCherry_{VHH}gp130 (rot, lila) SyCyRs. Die Abbildung wurde mit BioRender generiert. (B) Coomassiegelelektrophorese von gereinigtem GFP-Fc und mCherry-Fc unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. (C) Oberflächenexpression der SyCyRs (durchgezogene Linie) in Ba/F3/gp130-Zellen. Die graue Fläche zeigt Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130- oder Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}gp130 -Zellen. Die Detektion erfolgte durch myc-(GFP_{VHH}) oder HA-Antikörper (mCherry_{VHH}). Die gezeigten Daten wurden ursprünglich in PLOS ONE veröffentlicht [169].

Ba/F3-Zellen sind murine Pro-B-Zellen, welche ausschließlich Zytokin-abhängig mit IL-3 proliferieren. Die hier verwendeten Zellen exprimieren zusätzlich stabil humanes gp130 und können somit auch über die IL-6 Signaltransduktion proliferieren. Ba/F3/gp130-Zellen exprimieren jedoch nicht den IL-6R, weshalb für die Proliferation ein Fusionsprotein aus IL-6 und löslichem IL-6R (sIL-6R) namens Hyper-IL-6 verwendet wurde [170]. Die Proliferation der Ba/F3/gp130-Zellen mit dem Hyper-Zytokin Hyper-IL-6 stellte in den folgenden Versuchen stets die Positivkontrolle dar, da sie die wildtypische gp130-Aktivierung darstellt. Die Aktivität der gereinigten GFP-Fc und mCherry-Fc Proteine wurde in einem Proliferationsassay bestimmt. Die Zellen proliferierten sowohl mit GFP-Fc und Hyper-IL-6 im Falle von Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130 oder aber mit mCherry-Fc und Hyper-IL-6 für Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}gp130. In beiden Fällen proliferierte die Kontrollzelllinie Ba/F3/gp130 nur mit Hyper-IL-6 und nicht mit den synthetischen Dimeren (**Abbildung 6A**). In einem konzentrationsabhängigen Proliferationsassay zeigte sich für GFP-Fc eine halbmaximale

effektorische Konzentration (EC_{50}) von 8,1 ng/mL, während diese für mCherry-Fc bei 0,64 ng/mL lag (**Abbildung 6B**). Auch bei hohen Konzentrationen zeigte sich hier keine Proliferation der Kontrollzelllinie Ba/F3/gp130 (**Abbildung 6B**).

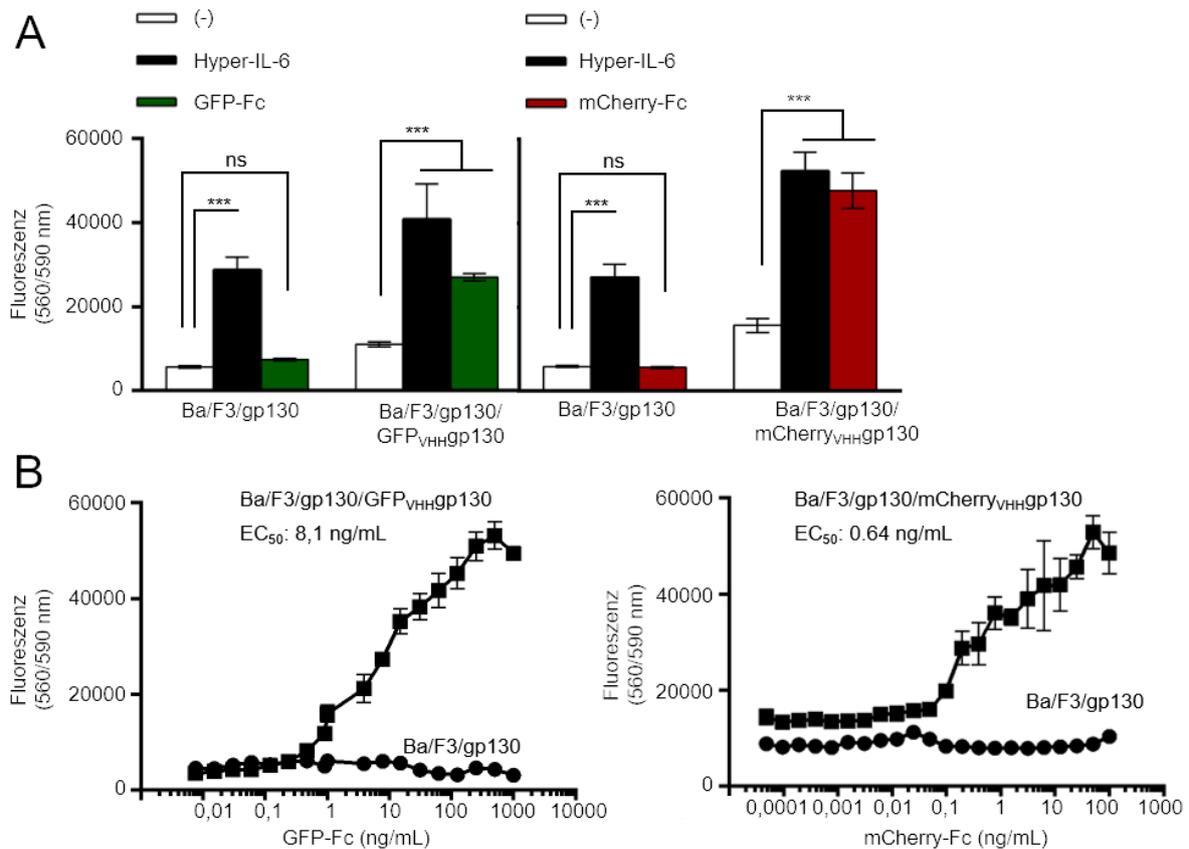


Abbildung 6: GFP-Fc und mCherry-Fc induzierte Proliferation. (A) Proliferation von Ba/F3/gp130, Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130 und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}gp130 Zellen ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder mit je 100 ng/mL GFP-Fc/mCherry-Fc. (B) Proliferation von Ba/F3/gp130, Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130 und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}gp130 Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von 0,0075 – 1000 ng/mL für GFP-Fc oder von 0,00004 – 100 ng/mL für mCherry-Fc. Dargestellt ist ein Experiment aus n=3 unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$). Die Berechnung der EC_{50} erfolgte mittels nichtlinearer Regression. Die Abbildung wurde ursprünglich in PLOS ONE veröffentlicht [169].

Es zeigte sich hierbei eine geringere EC_{50} für die Proliferation mit mCherry-Fc als für die durch GFP-Fc induzierte Proliferation. Dies liegt vermutlich an den unterschiedlichen K_D -Werten der Nanobodies für ihre jeweiligen Liganden. Während der GFP_{VHH} einen K_D -Wert von ~ 1 nM gegenüber GFP aufweist, liegt der K_D -Wert des mCherry_{VHH} bei 0,49 nM [35, 171]. Die Bindung von mCherry an den mCherry_{VHH} erfolgt demnach bereits bei deutlich geringeren Konzentrationen, was den hier ermittelten niedrigeren EC_{50} -Wert für mCherry-Fc erklärt.

Die Proliferation von Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130 und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}gp130 Zellen ist abhängig von der Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2, welche in einem Stimulationsassay analysiert wurde (**Abbildung 7**).

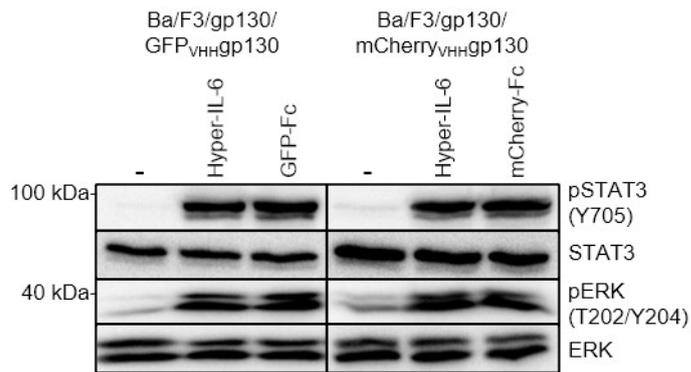


Abbildung 7: STAT3- und ERK1/2- Aktivierung in Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130 und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}gp130 Zellen. Die Zellen wurden entweder mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL GFP-Fc/mCherry-Fc für 15 min stimuliert. Es wurden 50 µg Protein pro Spur aufgetragen und mit spezifischen Antikörpern für STAT3, ERK1/2, pSTAT3, pERK1/2 detektiert. Vertikale Linien stellen verschiedene Membranen dar. Dargestellt ist ein Experiment aus n=3 unabhängigen Experimenten. Die Abbildung wurde ursprünglich in PLOS ONE veröffentlicht [169].

Sowohl für GFP-Fc als auch für mCherry-Fc zeigte sich hierbei die gleiche Intensität der STAT3 und ERK1/2 Phosphorylierung, wie bei einer Stimulation der Zellen mit Hyper-IL-6, welches den wildtypischen gp130-Rezeptor aktiviert.

Weiterhin wurden GFP-mCherry-Fc Proteine generiert, welche durch die Fc-Dimerisierung einen Heterotetramer aus GFP-mCherry-Fc-Fc-mCherry-GFP bilden (**Abbildung 8A**, Sequenz siehe Anhang **Abbildung 66**). Das Fusionsprotein wurde in CHO K1 Zellen transfiziert und stabile Klone generiert. Die Reinigung des Zellkulturüberstands ergab eine Ausbeute von 1,36 mg/L. Die Dimerisierung des Proteins konnte in einem reduzierenden und einem nicht-reduzierenden Coomassiegel gezeigt werden (**Abbildung 8B**). Die Aktivität wurde dann zusätzlich zu den beiden Zelllinien Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130 und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}gp130 auch an Zellen getestet, welche gp130-SyCyRs mit beiden Nanobodies stabil auf ihrer Oberfläche exprimieren (**Abbildung 8C**).

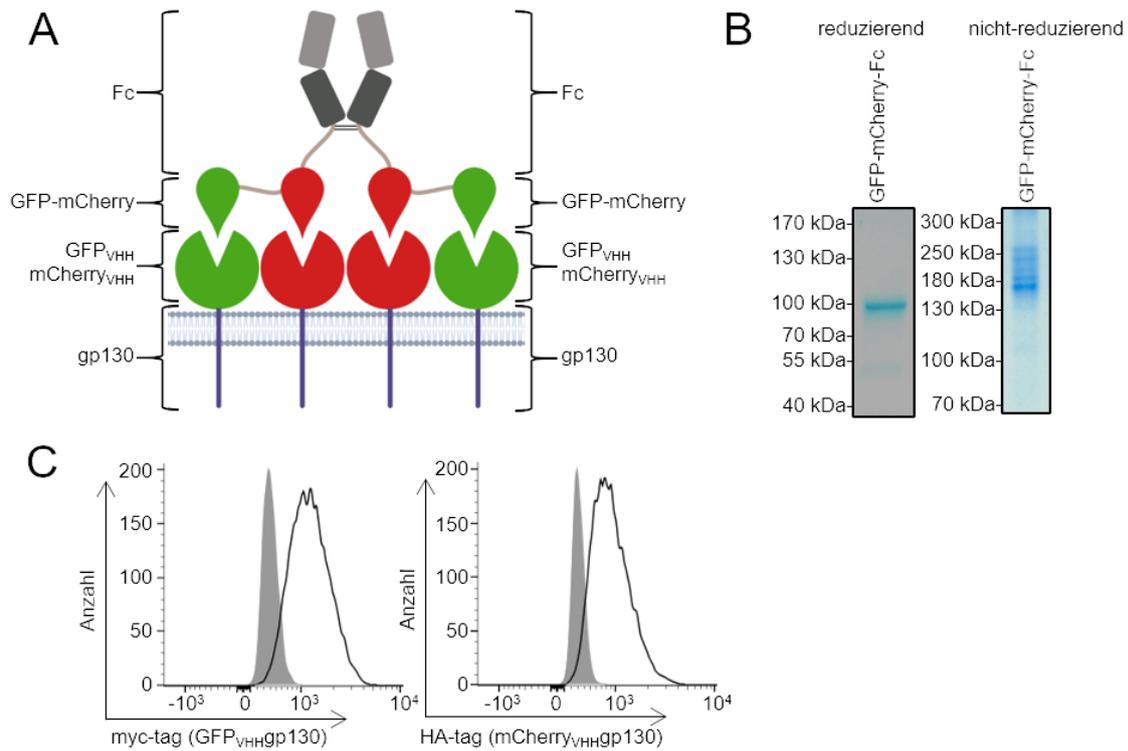


Abbildung 8: Reinigung des synthetischen Liganden GFP-mCherry-Fc. **(A)** Schematische Darstellung der Bindung eines GFP-mCherry-Fc Heterotetramers an GFP_{VHH}gp130- und mCherry_{VHH}gp130-SyCyRs. Die Abbildung wurde mit BioRender generiert. **(B)** Coomassiegel von gereinigtem GFP-mCherry-Fc unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen. **(C)** Kontrolle der Co-Oberflächenexpression von GFP_{VHH}gp130 (myc-tag) und mCherry_{VHH}gp130 (HA-tag) (durchgezogene Linie) in Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}gp130-Zellen. Die graue Fläche zeigt Ba/F3/gp130-Zellen. Die Detektion erfolgte durch myc- oder HA-Antikörper. Die gezeigten Daten wurden ursprünglich in PLOS ONE veröffentlicht [169].

Zunächst wurde das Zytokin-abhängige Wachstum der Ba/F3/gp130, Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130, Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}gp130 und Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}gp130 Zellen mit gereinigtem GFP-Fc, mCherry-Fc, GFP-mCherry-Fc oder Hyper-IL-6 analysiert (**Abbildung 9A**). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die synthetischen Zytokine selektiv die jeweiligen Rezeptoren aktivieren. Es wurde für keinen synthetischen Liganden eine Hintergrundaktivität detektiert. Interessanterweise schien der Abstand der beiden GFP Moleküle in GFP-mCherry-Fc zu groß, um die Signaltransduktion bei Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130 Zellen effektiv zu induzieren. Diese Ergebnisse bestätigten sich in einem konzentrationsabhängigen Proliferationsassay, welcher eine EC₅₀ von 1,97 ng/mL für Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}gp130 Zellen, 2,05 ng/mL für Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}gp130 und 43,9 ng/mL für Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130 Zellen bei einer Stimulation mit GFP-mCherry-Fc ermittelte (**Abbildung 9B**).

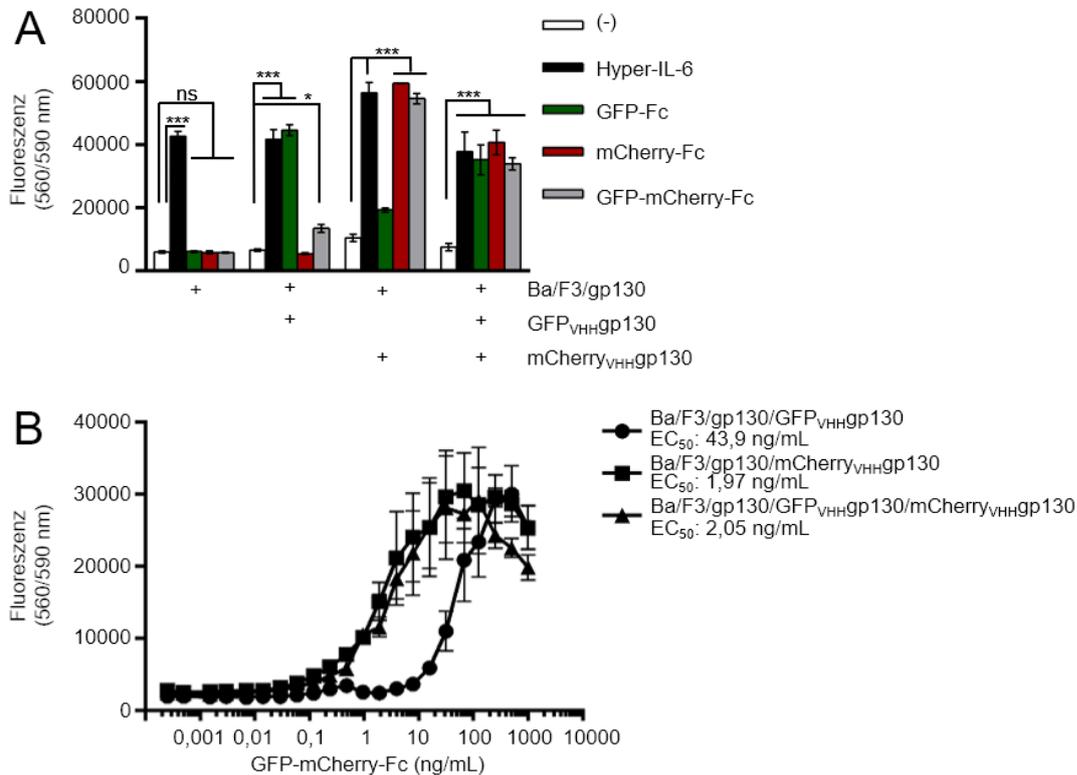


Abbildung 9: Proliferation von Ba/F3/gp130-SyCyR Zellen induziert durch synthetische Liganden. (A) Proliferation von Ba/F3/gp130, Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130, Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}gp130 und Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}gp130 Zellen ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder mit je 100 ng/mL GFP-Fc, mCherry-Fc und GFP-mCherry-Fc. **(B)** Proliferation von Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130, Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}gp130 und Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}gp130 Zellen mit steigenden Konzentrationen von 0,00025 – 1000 ng/mL GFP-mCherry-Fc. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$). Die Berechnung der EC₅₀ erfolgte mittels nichtlinearer Regression. Die Abbildung wurde ursprünglich in PLOS ONE veröffentlicht [169].

Die Analyse der Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 mittels Western Blot zeigte ebenfalls die Spezifität der Liganden und eine vergleichbare Intensität mit der wildtypischen Aktivierung von gp130 durch Hyper-IL-6 (**Abbildung 10**). Auch hier zeigte sich, dass GFP-mCherry-Fc Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130 Zellen nur zu einem geringen Maße aktiviert, da die Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 hier vergleichsweise schwach war. Es konnte ebenfalls für keinen synthetischen Liganden eine Hintergrundaktivität detektiert werden.

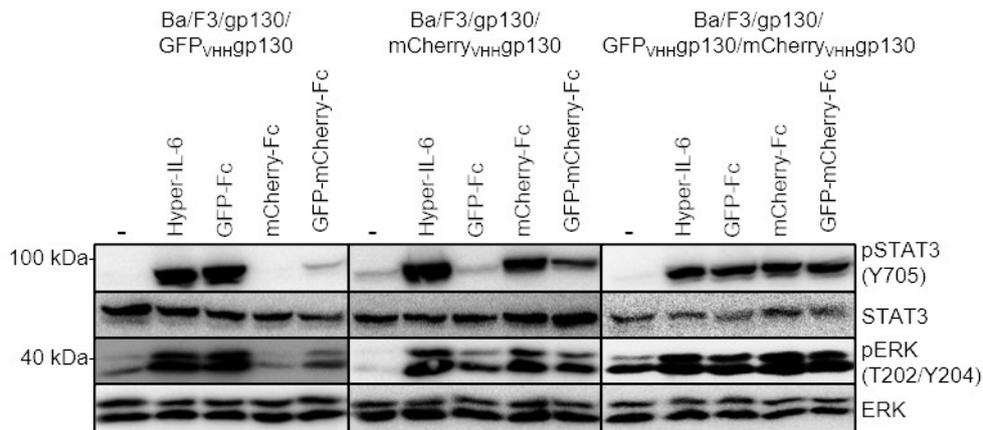


Abbildung 10: STAT3 und ERK1/2 Aktivierung in Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130, Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}gp130 und Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}gp130 Zellen. Die Zellen wurden entweder mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL GFP-Fc, mCherry-Fc, GFP-mCherry-Fc für 15 min stimuliert. Es wurden 50 µg Protein pro Spur aufgetragen und mit spezifischen Antikörpern für STAT3, ERK1/2, pSTAT3, pERK1/2 detektiert. Vertikale Linien stellen verschiedene Membranen dar. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten. Die Abbildung wurde ursprünglich in PLOS ONE veröffentlicht [169].

Zudem wurden heterotrimere GFP-GFP-mCherry-Fc Fusionsproteine generiert (**Abbildung 11A**, Sequenz siehe Anhang **Abbildung 66**), welche ebenfalls durch Einzelklonselektion in CHO K1 Zellen exprimiert wurden. Die Ausbeute der Proteinreinigung des Fusionsproteins lag bei 1,74 mg/L. Das gereinigte Protein kann einen Heterohexamer ausbilden, wie in einem reduzierenden und einem nicht-reduzierenden Coomassiegel gezeigt wurde (**Abbildung 11B**).

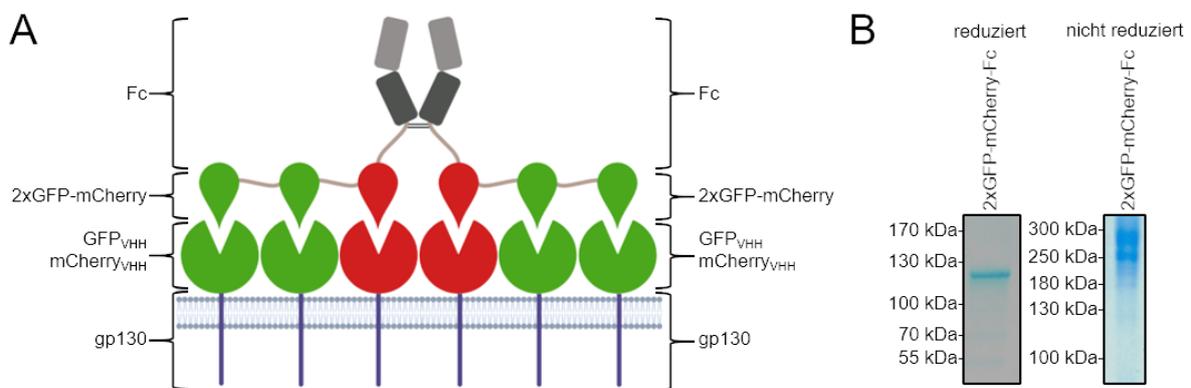


Abbildung 11: Reinigung des synthetischen Liganden GFP-GFP-mCherry-Fc. (A) Schematische Darstellung der Bindung des 2xGFP-mCherry-Fc Heterohexamer an GFP_{VHH}gp130- und mCherry_{VHH}gp130-SyCyRs. **(B)** Coomassiegel unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen des gereinigten 2xGFP-mCherry-Fc. Die Abbildung wurde mit BioRender generiert und ursprünglich in PLOS ONE veröffentlicht [169].

Die Aktivität des gereinigten 2xGFP-mCherry Fusionsproteins wurde mit den zuvor bereits verwendeten Zelllinien per Proliferationsassay getestet (**Abbildung 12A**). Alle Zelllinien, welche gp130-SyCyRs exprimieren, proliferierten mit 2xGFP-mCherry-Fc vergleichbar wie mit Hyper-IL-6. Es gab demnach keinen Unterschied zwischen der wildtypischen und der synthetischen Aktivierung der gp130-Signaltransduktion. Jedoch gab es Unterschiede bei der EC₅₀, welche in einem konzentrationsabhängigen Proliferationsassay bestimmt wurde

(Abbildung 12B). Für Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130 Zellen lag die EC₅₀ bei 4,5 ng/mL, bei Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}gp130 Zellen bei 2,5 ng/mL und bei Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}gp130 Zellen bei 14,9 ng/mL.

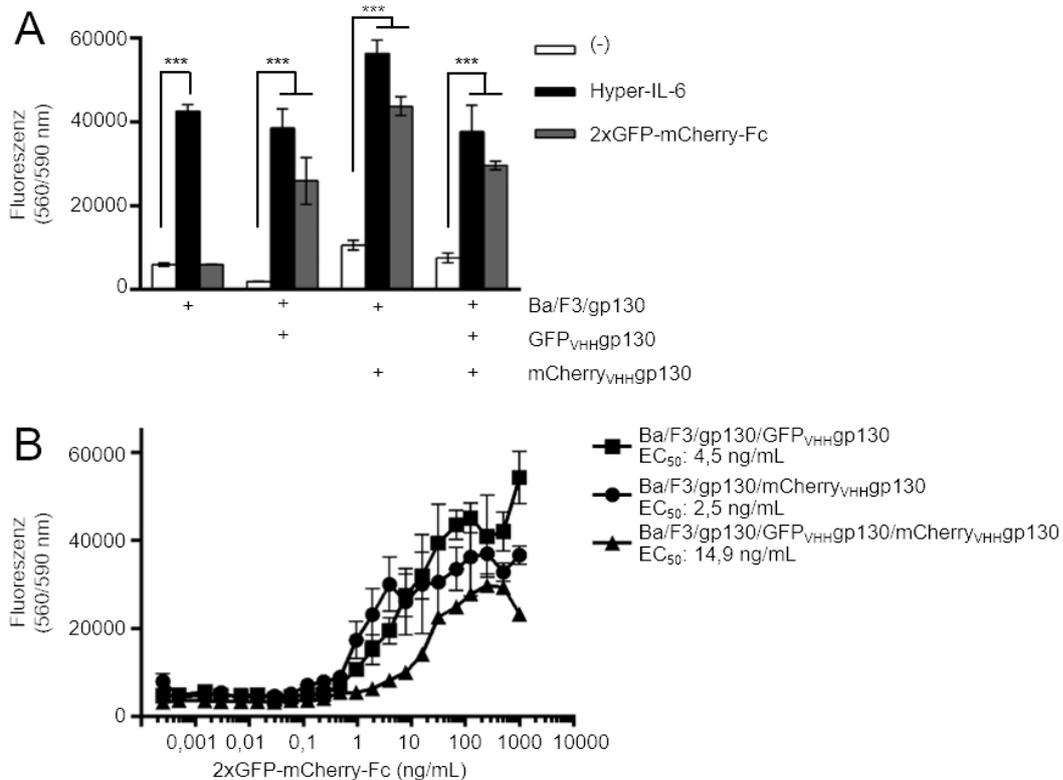


Abbildung 12: GFP-GFP-mCherry-Fc induzierte Proliferation von Ba/F3/gp130-SyCyR Zellen. (A) Proliferation von Ba/F3/gp130, Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130, Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}gp130 und Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}gp130 Zellen ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder mit 100 ng/mL 2xGFP-mCherry-Fc. (B) Proliferation von Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130, Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}gp130 und Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}gp130 Zellen mit steigenden Konzentrationen von 0,00025 – 1000 ng/mL 2xGFP-mCherry-Fc. Dargestellt ist ein Experiment aus n=3 unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$). Die Berechnung der EC₅₀ erfolgte mittels nichtlinearer Regression. Die Abbildung wurde ursprünglich in PLOS ONE veröffentlicht [169].

Die von 2xGFP-mCherry-Fc induzierte Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 war bei allen drei Zelllinien vergleichbar zu der Phosphorylierung durch Stimulation mit Hyper-IL-6 (Abbildung 13).

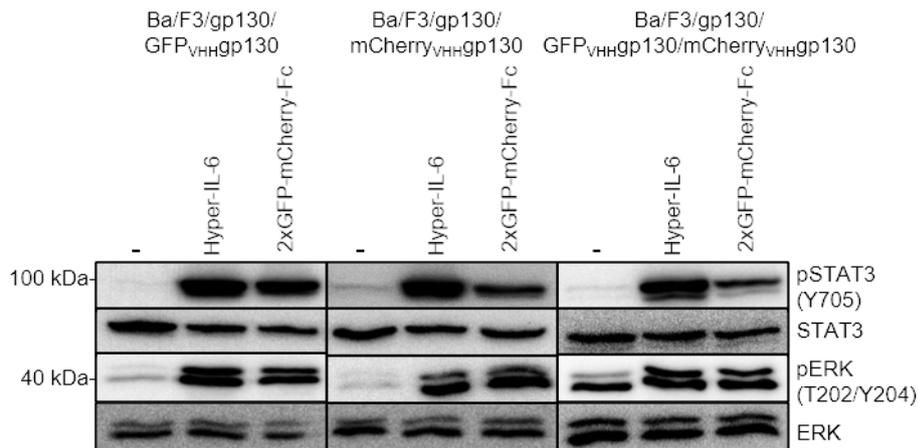


Abbildung 13: STAT3 und ERK1/2 Aktivierung in Ba/F3/gp130/GFP_{VHHgp130}, Ba/F3/gp130/mCherry_{VHHgp130} und Ba/F3/gp130/GFP_{VHHgp130}/mCherry_{VHHgp130} Zellen. Die Zellen wurden entweder mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL 2xGFP-mCherry-Fc für 15 min stimuliert. Es wurden 50 µg Protein pro Spur aufgetragen und mit spezifischen Antikörpern für STAT3, ERK1/2, pSTAT3, pERK1/2 detektiert. Vertikale Linien stellen verschiedene Membranen dar. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten. Die Abbildung wurde ursprünglich in PLOS ONE veröffentlicht [169].

Es konnte demnach gezeigt werden, dass die Aktivierung synthetischer Zytokinrezeptoren durch synthetische Liganden in hohem Maße selektiv und spezifisch ist und den endogenen Signalweg von gp130 kopieren kann. Die hier generierten Liganden wurden im Folgenden dazu verwendet die Signaltransduktion von weiteren Rezeptoren aufzuklären.

3.2 Analyse der IL-22 Signaltransduktion

Die im Folgenden gezeigten Daten wurden ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © der Autoren. IL-22 bindet, wie unter 1.4 beschrieben, an den IL-22Rα1 und den IL-10R2 [89] (**Abbildung 14A**). Die endogene Signaltransduktion wurde in Ba/F3/gp130-Zellen analysiert, welche die beiden murinen Rezeptoren stabil exprimierten (**Abbildung 14B**).

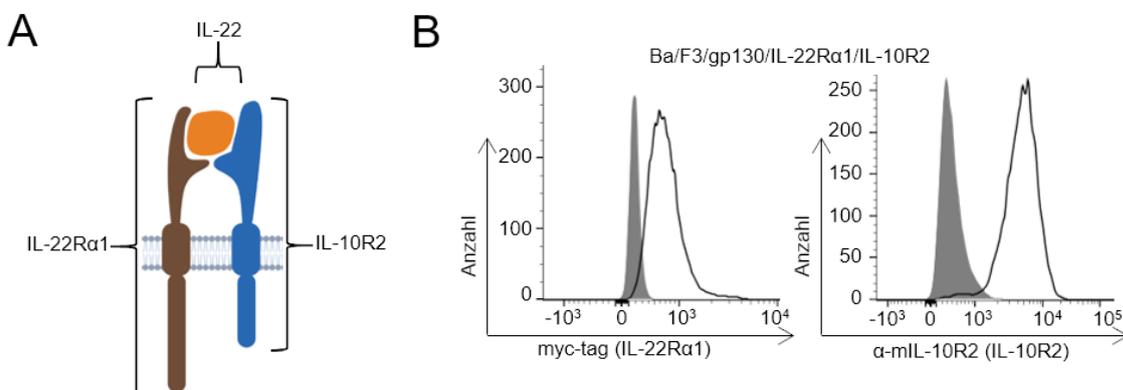


Abbildung 14: Bildung des IL-22 Signalkomplexes. (A) Schematische Darstellung der Bindung von IL-22 (orange) an den IL-22Rα1 (braun) und den IL-10R2 (blau). Die Abbildung wurde mit BioRender generiert. (B) Kontrolle der Co-Oberflächenexpression des IL-22Rα1 (myc-tag) und IL-10R2 (durchgezogene Linie) in Ba/F3/gp130/IL-22Rα1/IL-10R2-Zellen. Die graue Fläche zeigt Ba/F3/gp130-Zellen. Die Detektion erfolgte durch

myc- oder mL-10R2-Antikörper. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Die Aktivität der Rezeptoren wurde zunächst in einem Proliferationsassay analysiert. Sowohl Hyper-IL-6 als auch IL-22 sind in der Lage die Proliferation von Ba/F3/gp130/IL-10R2/IL-22R α 1 Zellen zu induzieren. Zellen, welche nur den IL-10R2 exprimieren, proliferierten jedoch weder mit IL-22 noch mit dimerem IL-22-Fc (**Abbildung 15A**). Die Proliferation konnte durch die Zugabe des Januskinase-Inhibitors P6 vollständig blockiert werden. Bei P6 handelt es sich um einen Inhibitor, welcher alle Januskinasen mit verschiedenen Affinitäten bindet und inhibiert [172, 173]. Bei Ba/F3/gp130/IL-10R2/IL-22R α 1 Zellen ergab sich eine EC₅₀ von 2,1 ng/mL für eine Stimulation mit IL-22-Fc, während auch bei höheren Konzentrationen von IL-22-Fc keine Proliferation von Ba/F3/gp130/IL-10R2 und Ba/F3/gp130/IL-22R α 1 Zellen festgestellt werden konnte (**Abbildung 15B**). Die IL-22 Signaltransduktion wird vornehmlich durch die Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 ausgeführt, welche durch die Phosphorylierung der Januskinasen Jak1 und Tyk2 induziert wird [174]. Diese Phosphorylierungen von STAT3, ERK1/2, Jak1 und Tyk2 konnten im Western Blot nach einer Stimulation von Ba/F3/gp130/IL-10R2/IL-22R α 1 Zellen mit IL-22 detektiert werden (**Abbildung 15C**). Die Inhibition durch P6 reduzierte hierbei deutlich die Menge an phosphoryliertem STAT3 und blockierte die Phosphorylierung nahezu vollständig im Falle von ERK1/2 und Jak1. Die Menge an pTyk2 wurde hingegen nicht beeinflusst (**Abbildung 15C**). P6 sollte alle Januskinasen inhibieren, jedoch konnte mit 10 μ M P6 nur die Januskinase 1 inhibiert werden [175, 176]. Weiterhin wurden die Zellen auch mit 1 μ M und 100 μ M P6 vorinkubiert und anschließend stimuliert (**Abbildung 15D**). Es zeigte sich, dass die Kinase Tyk2 bei einer Konzentration von 100 μ M P6 ebenfalls nicht mehr phosphoryliert wurde. Es wurde bereits beschrieben, dass P6 unterschiedliche inhibitorische Kapazitäten gegenüber den Kinasen besitzt, welche zusätzlich zwischen Zelllinien variieren [177].

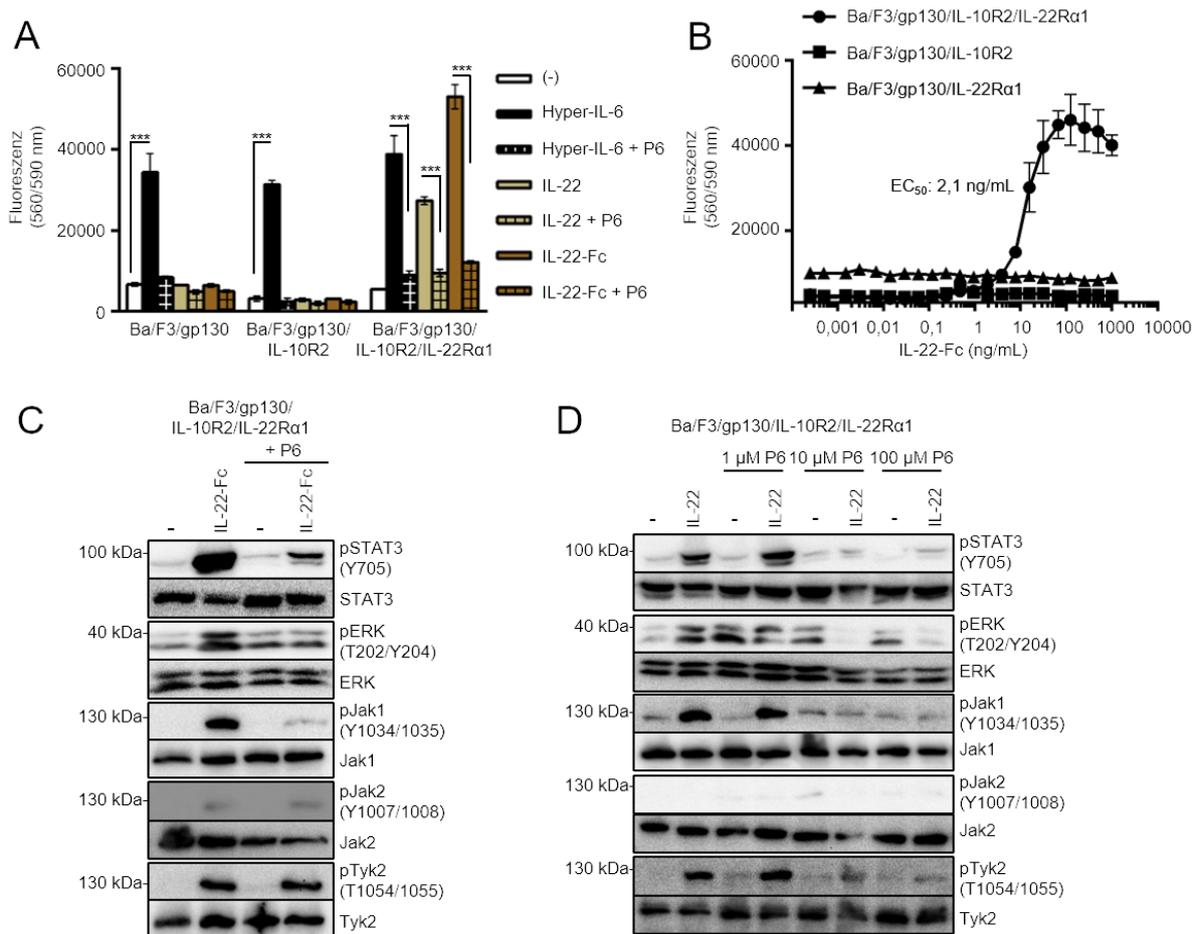


Abbildung 15: Analyse der wildtypischen IL-22 Signaltransduktion in Ba/F3/gp130-Zellen. (A) Proliferation von Ba/F3/gp130, Ba/F3/gp130/IL-10R2 und Ba/F3/gp130/IL-10R2/IL-22R α 1 Zellen durch Inkubation ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL IL-22 oder IL-22-Fc. 10 μ M P6 Inhibitor wurden zu den gekennzeichneten Bedingungen gegeben. **(B)** Proliferation von Ba/F3/gp130/IL-10R2, Ba/F3/gp130/IL-22R α 1 und Ba/F3/gp130/IL-10R2/IL-22R α 1 Zellen mit steigenden Konzentrationen von 0,00025 – 1000 ng/mL IL-22-Fc. **(C)** STAT3, ERK1/2, Jak1, Jak2 und Tyk2 Aktivierung in Ba/F3/gp130/IL-10R2/IL-22R α 1 Zellen stimuliert mit 100 ng/mL IL-22-Fc für 120 min. Konditionen mit P6 Inhibitor wurden mit 10 μ M Inhibitor 30 min vorinkubiert. Gleiche Mengen an Protein (50 μ g pro Spur) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3, ERK1/2, Jak1, Jak2, Tyk2 und pSTAT3, pERK1/2, pJak1, pJak2, pTyk2 analysiert. **(D)** STAT3, ERK1/2, Jak1, Jak2 und Tyk2 Aktivierung in Ba/F3/gp130/IL-10R2/IL-22R α 1 Zellen stimuliert mit 100 ng/mL IL-22-Fc für 120 min. Konditionen mit P6 Inhibitor wurden mit 1 μ M, 10 μ M oder 100 μ M Inhibitor 30 min vorinkubiert. Gleiche Mengen an Protein (50 μ g pro Spur) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3, ERK1/2, Jak1, Jak2, Tyk2 und pSTAT3, pERK1/2, pJak1, pJak2, pTyk2 analysiert. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$). Die Berechnung der EC_{50} erfolgte mittels nichtlinearer Regression. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Es konnte demnach gezeigt werden, dass sich Ba/F3/gp130 Zelllinien für eine Analyse der IL-22 induzierten Signaltransduktion eignen, da die Zellen durch eine Inkubation mit IL-22 proliferierten und, wie in der Literatur beschrieben, eine Phosphorylierung von STAT3, ERK1/2, Jak1 und Tyk2 nach einer Stimulation mit IL-22 nachgewiesen werden konnte.

Die IL-22 Signaltransduktion wurde anschließend durch das SyCyR-System nachgestellt, wobei zehn AS der ECD, die TMD und ICD des murinen IL-22R α 1 mit dem GFP_{VHH} und 10 AS der ECD, die TMD und ICD des murinen IL-10R2 mit dem mCherry_{VHH} fusioniert wurden (**Abbildung 16A**, Sequenz siehe Anhang **Abbildung 68**). Beide SyCyRs wurden stabil in

Ba/F3/gp130-Zellen transduziert und die Expression mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen (**Abbildung 16B**).

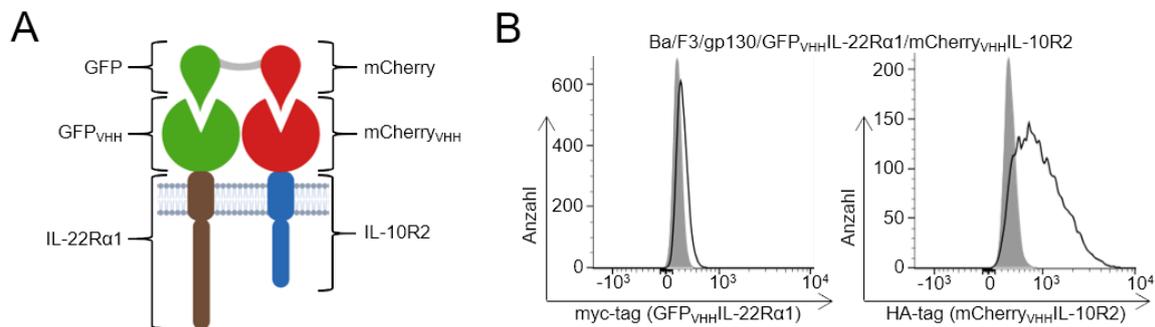


Abbildung 16: Simulation der IL-22 Signaltransduktion mittels synthetischer Rezeptoren. (A) Schematische Darstellung der Bindung von GFP-mCherry (grün, rot) an den GFP_{VHH}IL-22Rα1 (grün, braun) und den mCherry_{VHH}IL-10R2 (rot, blau). Die Abbildung wurde mit BioRender generiert. **(B)** Kontrolle der Co-Oberflächenexpression der SyCyRs GFP_{VHH}IL-22Rα1 (myc-tag) und mCherry_{VHH}IL-10R2 (HA-tag) (durchgezogene Linie) in Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2/ GFP_{VHH}IL-22Rα1-Zellen. Die graue Fläche zeigt Ba/F3/gp130-Zellen. Die Detektion erfolgte durch myc- oder HA-Antikörper. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Die Proliferationsanalyse zeigte, dass Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2/GFP_{VHH}IL-22Rα1, aber nicht Ba/F3/gp130 Zellen mit dem synthetischen Liganden GFP-mCherry proliferieren können. Bei dem hier verwendeten GFP-mCherry handelte es sich um CHO K1 Zellkulturüberstand, bei welchem die GFP-mCherry Proteinkonzentration mittels ELISA [9] quantifiziert wurde. Die Proliferation der SyCyR-Zellen konnte durch die Zugabe des P6 Inhibitors signifikant reduziert werden. Als Kontrolle wurden die Zellen auch mit monomeren GFP und mCherry inkubiert, was jedoch zu keiner Proliferation führte. Dimeres GFP-Fc war ebenfalls nicht in der Lage, die Proliferation der Zellen zu induzieren, während dies durch dimeres mCherry-Fc erreicht wurde. Die Proliferation mit mCherry-Fc konnte ebenfalls durch P6 signifikant inhibiert werden (**Abbildung 17A**). Die Proliferation durch mCherry_{VHH}IL-10R2 Homodimere wird in Abschnitt 3.2.1 weiter analysiert. Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2/GFP_{VHH}IL-22Rα1 Zellen zeigten eine halbmaximale Proliferation bei einer GFP-mCherry Konzentration von 5,5 ng/mL, während Ba/F3/gp130/IL-10R2/IL-22Rα1 Zellen mit GFP-mCherry nicht proliferierten (**Abbildung 17B**).

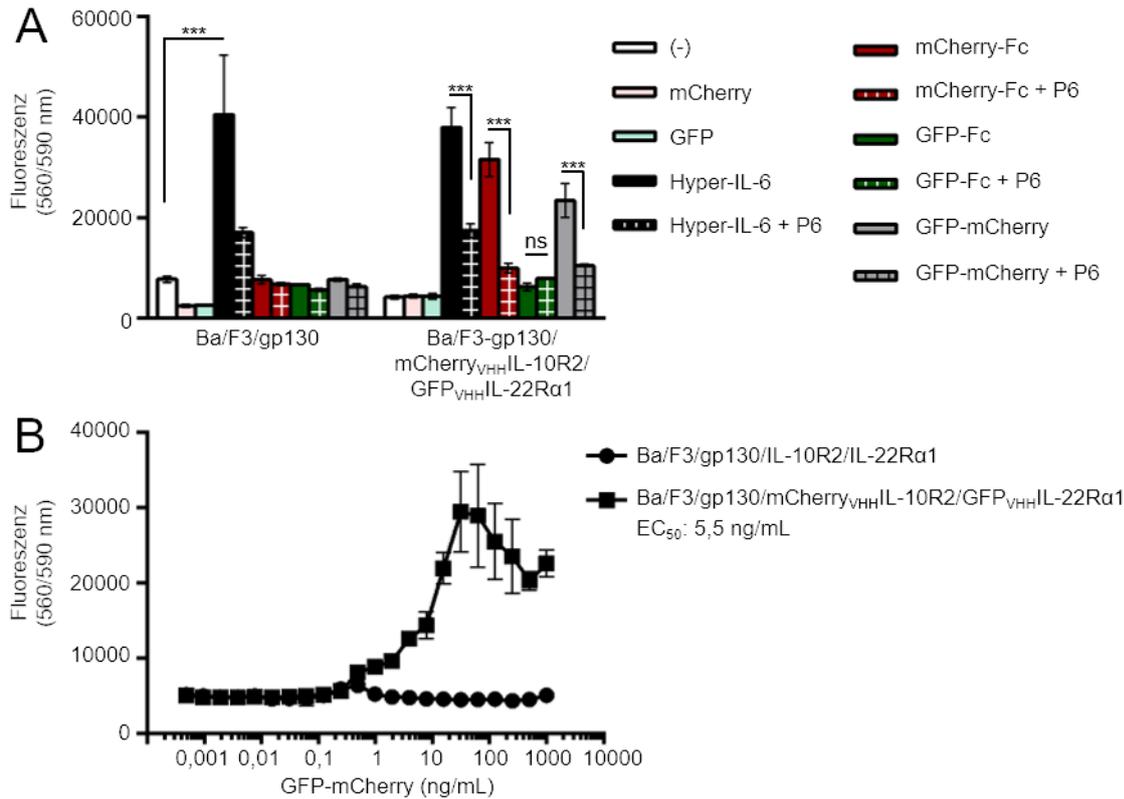


Abbildung 17: Proliferation der IL-22 SyCyR-Zellen. (A) Proliferation von Ba/F3/gp130 und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2/GFP_{VHH}IL-22Rα1 Zellen inkubiert ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder mit 100 ng/mL GFP, mCherry, GFP-Fc, mCherry-Fc, GFP-mCherry. 10 μM P6 Inhibitor wurden zu den gekennzeichneten Bedingungen gegeben. (B) Proliferation von Ba/F3/gp130/IL-10R2/IL-22Rα1 und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2/GFP_{VHH}IL-22Rα1 Zellen inkubiert mit steigenden Konzentrationen von 0,00025 – 1000 ng/mL GFP-mCherry. Dargestellt ist ein Experiment aus n=3 unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$). Die Berechnung der EC₅₀ erfolgte mittels nichtlinearer Regression. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Es zeigte sich, dass die Aktivierung der SyCyR-Zellen durch GFP-mCherry spezifisch ist, da eine Inkubation der wildtypischen Ba/F3/gp130/IL-10R2/IL-22Rα1 Zellen mit GFP-mCherry nicht zur Proliferation dieser führte.

Wie zuvor durch die Stimulation mit IL-22 gezeigt wurde, induzierte die Stimulation der SyCyR-Zellen mit GFP-mCherry ebenfalls eine Phosphorylierung von STAT3, ERK1/2, Jak1 und Tyk2. Entsprechend den Ergebnissen der Proliferation wurde nur durch die Stimulation mit mCherry-Fc und nicht durch GFP-Fc eine Phosphorylierung von STAT3, ERK1/2, Jak1, Tyk2 und zusätzlich Jak2 erreicht (**Abbildung 18**). Die Phosphorylierung von Jak1 und Tyk2 durch IL-10R2 Homodimere konnte bereits 1997 von Kotenko und Kollegen gezeigt werden, jedoch sahen diese keine Aktivierung von Jak2 [89]. P6 konnte auch bei den SyCyR-Zellen die Phosphorylierung von STAT3, ERK1/2 und Jak1, jedoch nicht die von Jak2 oder Tyk2 inhibieren. Dabei wurde hier eine Konzentration von 10 μM P6 gewählt. Es ist anzunehmen, dass die Phosphorylierung von Jak2 und Tyk2 mit höheren Konzentrationen von P6, wie

bereits für die wildtypischen Zellen gezeigt wurde, inhibiert werden könnte. Dies lässt darauf schließen, dass Jak1 die essenzielle Kinase für den IL-22 Signalweg ist, da die Inhibierung dieser bereits die Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 unterbindet.

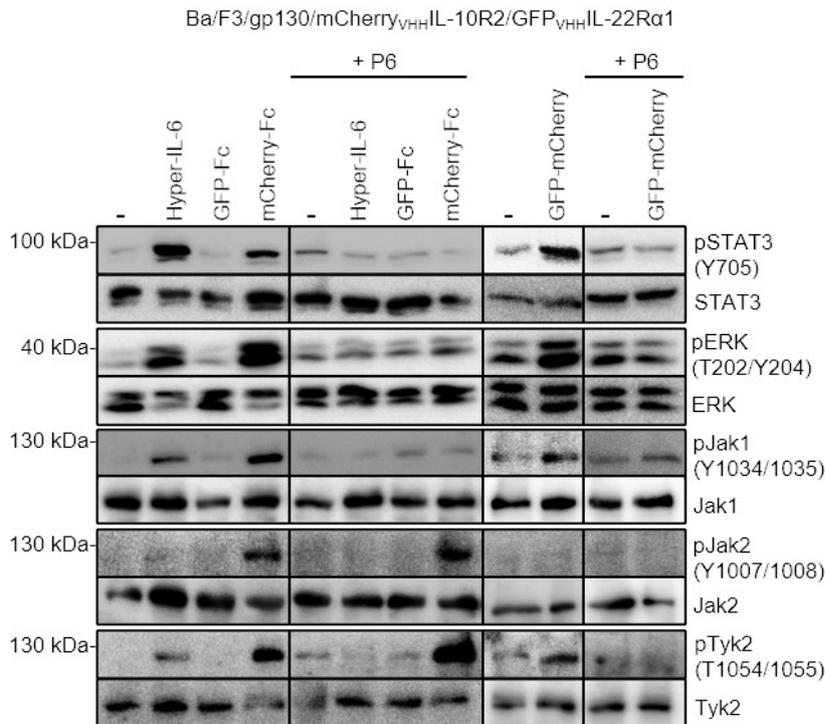


Abbildung 18: Analyse der intrazellulären Signaltransduktion mittels Western Blot. STAT3, ERK1/2, Jak1, Jak2 und Tyk2 Aktivierung in Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2/GFP_{VHH}IL-22Rα1 Zellen stimuliert mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL GFP-Fc, mCherry-Fc, GFP-mCherry für 120 min. Konditionen mit P6 Inhibitor wurden mit 10 µM Inhibitor 30 min vorinkubiert. Gleiche Mengen an Protein (50 µg pro Spur) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3, ERK1/2, Jak1, Jak2, Tyk2 und pSTAT3, pERK1/2, pJak1, pJak2, pTyk2 analysiert. Vertikale Linien stellen verschiedene Membranen dar, wobei die Detektion der Proben mit und ohne P6 Inhibitor auf einer Membran erfolgten. Dargestellt ist ein Experiment aus n=3 unabhängigen Experimenten. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Anschließend wurde eine mRNA Expressionsanalyse per Gene-Array für Ba/F3/gp130/IL-10R2/IL-22Rα1 Zellen, welche mit IL-22, und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2/GFP_{VHH}IL-22Rα1 Zellen, welche mit GFP-mCherry stimuliert wurden, durchgeführt. Die Durchführung des Microarray erfolgte in Kooperation mit dem deutschen Diabetes-Zentrum (DDZ) und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Al-Hasani. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der Transcriptome Analysis Console (TAC) Software von ThermoFischer Scientific (Waltham, USA) mit einem Fold-Change von 1,5 (**Abbildung 19A**). Es zeigte sich eine hohe Übereinstimmung der Genregulation von 97,4 % der analysierten Gene. 1,58 % der Gene der SyCyR Zellen waren anders hochreguliert (rot) und 1,02 % waren anders herunter reguliert (blau) (**Abbildung 19B**).

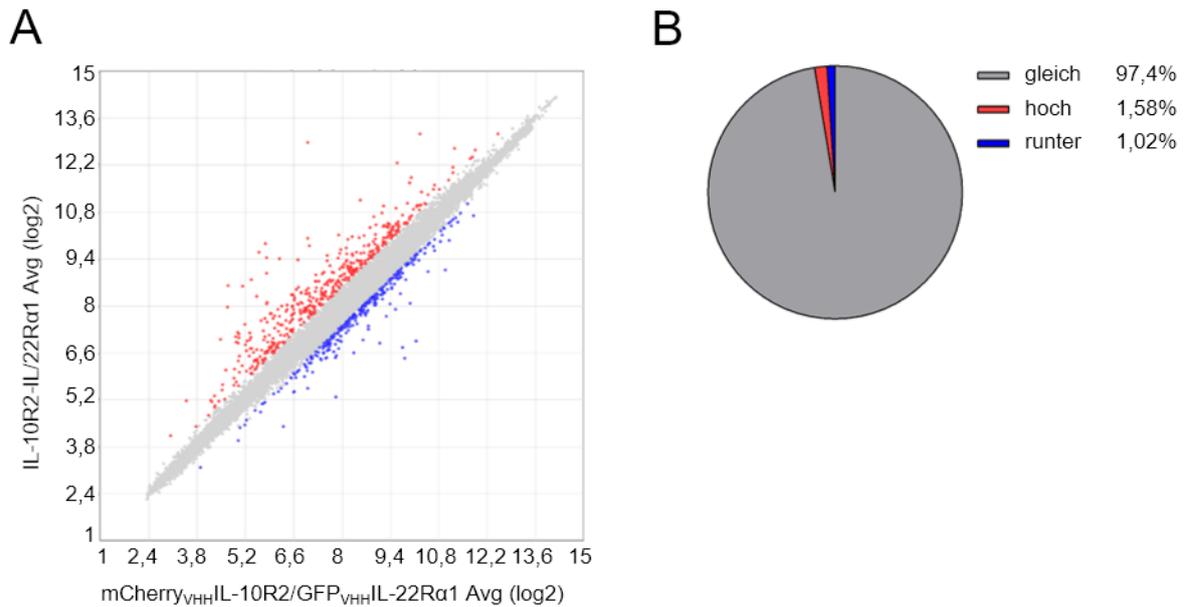


Abbildung 19: Microarrayanalyse von Ba/F3/gp130-Zellen, welche entweder die wildtypischen oder die synthetischen IL-10R2 und IL-22Rα1 exprimierten. (A) Scatter Blot zum Vergleich der mRNA Mengen von Ba/F3/gp130/IL-10R2/IL-22Rα1 und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2/GFP_{VHH}IL-22Rα1 Zellen stimuliert mit entweder 100 ng/mL IL-22 oder GFP-mCherry. Der Vergleich wurde mit einem 1,5 Fold-change durchgeführt. **(B)** Kreisdiagramm aller regulierter Gene: gleich regulierte Gene sind in grau gezeigt, hoch regulierte Gene rot und runter regulierte Gene blau. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Unter den gleich regulierten Genen waren typische STAT3 Zielgene, wie z.B. *Pim-1*, *myc* und *IL-6*. Die mRNA Mengen dieser Gene wurden über eine quantitative PCR (qPCR) verifiziert (**Abbildung 20**). Hierbei wurde dieselbe RNA verwendet, welche bereits per Microarray analysiert wurde.

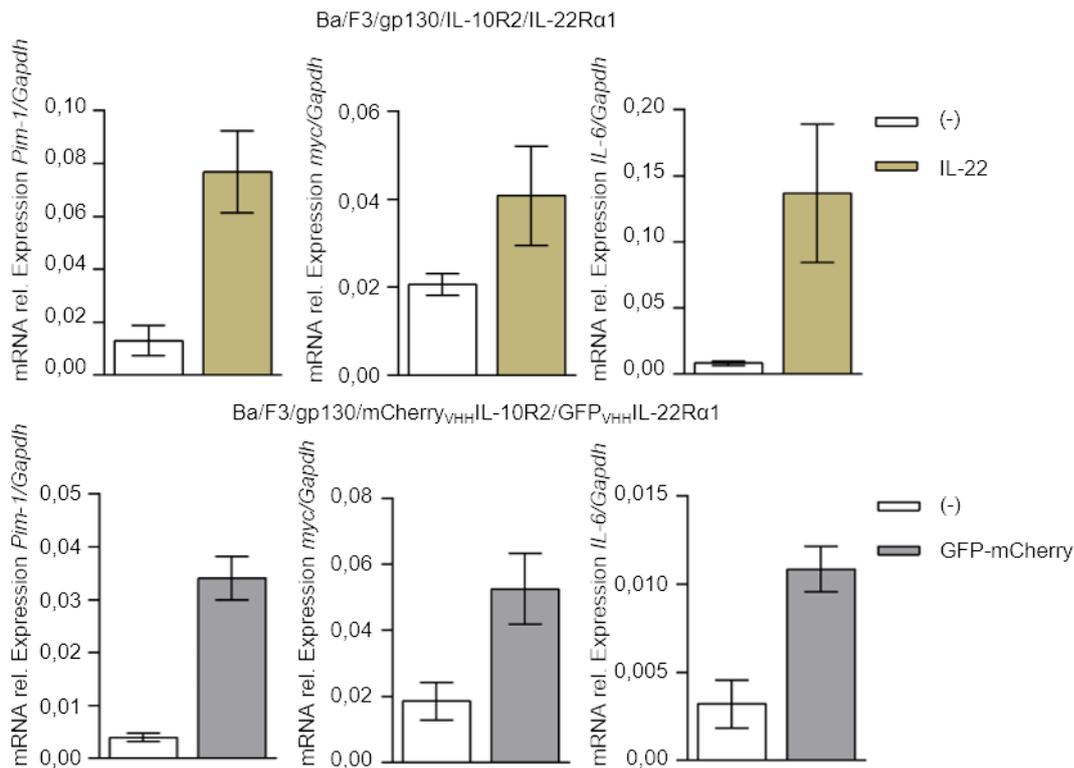


Abbildung 20: Verifizierung der Mikroarray Daten per qPCR Quantifizierung. mRNA Expression von *Pim-1*, *myc* und *IL-6* in Ba/F3/gp130/IL-10R2/IL-22Rα1 und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2/GFP_{VHH}IL-22Rα1 Zellen. Die Zellen wurden je 120 min mit 100 ng/mL IL-22-Fc oder GFP-mCherry stimuliert. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Insgesamt wirkte die durch IL-22 induzierte Genexpression stärker im Vergleich zu der durch GFP-mCherry induzierten Expression der SyCyR Zellen. Zusammenfassend zeigen die Daten jedoch, dass die durch IL-22 induzierte, wildtypische und die durch GFP-mCherry induzierte, synthetische Signaltransduktion in hohem Maße übereinstimmt. Es kann also gesagt werden, dass sich das SyCyR-System für die Analyse der IL-22 Signaltransduktion gut eignet und die IL-22 Signaltransduktion kopiert werden konnte. Im Folgenden wurde nun die homodimere Aktivierung des IL-10R2 und IL-22Rα1 weiter analysiert.

3.2.1 Homodimere Signaltransduktion des IL-22Rα1 und IL-10R2

Mittels der SyCyR-Technologie können Rezeptoren dimerisiert werden, welche dies auf natürlichem Wege, soweit bekannt, nicht können. Dies wurde mit den beiden Rezeptoren der IL-22 Signaltransduktion GFP_{VHH}IL-22Rα1 und mCherry_{VHH}IL-10R2 gemacht. Zunächst wurde die Homodimerisierung des GFP_{VHH}IL-22Rα1 mittels GFP-Fc in Ba/F3/gp130-Zellen analysiert, welche nur den GFP_{VHH}IL-22Rα1 exprimierten (**Abbildung 21A, B**).

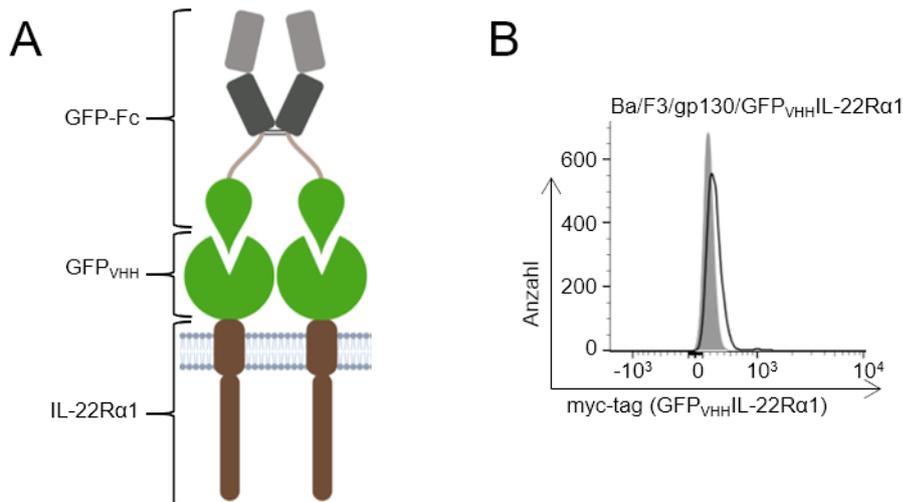


Abbildung 21: Dimerisierung des IL-22R α 1-SyCyRs durch GFP-Fc. (A) Schematische Darstellung der Bindung von GFP-Fc an den GFP_{VHH}IL-22R α 1. Die Abbildung wurde mit BioRender generiert. (B) Kontrolle der Co-Oberflächenexpression des GFP_{VHH}IL-22R α 1-SyCyRs (myc-tag) (durchgezogene Linie) in Ba/F3/gp130 GFP_{VHH}IL-22R α 1-Zellen. Die graue Fläche zeigt Ba/F3/gp130-Zellen. Die Detektion erfolgte durch einen myc-Antikörper. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Hier zeigte sich, dass dimeres GFP-Fc nicht dazu in der Lage war, Proliferation bei Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}IL-22R α 1 Zellen zu induzieren (**Abbildung 22A**). Weiter wurde die Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 nach einer Stimulation mit monomerem GFP und dimerem GFP-Fc analysiert (**Abbildung 22B**). Weiterhin wurde analysiert, ob der synthetische Ligand GFP-Fc an den Rezeptor bindet oder ob eine fehlende Bindung der Grund für die ausbleibende Aktivierung des Rezeptors ist (**Abbildung 22C**).

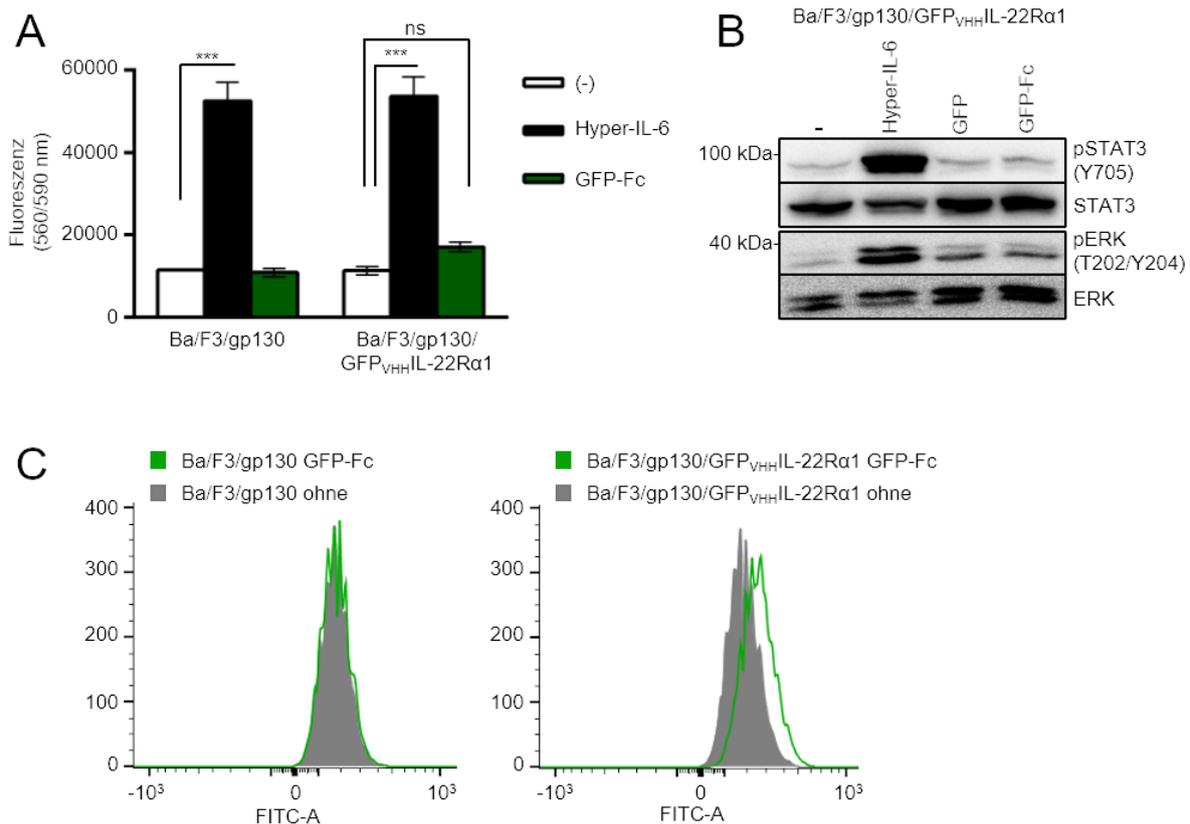


Abbildung 22: Aktivität des IL-22Rα1-SyCyR Homodimers. (A) Proliferation von Ba/F3/gp130 und Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}IL-22Rα1 Zellen ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder mit 100 ng/mL GFP-Fc. (B) STAT3 und ERK1/2 Aktivierung in Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}IL-22Rα1 Zellen, welche ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL GFP, GFP-Fc für 120 min stimuliert wurden. Gleiche Mengen an Protein (50 µg pro Spur) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3, ERK1/2 und pSTAT3, pERK1/2 analysiert. (C) Analyse der Bindung von GFP-Fc an Ba/F3/gp130 und Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}IL-22Rα1 Zellen. Die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C mit 5 µg/mL GFP-Fc inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Bindung wurde dann per Durchflusszytometrie im FITC-A Kanal analysiert. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$). Diese Forschung wurde ursprünglich in der *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Die Analyse des Western Blots zeigte, dass der GFP_{VHH}IL-22Rα1-SyCyR keinen aktiven Homodimer bildet. Als Kontrolle wurde hierbei die Proliferation der Zellen mit Hyper-IL-6 und die Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 der Zellen nach Stimulation mit Hyper-IL-6 betrachtet. Die Analyse der Bindung des Liganden an den Rezeptor zeigte jedoch, dass GFP-Fc spezifisch an den GFP_{VHH}IL-22Rα1 bindet. Dass der IL-22Rα1 nicht in der Lage ist, aktive Homodimere zu bilden, war überraschend, da es sich hierbei um einen Zytokinrezeptor mit einer sehr langen intrazellulären Domäne von 346 AS handelt und dieser neben Jak1 Bindestellen auch verschiedene Bindestellen für andere Signaltransduktionsmoleküle wie z.B. STATs aufweist.

Anschließend wurde die homodimere Signaltransduktion des mCherry_{VHH}IL-10R2 mittels mCherry-Fc in Ba/F3/gp130-Zellen analysiert, welche nur den mCherry_{VHH}IL-10R2 exprimieren (Abbildung 23A, B).

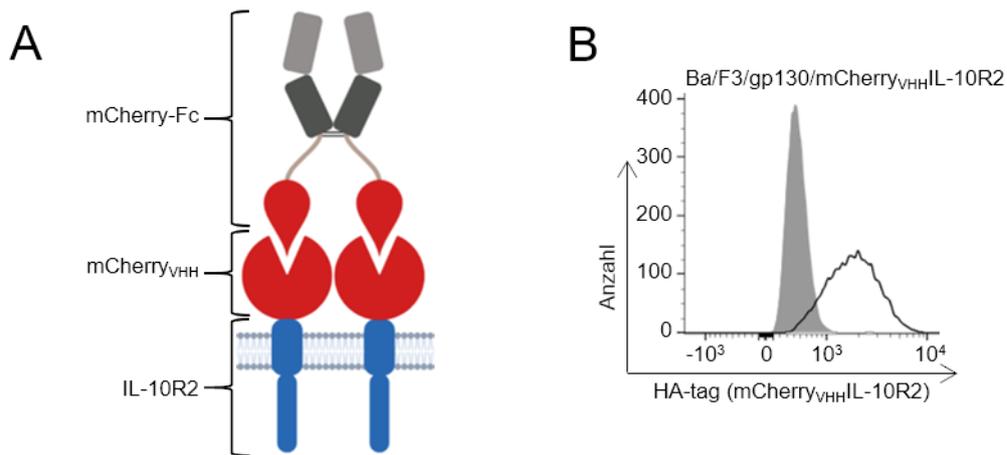


Abbildung 23: Dimerisierung des IL-10R2 mittels mCherry-Fc. (A) Schematische Darstellung der Bindung von mCherry-Fc an den mCherry_{VHH}IL-10R2-SyCyR. Die Abbildung wurde mit BioRender generiert. (B) Kontrolle der Oberflächenexpression von mCherry_{VHH}IL-10R2 (HA-tag) (durchgezogene Linie) in Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2-Zellen. Die graue Fläche zeigt Ba/F3/gp130-Zellen. Die Detektion erfolgte durch einen HA-Antikörper. Diese Forschung wurde ursprünglich in *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Wie bereits in Abschnitt 3.2 für Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2/GFP_{VHH}IL-22Rα1 Zellen gezeigt, proliferierten auch die einzeln transfizierten Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2 Zellen mit mCherry-Fc. Die Proliferation war in hohem Maße vergleichbar mit der durch Hyper-IL-6 induzierten Proliferation durch gp130. In beiden Fällen konnte durch die Zugabe des P6 Inhibitors die Proliferation blockiert werden (**Abbildung 24A**). Dabei wiesen die Zellen eine etwas höhere EC₅₀ von 41,74 ng/mL für mCherry-Fc auf im Vergleich zu einer EC₅₀ von 5,5 ng/mL bei einer Stimulation mit GFP-mCherry als Heterodimer in Kombination mit dem GFP_{VHH}IL-22Rα1 (**Abbildung 24B**).

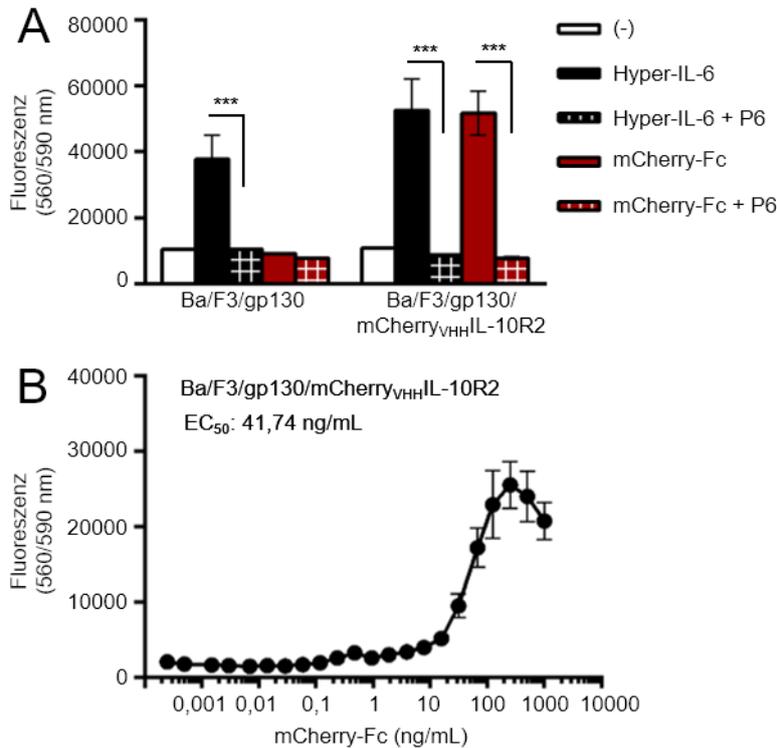


Abbildung 24: Aktivierung des mCherry_{VHH}IL-10R2 Homodimers. (A) Proliferation von Ba/F3/gp130 und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2 Zellen ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL mCherry-Fc. 10 μ M P6 Inhibitor wurden zu den gekennzeichneten Bedingungen gegeben. (B) Proliferation von Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2 Zellen mit steigenden Konzentrationen von 0,00025 – 1000 ng/mL mCherry-Fc. Dargestellt ist ein Experiment aus n=3 unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$). Die Berechnung der EC₅₀ erfolgte mittels nichtlinearer Regression. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Eine Stimulation der Zellen mit mCherry-Fc zeigte, wie auch in Abschnitt 3.2 für Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2/GFP_{VHH}IL-22R α 1 Zellen dargestellt, eine Phosphorylierung von STAT3, ERK1/2, Jak1, Jak2 und Tyk2. Als Kontrolle wurde die Phosphorylierung nach einer Stimulation der Zellen mit Hyper-IL-6 analysiert, welche bei pSTAT3 und pERK1/2 etwas intensivere Banden aufwies (**Abbildung 25**). Die Signaltransduktion wurde durch die Zugabe von 10 μ M P6 inhibiert, wobei der Inhibitor auch hier keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Jak2 und Tyk2 hatte. Weiterhin wurden die Zellen auch je mit 1 und 100 μ M P6 vorinkubiert und anschließend stimuliert. Es zeigte sich, dass eine Inkubation mit 100 μ M P6 die Phosphorylierung von Jak2 und Tyk2 inhibieren konnte. Die Signaltransduktion schien ausschließlich durch die Homodimerisierung des IL-10R2 aktiviert zu werden. Eine Stimulation mit monomerem mCherry zeigte keinerlei Effekt.

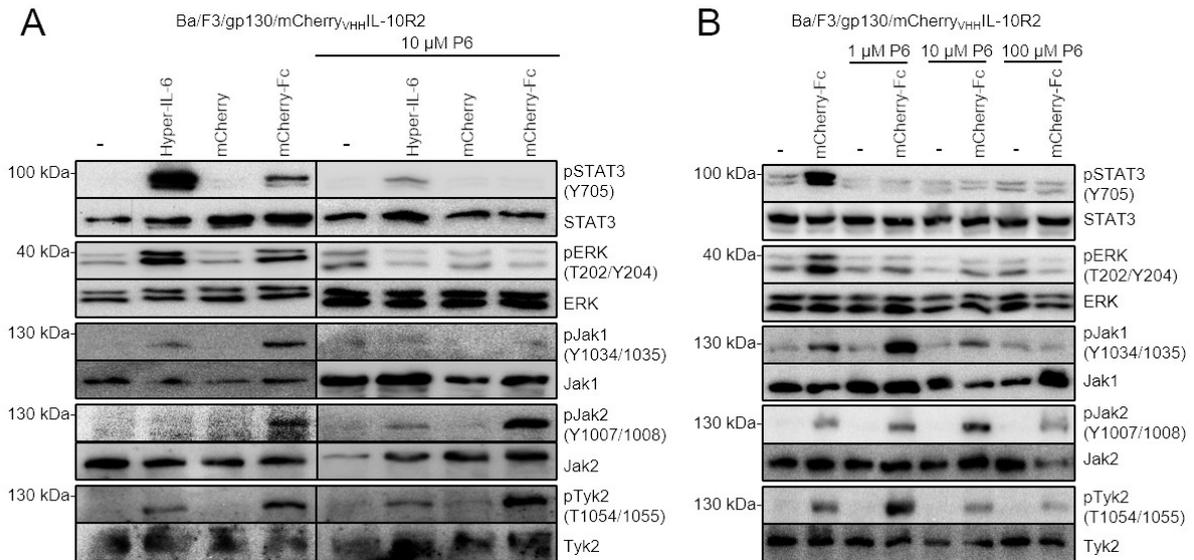


Abbildung 25: Analyse der Signaltransduktion mittels Western Blot. (A) STAT3, ERK1/2, Jak1, Jak2 und Tyk2 Aktivierung in Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2 Zellen stimuliert mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL mCherry, mCherry-Fc für 120 min. Konditionen mit P6 Inhibitor wurden mit 10 μM Inhibitor 30 min vorinkubiert. Gleiche Mengen an Protein (50 μg pro Spur) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3, ERK1/2, Jak1, Jak2, Tyk2 und pSTAT3, pERK1/2, pJak1, pJak2, pTyk2 analysiert. (B) STAT3, ERK1/2, Jak1, Jak2 und Tyk2 Aktivierung in Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2 Zellen stimuliert für 120 min mit 100 ng/mL mCherry-Fc. Konditionen mit P6 Inhibitor wurden mit 1, 10 oder 100 μM P6 je 30 min vorinkubiert. Gleiche Mengen an Protein (50 μg pro Spur) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3, ERK1/2, Jak1, Jak2, Tyk2 und pSTAT3, pERK1/2, pJak1, pJak2, pTyk2 analysiert. Vertikale Linien stellen die zugeschnittene Membran dar, wobei die Detektion aller Proben auf einer Membran erfolgte. Dargestellt ist ein Experiment aus n=3 unabhängigen Experimenten. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Die Interaktion der intrazellulären Domäne des IL-10R2 mit den Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 wurde anhand einer Co-Immunpräzipitation weiter analysiert. Hierbei wurden HEK293T Zellen transient nur mit der cDNA kodierend für den GFP_{VHH}IL-10R2 oder zusätzlich auch je mit der cDNA kodierend für die Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 transfiziert. Die Zelllysate wurden über Nacht mit einem Antikörper gegen die jeweilige Kinase inkubiert und dann über die Bindung des Antikörpers an Protein-A-Agarosebeads präzipitiert. Eine Detektion im Western Blot erfolgte per myc-Antikörper, welcher den myc-tag des GFP_{VHH} bindet (siehe **Abbildung 26**).

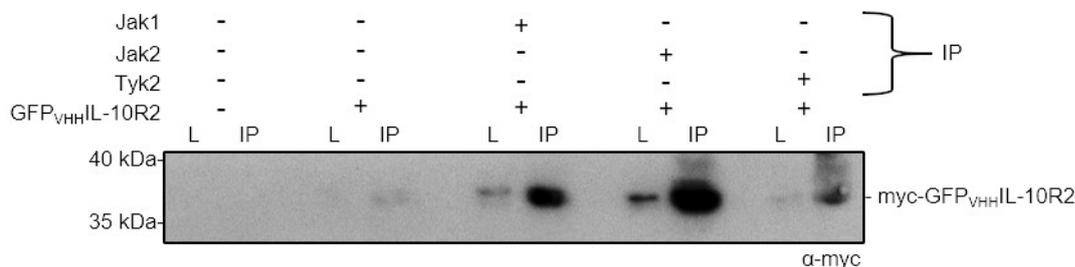


Abbildung 26: Co-Immunpräzipitation des IL-10R2-SyCyRs und der Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2. HEK293T Zellen wurden mit der cDNA kodierend für GFP_{VHH}IL-10R2, GFP_{VHH}IL-10R2 und murines Jak1, GFP_{VHH}IL-10R2 und murines Jak2 oder GFP_{VHH}IL-10R2 und murines Tyk2 transfiziert. Die Kinasen wurden immunpräzipitiert und der GFP_{VHH}IL-10R2 wurde per Western Blot mit einem myc-Antikörper nachgewiesen. L: Lysat, IP: Co-Immunpräzipitation. Dargestellt in ein Experiment aus n=3 unabhängigen Experimente. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Die Co-Immunpräzipitation zeigt, dass nicht nur Tyk2, sondern auch Jak1 und Jak2 an den IL-10R2 binden.

Zudem wurde die Genexpression von Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2/GFP_{VHH}IL-22R α 1 Zellen per Microarray analysiert, welche zum einen als Heterodimer mit GFP-mCherry und zum anderen als IL-10R2 Homodimer mit mCherry-Fc stimuliert wurden. Die Durchführung des Microarray erfolgte erneut im Deutschen Diabetes-Zentrum in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Al-Hasani. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der Transcriptome Analysis Console (TAC) Software mit einem Fold-Change von 1,5. Dabei zeigte sich eine sehr hohe Übereinstimmung der transkribierten mRNAs zwischen der Stimulation als Hetero- und Homodimer (**Abbildung 27A**). Auch der einzelne Vergleich nicht stimulierter Zellen zu einer Stimulation als Heterodimer (**Abbildung 27B**) und nicht stimulierter Zellen zu einer Stimulation als Homodimer (**Abbildung 27C**) zeigte, dass die Intensität der Stimulationen vergleichbar ist. Unter den gleichregulierten Genen waren typische STAT3 Zielgene wie *Pim-1*, *myc* und *IL-6*, dessen mRNA Mengen zusätzlich in einer quantitativen PCR analysiert wurden (**Abbildung 27D**). Die qPCR Ergebnisse der heterodimeren Stimulation mit GFP-mCherry wurden bereits in **Abbildung 20** gezeigt.

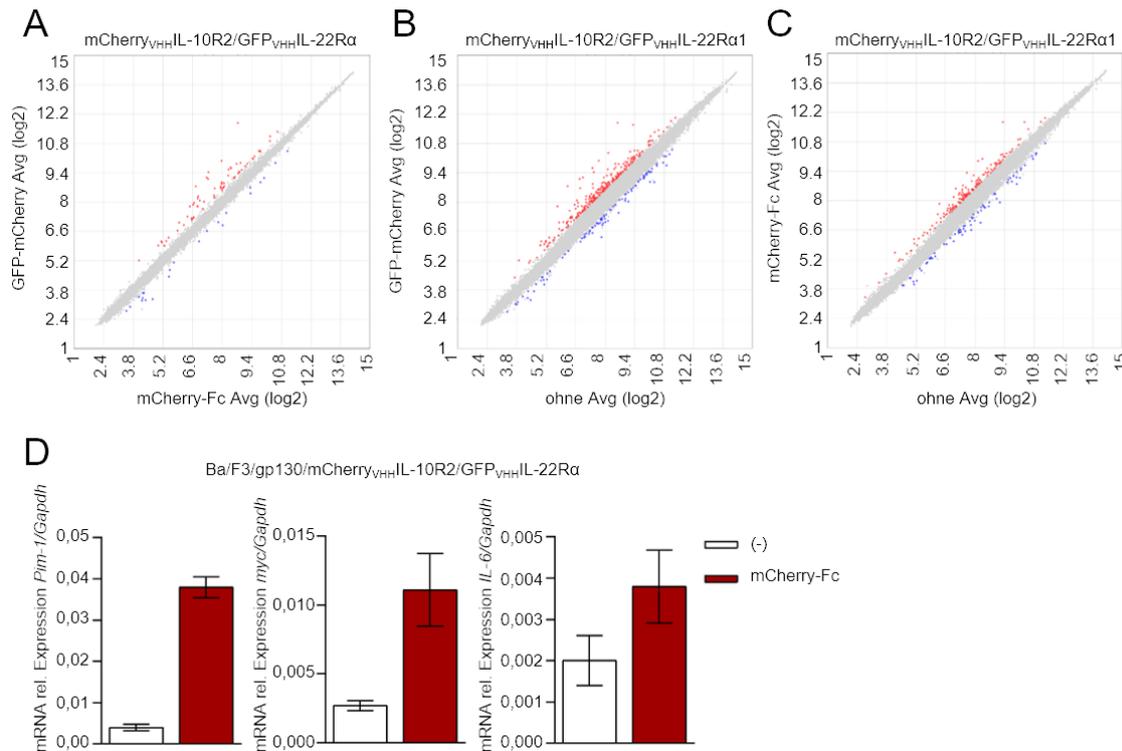


Abbildung 27: Microarrayanalyse von Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2/GFP_{VHH}IL-22Rα1 Zellen, welche entweder als Heterodimer mit GFP-mCherry oder als Homodimer mit mCherry-Fc stimuliert wurden. (A) Scatter Blot zum Vergleich der mRNA Mengen von Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2/GFP_{VHH}IL-22Rα1 Zellen stimuliert mit 100 ng/mL GFP-mCherry oder mCherry-Fc. Der Vergleich wurde mit einem Fold-change von 1,5 durchgeführt. Anders hoch regulierte Gene sind in Rot, herunter regulierte Gene in Blau dargestellt. **(B)** Scatter Blot zum Vergleich der mRNA Mengen von unstimulierten Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2/GFP_{VHH}IL-22Rα1 Zellen und Zellen, welche mit 100 ng/mL GFP-mCherry stimuliert wurden. Der Vergleich wurde mit einem Fold-change von 1,5 durchgeführt. Anders hoch regulierte Gene sind in Rot, runterregulierte Gene in blau dargestellt. **(C)** Scatter Blot zum Vergleich der mRNA Mengen von unstimulierten Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2/GFP_{VHH}IL-22Rα1 Zellen und Zellen, welche mit 100 ng/mL GFP-mCherry stimuliert wurden. Der Vergleich wurde mit einem Fold-change von 1,5 durchgeführt. Anders hoch regulierte Gene sind in Rot, runterregulierte Gene in blau dargestellt. **(D)** Verifizierung der Mikroarraydaten per qPCR Quantifizierung. mRNA Expression von *Pim-1*, *myc* und *IL-6* in Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2/GFP_{VHH}IL-22Rα1 Zellen, welche je 120 Minuten mit 100 ng/mL GFP-mCherry oder mCherry-Fc stimuliert wurden. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 unabhängigen Experimenten. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Die Übereinstimmung des Transkriptoms zwischen hetero- und homodimerer Stimulation verdeutlichen, dass der IL-10R2 in der Lage ist, einen aktiven Homodimer auszubilden, welcher nahezu dieselbe Signaltransduktion induziert, wie der IL-22 Heterodimer. Im Folgenden wurde daher die intrazelluläre Domäne des IL-10R2 genauer betrachtet, um etwaige Bindestellen für Signaltransduktionsmoleküle zu identifizieren.

3.2.2 Analyse der IL-10R2 ICD zur Identifizierung von möglichen Bindemotiven

Beim IL-10R2 handelt es sich um einen Zytokinrezeptor mit einer kurzen intrazellulären Domäne von 352 AS. Diese weist keine klaren Januskinase Bindestellen, wie Box1 oder Box2 Motive und auch keine kanonischen Tyrosin-abhängigen Phosphorylierungsmotive auf. Das einzige intrazelluläre Tyrosin an Position 251 liegt direkt hinter der TMD und ist nicht Teil eines STAT3 oder ERK1/2 Bindemotivs. Zur Eingrenzung des für die Signaltransduktion relevanten

Bereichs wurden zunächst Deletionsvarianten mittels PCR erstellt. Diese IL-10R2-Varianten wurden nach der AS 255 ($\Delta 255$), 280 ($\Delta 280$), 310 ($\Delta 310$) und 330 ($\Delta 330$) deletiert (**Abbildung 28A**). Die intrazellulär deletierten IL-10R2-Varianten wurden mit einem mCherry_{VHH} als extrazelluläre Domäne fusioniert (**Abbildung 28B**, Sequenz siehe Anhang **Abbildung 69**) und stabil in Ba/F3/gp130-Zellen transduziert (**Abbildung 28C**).

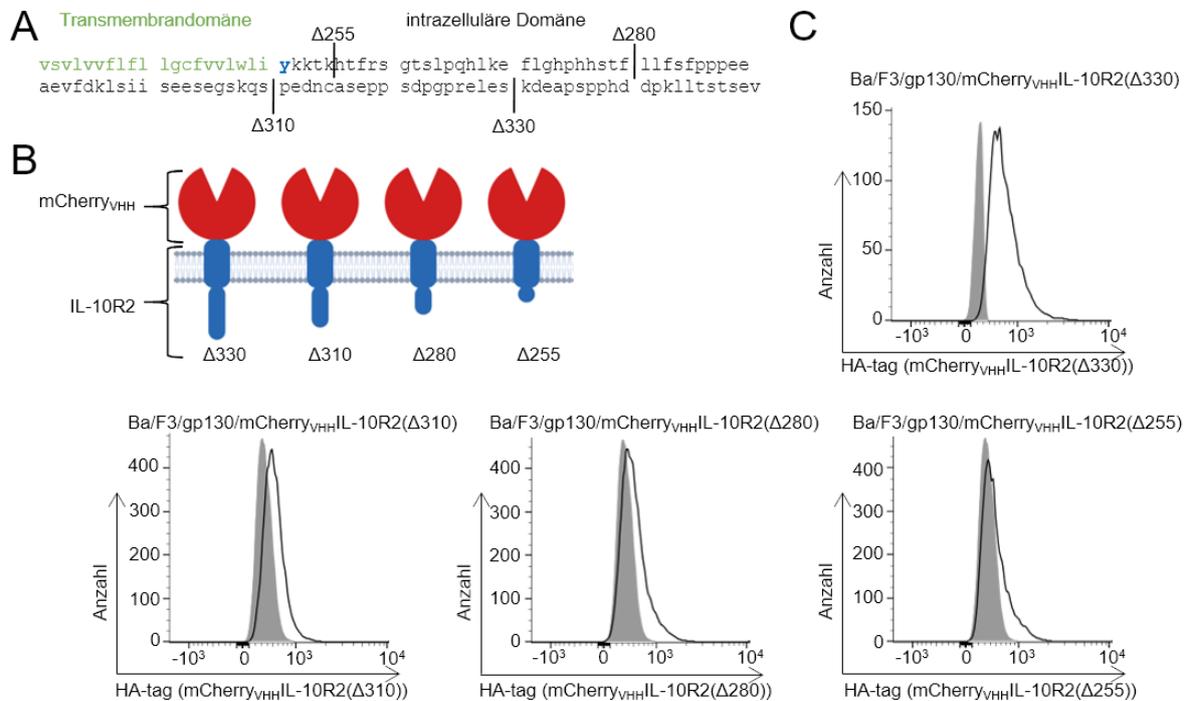


Abbildung 28: Sequenzielle Deletion der ICD des IL-10R2. (A) Sequenz der TMD (grün) und ICD (schwarz) des IL-10R2. Eingezeichnet sind die Stellen, an welchen die jeweilige Deletion erfolgte. (B) Eine schematische Darstellung zeigt die Fusionsproteine aus mCherry_{VHH} und den deletierten IL-10R2-Varianten. Abbildung wurde mit BioRender generiert. (C) Kontrolle der Oberflächenexpression von mCherry_{VHH}IL-10R2-Deletionsvarianten (HA-tag) (durchgezogene Linie) in Ba/F3/gp130-Zellen. Die graue Fläche zeigt die Ursprungszelllinie Ba/F3/gp130. Die Detektion erfolgte durch einen HA-Antikörper. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Zunächst wurde die Proliferation der Zellen mit mCherry-Fc im Vergleich zu der durch Hyper-IL-6 induzierten Proliferation durch gp130 analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Zellen, welche die längste Deletionsvariante ($\Delta 330$) exprimieren, ähnlich proliferierten, wie die SyCyR-WT Zellen, welche den vollständigen mCherry_{VHH}IL-10R2-SyCyR exprimierten. Die Proliferation der Varianten $\Delta 310$, $\Delta 280$ und $\Delta 255$ mit mCherry-Fc zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zu der gemessenen Proliferation ohne Zytokin (**Abbildung 29A**). Im konzentrationsabhängigen Proliferationsassay wurde deutlich, dass der vollständige mCherry_{VHH}IL-10R2-SyCyR und die mCherry_{VHH}IL-10R2($\Delta 330$) Deletionsvariante eine ähnliche EC₅₀ von 51,42 ng/mL und 54,78 ng/mL für die Stimulation mit mCherry-Fc haben. Die mCherry_{VHH}IL-10R2($\Delta 310$) Deletionsvariante proliferierte ebenfalls mit mCherry-Fc, jedoch erst mit deutlich höheren Konzentrationen ab ca. 300 ng/mL (**Abbildung 29B**). Dabei

lässt sich für die mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ 310) Deletionsvariante eine EC₅₀ von ca. 1 μ g/mL abschätzen.

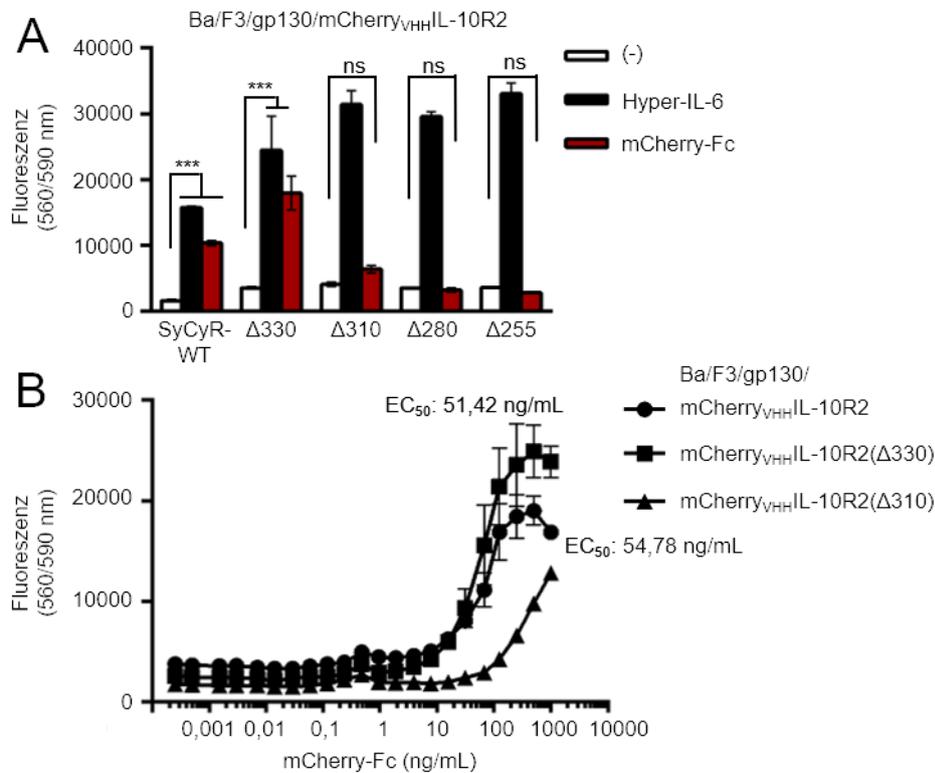


Abbildung 29: Aktivierung der deletierten mCherry_{VHH}IL10R2-Varianten als Homodimer. (A) Proliferation von Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2 (SyCyR-WT), Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ 330), Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ 310), Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ 280) und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ 255) Zellen ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL mCherry-Fc. **(B)** Proliferation von Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2, Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ 330) und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ 310) Zellen mit steigenden Konzentrationen von 0,00025 – 1000 ng/mL mCherry-Fc. Dargestellt ist ein Experiment aus n=3 unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$). Die Berechnung der EC₅₀ erfolgte mittels nichtlinearer Regression. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Auch eine Analyse der mRNA-Mengen des STAT3 responsiven Gens *Pim-1* zeigte, dass die Stimulation der mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ 330) Deletionsvariante mit mCherry-Fc eine Expression von *Pim-1* bewirkte. Allerdings war dies bei einer Stimulation der mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ 310) Deletionsvariante mit mCherry-Fc nicht mehr der Fall (**Abbildung 30**).

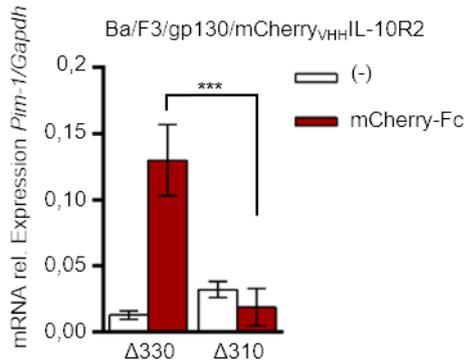


Abbildung 30: Quantifizierung der mRNA Menge von *Pim-1*. Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ330) und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ310) Zellen wurden für 120 min ohne Zytokin oder mit 100 ng/mL mCherry-Fc inkubiert und die mRNA Mengen des STAT3-responsiven Gens *Pim-1* analysiert. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$). Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Weiterhin wurde auch die Phosphorylierung von STAT3, ERK1/2, Jak1, Jak2 und Tyk2 nach einer Stimulation der Deletionsvarianten mit mCherry-Fc analysiert. Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ330) Zellen zeigten auch hier die gleiche Phosphorylierung von STAT3, ERK1/2, Jak1, Jak2 und Tyk2, wie Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2 (SyCyR-WT) Zellen. Interessanter Weise zeigten auch Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ310) Zellen eine schwache Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 sowie eine Aktivierung der Januskinasen. Hierbei war die Menge an pJak1 jedoch geringer als bei der Stimulation von Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ330) oder Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2 Zellen, was die schwächere Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 erklären könnte. Eine Stimulation der Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ280) und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ255) Zellen führte zu keiner Aktivierung der Signaltransduktion, da keine Januskinasen phosphoryliert wurden (**Abbildung 31**).

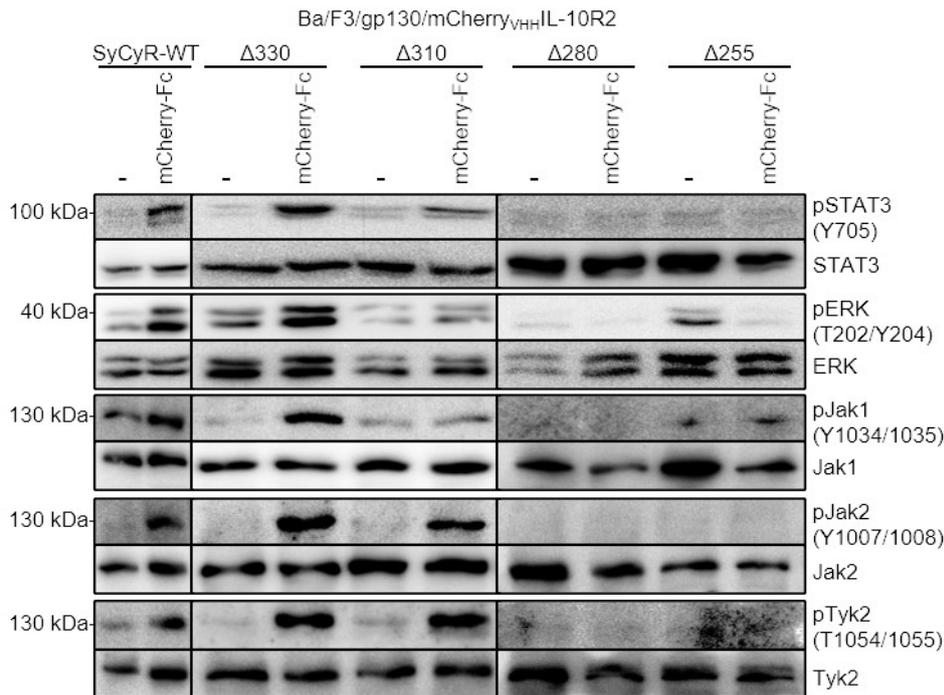


Abbildung 31: Analyse der Signaltransduktion mittels Western Blot. STAT3, ERK1/2, Jak1, Jak2 und Tyk2 Aktivierung in Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2 (SyCyR-WT), Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ330), Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ310), Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ280) und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ255) Zellen stimuliert mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL mCherry-Fc für 120 min. Gleiche Mengen an Protein (50 µg pro Spur) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3, ERK1/2, Jak1, Jak2, Tyk2 und pSTAT3, pERK1/2, pJak1, pJak2, pTyk2 analysiert. Vertikale Linien stellen verschiedene Membranen dar. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten. Diese Forschung wurde ursprünglich in der *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Die Ergebnisse des Western Blots deuten darauf hin, dass die Aminosäuren des Bereiches 310 – 300 für die Signaltransduktion des IL-10R2 Homodimers notwendig sind. Dabei zeigte sich nur eine reduzierte Phosphorylierung der Januskinasen im Vergleich der mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ330) zur mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ310) Deletionsvariante. Erst eine weitere Deletion des mCherry_{VHH}IL-10R2 resultierte im vollständigen Verlust der Kinasephosphorylierung. Die Bindestellen der Kinasen können daher im Bereich 280 – 310 der intrazellulären Domäne des IL-10R2 vermutet werden.

Eine genaue Betrachtung des Bereichs 310 – 330 der intrazellulären Domäne des IL-10R2 zeigte ein potenzielles SH3-Bindemotiv PSDP an Position 320-323 (**Abbildung 32A**). Um die Relevanz dieses Motivs für die Signaltransduktion zu analysieren, wurden die Proline 320 und 323 zu Alaninen mutiert. Das Motiv wurde sowohl im vollständigen als auch in der mCherry_{VHH}IL-10R2(Δ330) Deletionsvariante mutiert (**Abbildung 32B**, Sequenz siehe Anhang **Abbildung 70**). Die mutierten SyCyRs wurden stabil in Ba/F3/gp130-Zellen exprimiert und mit mCherry-Fc als Homodimere aktiviert (**Abbildung 32C**).

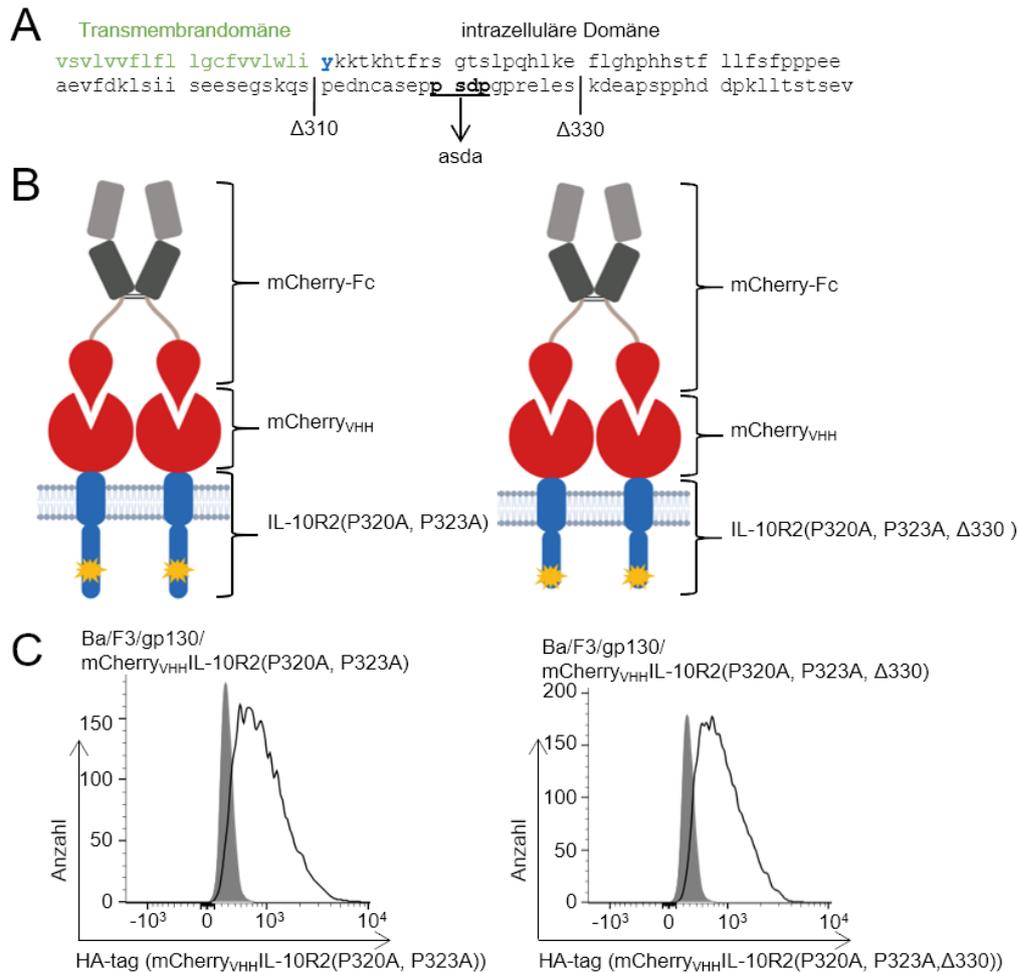


Abbildung 32: Mutation des putativen SH3-Bindemotivs PSDP zu ASDA. (A) Sequenz der TMD (grün) und ICD (schwarz) des IL-10R2. Eingezeichnet sind die Stellen, an welchen die Deletionen Δ310 und Δ330 erfolgten. Unterstrichen ist die PSDP Sequenz, welche zu ASDA mutiert wurde. (B) Die schematische Darstellung zeigt die Bindung von mCherry-Fc an die mutierten Rezeptoren mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A) und mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A, Δ330). Die Abbildung wurde mit BioRender generiert. (C) Kontrolle der Oberflächenexpression der mutierten SyCyRs (HA-tag) (durchgezogene Linie) in Ba/F3/gp130-Zellen. Die graue Fläche zeigt die Ausgangs-Ba/F3/gp130-Zellen. Die Detektion erfolgte durch einen HA-Antikörper. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Die Proliferation der Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A) und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A, Δ330) Zellen wurde durch mCherry-Fc weiterhin induziert, jedoch deutlich schwächer im Vergleich zur Proliferation der Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2 Zellen (**Abbildung 33A**). Dies zeigte sich auch bei den EC₅₀ Werten von 71,2 ng/mL für Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A) und 73,2 ng/mL für Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A, Δ330) Zellen, welche etwas niedriger waren als bei einer Inkubation der Zellen ohne Mutation mit mCherry-Fc (EC₅₀: 41,74 ng/mL) (**Abbildung 33B**).

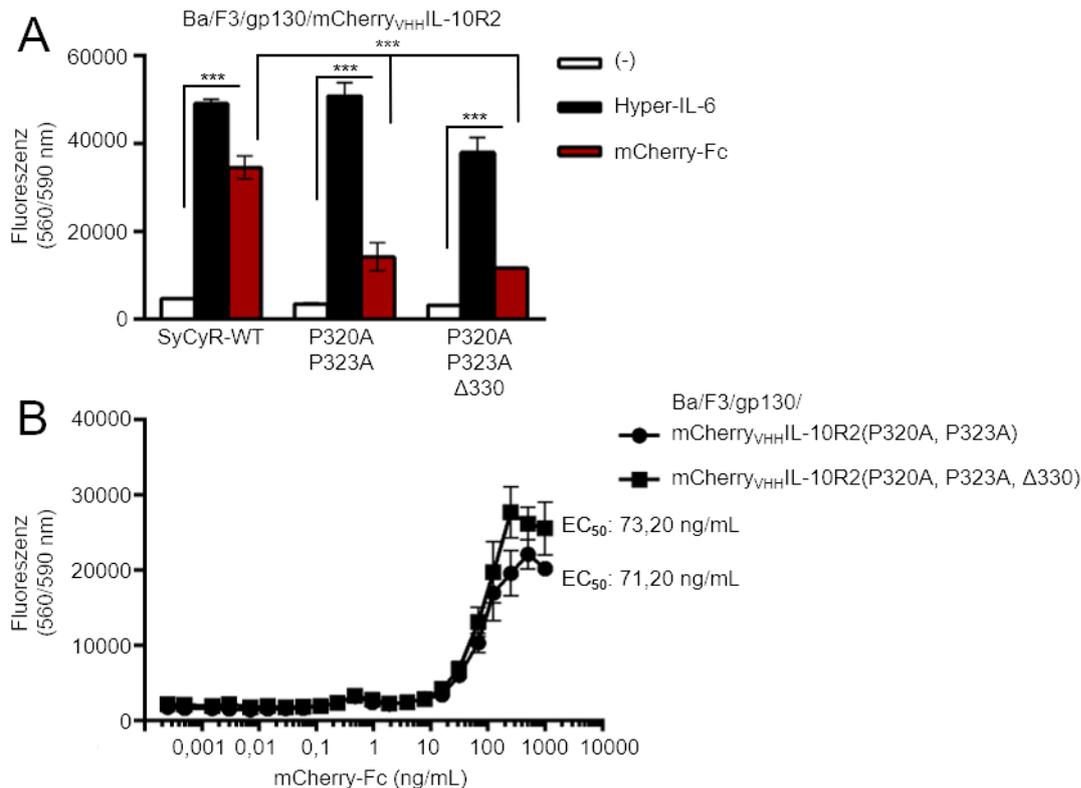


Abbildung 33: Aktivierung der mutierten Rezeptoren mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A) und mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A, Δ330) als Homodimer. (A) Proliferation von Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2 (SyCyR-WT), Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A) und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A, Δ330) Zellen ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL mCherry-Fc. **(B)** Proliferation von Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A) und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A, Δ330) Zellen mit steigenden Konzentrationen von 0,00025 – 1000 ng/mL mCherry-Fc. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$). Die Berechnung der EC₅₀ erfolgte mittels nichtlinearer Regression. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Eine Analyse der mRNA Expression von *Pim-1* bestätigte die Ergebnisse des Proliferationsassays. Es konnte hier eine Expression von *Pim-1* nach Stimulation von Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A) und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A, Δ330) Zellen mit mCherry-Fc gezeigt werden. Die mRNA Mengen waren hierbei signifikant reduziert, im Vergleich zu einer Stimulation von Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2 (SyCyR-WT) Zellen mit mCherry-Fc (**Abbildung 34**). Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen dem mutierten, vollständigen SyCyR (mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A)) und der mutierten Deletionsvariante (mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A, Δ330)).

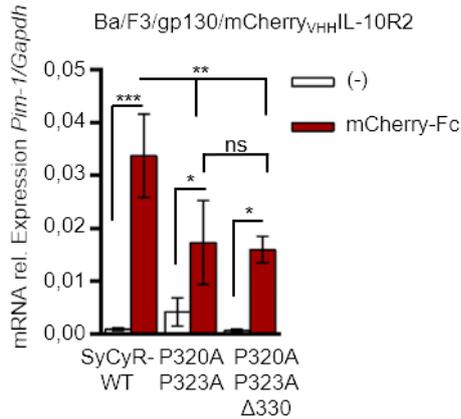


Abbildung 34: Quantifizierung der mRNA Menge von *Pim-1*. Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2 (SyCyR-WT), Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A) und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A, Δ330) Zellen wurden für 120 min ohne Zytokin oder mit 100 ng/mL mCherry-Fc inkubiert und die mRNA Mengen des STAT3-responsiven Gens *Pim-1* analysiert. Dargestellt ist ein Experiment aus n=3 unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$). Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Die Signaltransduktion des IL-10R2 Homodimers wurde durch die Mutationen ebenfalls nur leicht beeinflusst. Die Mengen an phosphoryliertem STAT3, ERK1/2 und Jak2 waren im Vergleich zur Stimulation des SyCyR-WT etwas geringer, während die Mutationen auf die Phosphorylierung von Jak1 und Tyk2 keinen Einfluss hatte (**Abbildung 35**).

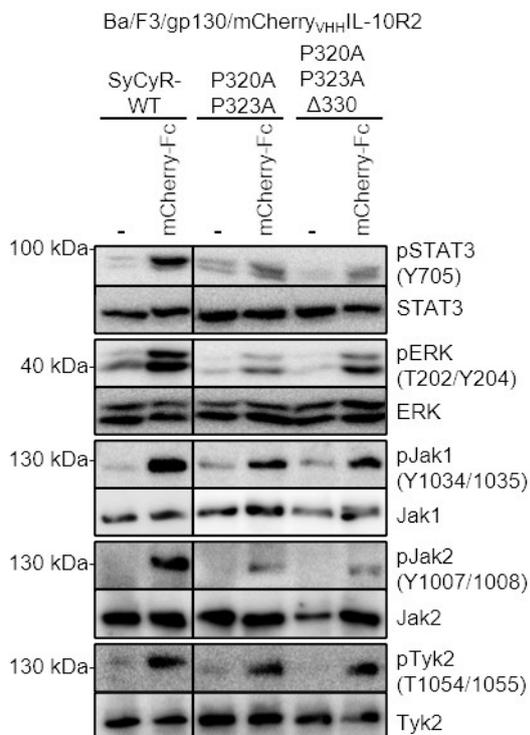


Abbildung 35: Analyse der Signaltransduktion des mutierten IL-10R2 mittels Western Blot. STAT3, ERK1/2, Jak1, Jak2 und Tyk2 Aktivierung in Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2 (SyCyR-WT), Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A) und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2(P320A, P323A, Δ330) Zellen stimuliert mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL mCherry-Fc für 120 min. Gleiche Mengen an Protein (50 µg pro Spur) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3, ERK1/2, Jak1, Jak2, Tyk2 und pSTAT3, pERK1/2, pJak1, pJak2, pTyk2

analysiert. Vertikale Linien stellen eine zugeschnittene Membran dar, wobei die Detektion der Proben auf einer Membran erfolgte. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass die Proline 320 und 323 des PxxP Motivs Einfluss auf die homodimere Signaltransduktion des IL-10R2 haben.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der IL-10R2 in der Lage ist, einen aktiven Homodimer zu bilden, welcher eine vergleichbare Signaltransduktion wie der Heterodimer aus IL-22R α 1 und IL-10R2 induzieren kann. Die für die Signaltransduktion relevanten Bereiche liegen hierbei voraussichtlich zwischen den Aminosäuren 280 und 330. Das genaue Bindemotiv des IL-10R2 konnte jedoch nicht identifiziert werden. Eine homodimere Aktivierung des endogenen murinen IL-10R2 konnte bisher in der Literatur noch nicht gezeigt werden, da es für diese Aktivierung keinen bekannten Liganden gibt. Bereits 1996 verwendeten Kotenko und Kollegen daher Chimäre Rezeptoren, welche aus der extrazellulären Domäne des humanen IFN-R1 und der TMD und ICD des humanen IL-10R2 bestanden, um die Aktivierung dieses Homodimers nachzuweisen [178]. Mit dem SyCyR System gibt es demnach eine neue Möglichkeit, solche Interaktionen hintergrundfrei zu analysieren.

3.2.3 IL-10R2-SyCyR bildet aktive Heterodimere mit dem IL-6 Rezeptor gp130

In Abschnitt 3.1 konnte bereits gezeigt werden, dass der gp130-SyCyR sowohl mit dem GFP_{VHH} als auch mit dem mCherry_{VHH} aktive Homodimere ausbildet und somit eine IL-6 Transaktivierung kopieren kann. In diesem Abschnitt wurde der gp130-SyCyR in Kombination mit dem IL-10R2-SyCyR analysiert und in BaF3/gp130 Zellen exprimiert (**Abbildung 36A, B**).

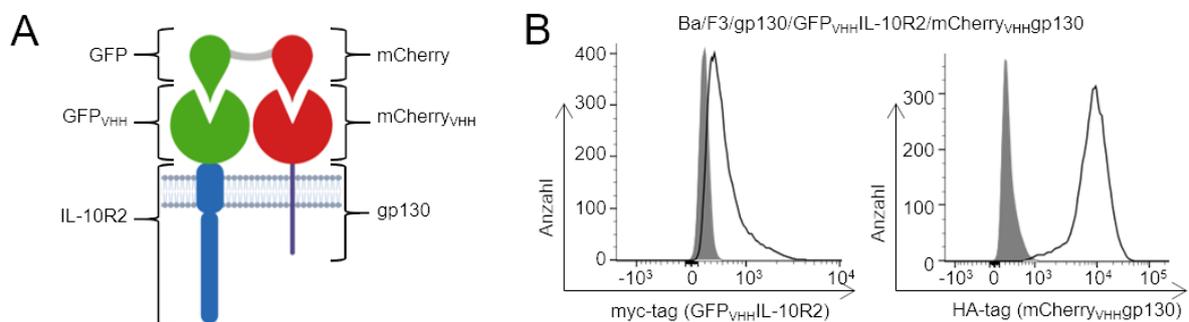


Abbildung 36: Analyse der neuen Rezeptorkombination aus dem IL-10R2 und dem gp130 Rezeptor. (A) Die schematische Darstellung zeigt die Bindung von GFP-mCherry (grün, rot) an den GFP_{VHH}IL-10R2 (grün, blau) und den mCherry_{VHH}gp130-SyCyR (rot, lila). Die Abbildung wurde mit BioRender generiert. **(B)** Kontrolle der Co-Oberflächenexpression des GFP_{VHH}IL-10R2 (myc-tag) und des mCherry_{VHH}gp130-SyCyR (HA-tag) (durchgezogene Linie) in BaF3/gp130/GFP_{VHH}IL-10R2/mCherry_{VHH}gp130-Zellen. Die graue Fläche zeigt BaF3/gp130-Zellen. Die Detektion erfolgte durch einen myc- und einen HA-Antikörper. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Die Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}IL-10R2/mCherry_{VHH}gp130 Zellen wurden mit GFP-Fc, mCherry-Fc oder GFP-mCherry inkubiert und die Proliferation analysiert (**Abbildung 37A**). Dabei führte eine Inkubation mit GFP-Fc zu einer homodimeren Aktivierung des IL-10R2, welche hier etwas schwächer ausfiel, als zuvor bei diesem Rezeptor mit dem mCherry_{VHH} beobachtet wurde. Die Inkubation mit mCherry-Fc aktivierte den gp130-SyCyR und die Proliferation war vergleichbar mit der durch Hyper-IL-6 induzierten Proliferation durch wildtypisches gp130. Die Proliferation der Zellen mit GFP-mCherry zeigte, dass die beiden Rezeptoren dazu in der Lage sind, funktionale Heterodimere zu bilden. Eine konzentrationsabhängige Proliferation der Zellen mit GFP-mCherry zeigte, dass diese eine EC₅₀ von 18 ng/mL aufwiesen (**Abbildung 37B**).

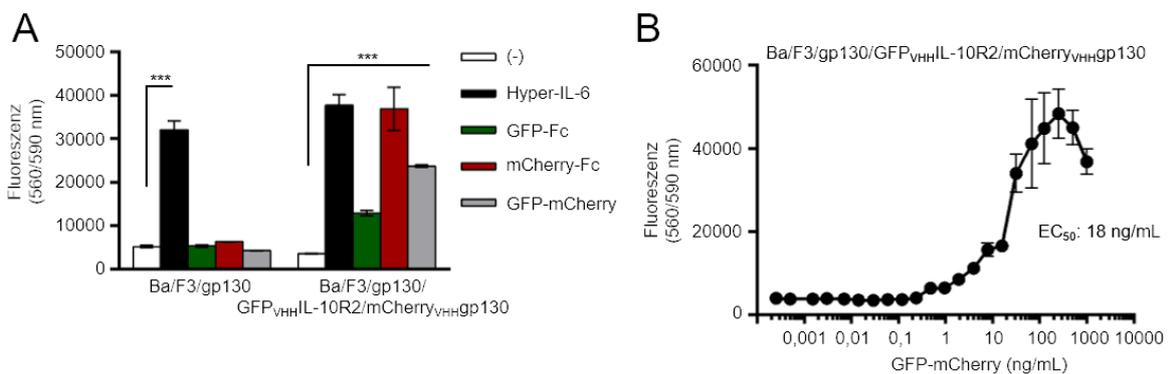


Abbildung 37: Aktivierung der neuen Rezeptorkombination IL-10R2 und gp130. (A) Proliferation von Ba/F3/gp130 und Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}IL-10R2/mCherry_{VHH}gp130 Zellen ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL GFP-Fc, mCherry-Fc oder GFP-mCherry. (B) Proliferation von Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}IL-10R2/mCherry_{VHH}gp130 Zellen mit steigenden Konzentrationen von 0,00025 – 1000 ng/mL GFP-mCherry. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$). Die Berechnung der EC₅₀ erfolgte mittels nichtlinearer Regression.

Die Zellen wurden weiterhin als Homo- und Heterodimer stimuliert und die Aktivierung von STAT3 und ERK1/2 analysiert (**Abbildung 38**). Es zeigte sich dabei, dass die Zellen sowohl als Homo-, als auch als Heterodimer aktiviert werden können. Dabei war die Stimulation des GFP_{VHH}IL-10R2 durch GFP-Fc etwas schwächer als zuvor die Stimulation des mCherry_{VHH}IL-10R2 durch mCherry-Fc. Dies kann z.B. an der schwächeren Affinität des GFP_{VHH} zu seinem Liganden liegen.

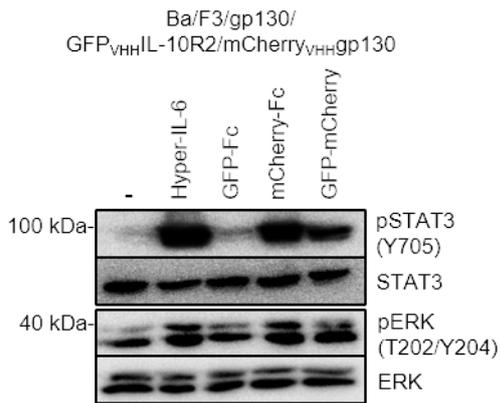


Abbildung 38: Analyse der Signaltransduktion der neuen Kombination aus IL-10R2- und gp130-SyCyR mittels Western Blot. STAT3 und ERK1/2 Aktivierung in Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}IL-10R2/mCherry_{VHH}gp130 Zellen stimuliert mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL GFP-Fc, mCherry-Fc oder GFP-mCherry für 60 min. Gleiche Mengen an Protein (50 µg pro Spur) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3, ERK1/2 und pSTAT3, pERK1/2 analysiert. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten.

Ferner wurde untersucht, ob auch die in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Deletionsvarianten des IL-10R2 $\Delta 310$ und $\Delta 280$ in der Lage sind, aktive Heterodimere mit dem gp130-SyCyR auszubilden. Als Homodimer wiesen diese Rezeptoren keine Aktivität mehr auf, wobei der IL-10R2($\Delta 310$) Rezeptor noch eine geringe Proliferation bei hohen Konzentrationen von mCherry-Fc zeigte und auch eine geringe Januskinase-Aktivität aufwies. Der IL-10R2($\Delta 280$) Rezeptor wies hingegen keinerlei Aktivität als Homodimer auf. Die entsprechenden SyCyRs wurden für diese Analyse stabil in Ba/F3/gp130 Zellen transduziert (**Abbildung 39A, B**).

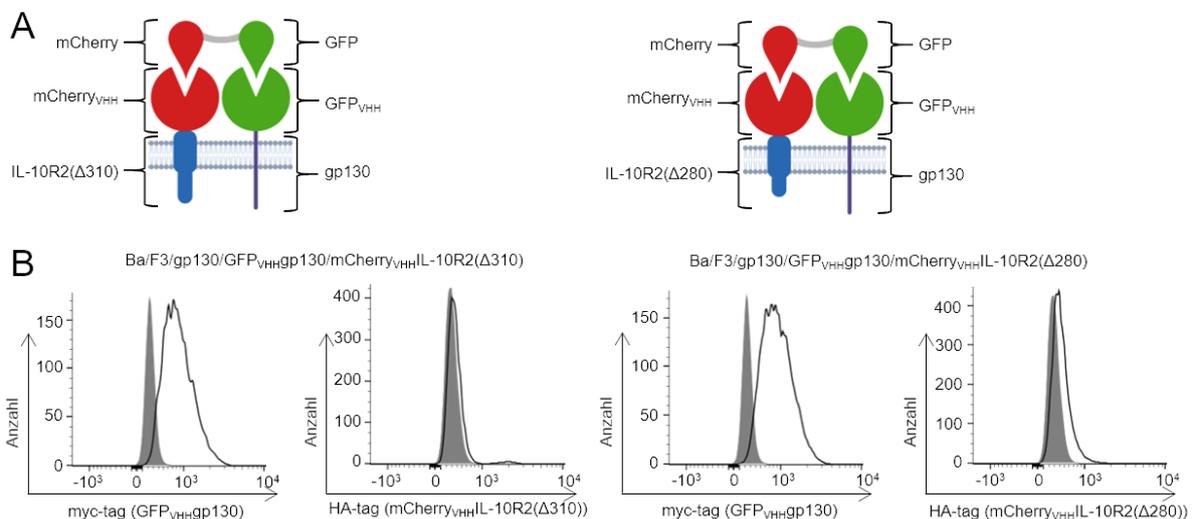


Abbildung 39: Analyse der Rezeptorkombination des gp130-Rezeptors mit der IL-10R2 Deletionsvarianten $\Delta 310$ und $\Delta 280$. (A) Die schematische Darstellung zeigt die Bindung von GFP-mCherry (rot, grün) an den GFP_{VHH}gp130 (grün, lila) und den mCherry_{VHH}IL-10R2-SyCyR $\Delta 310$ oder $\Delta 280$ (rot, blau). Die Abbildung wurde mit BioRender generiert. (B) Kontrolle der Co-Oberflächenexpression des GFP_{VHH}gp130 (myc-tag) und des mCherry_{VHH}IL-10R2($\Delta 310$)- oder mCherry_{VHH}IL-10R2($\Delta 280$)-SyCyRs (HA-tag) (durchgezogene Linie) in Ba/F3/gp130-Zellen. Die graue Fläche zeigt die ursprünglichen Ba/F3/gp130-Zellen. Die Detektion erfolgte durch einen myc- und einen HA-Antikörper. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Die beiden Rezeptorkombinationen wurden als Homo- und als Heterodimer stimuliert und die Proliferation der Zellen analysiert (**Abbildung 40A**). Dabei zeigte sich, dass die Zellen, welche die $\Delta 310$ Deletionsvariante exprimieren bei einer Inkubation mit GFP-mCherry proliferierten. Sie waren daher in der Lage einen aktiven Heterodimer mit dem gp130-SyCyR auszubilden. Bei einer Inkubation mit mCherry-Fc, welche zu einer Homodimerisierung des IL-10R2($\Delta 310$) führte, konnte derweil keine Proliferation gemessen werden. Die Kombination aus GFP_{VHH}gp130 und mCherry_{VHH}IL-10R2($\Delta 280$) war nicht mehr in der Lage, als Heterodimer mit GFP-mCherry zu proliferieren. Dies zeigte sich weiterhin in einem konzentrationsabhängigen Proliferationsassay der beiden Zelllinien (**Abbildung 40B**). Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2($\Delta 310$) Zellen wiesen hierbei eine EC₅₀ von 7,8 ng/mL auf, während Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2($\Delta 280$) Zellen auch bei höheren GFP-mCherry Konzentration keine Proliferation zeigten. Dabei war die EC₅₀ der Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2($\Delta 310$) Zellen mit 7,8 ng/mL niedriger als die zuvor bestimmte EC₅₀ der Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}IL-10R2/mCherry_{VHH}gp130 Zellen mit 18 ng/mL. Dies kann damit zusammenhängen, dass die Nanobodies getauscht wurden und es dadurch zu einer leichten Veränderung der Heterodimerisierung kommen kann.

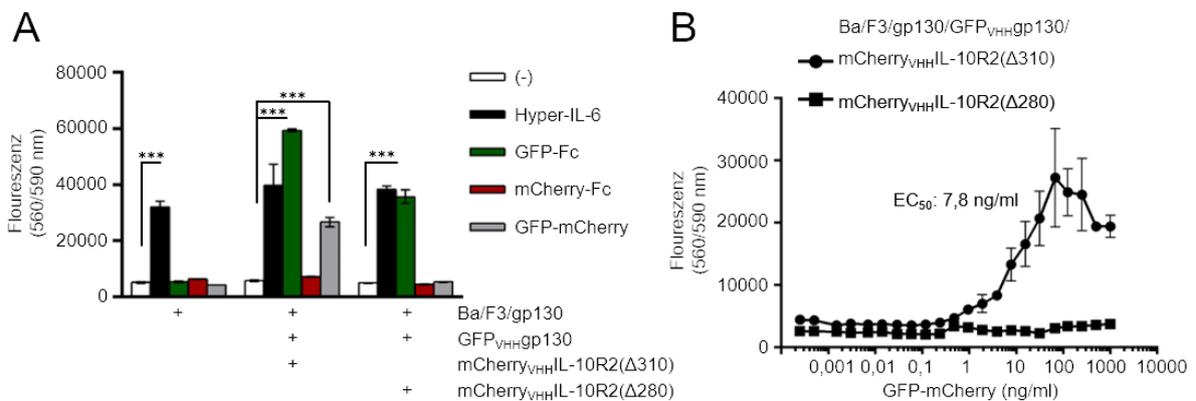


Abbildung 40: Aktivierung der Rezeptorkombination des gp130-Rezeptors mit den IL-10R2 Deletionsvarianten $\Delta 310$ und $\Delta 280$. (A) Proliferation von Ba/F3/gp130, Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2($\Delta 310$) und Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2($\Delta 280$) Zellen ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL GFP-Fc, mCherry-Fc oder GFP-mCherry. (B) Proliferation von Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2($\Delta 310$) und Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2($\Delta 280$) Zellen mit steigenden Konzentrationen von 0,00025 – 1000 ng/mL GFP-mCherry. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines two-way ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$). Die Berechnung der EC₅₀ erfolgte mittels nichtlinearer Regression. Diese Forschung wurde ursprünglich im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht [168], © die Autoren.

Die Aktivität der beiden Rezeptorkombinationen wurden weiter in einem Stimulationsassay per Western Blot analysiert (**Abbildung 41**).

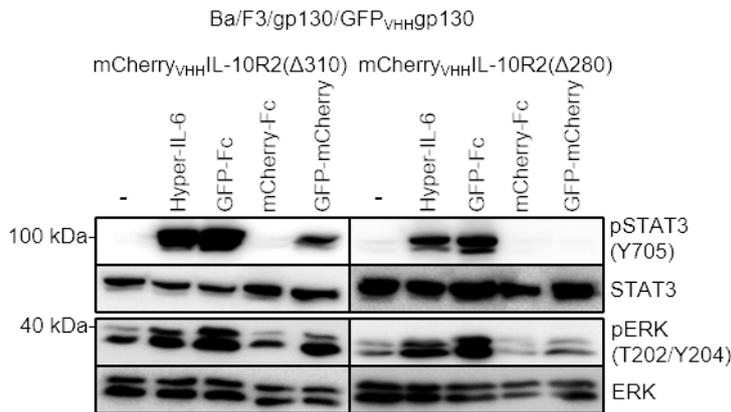


Abbildung 41: Analyse der Signaltransduktion der neuen Kombination aus den IL-10R2-Deletionsvarianten $\Delta 310$ und $\Delta 280$ und dem gp130-SyCyR mittels Western Blot. STAT3 und ERK1/2 Aktivierung in Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2($\Delta 310$) und Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2($\Delta 280$) Zellen stimuliert mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL GFP-Fc, mCherry-Fc oder GFP-mCherry für 120 min. Gleiche Mengen an Protein (50 μ g pro Spur) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3, ERK1/2 und pSTAT3, pERK1/2 analysiert. Vertikale Linien stellen hierbei unterschiedliche Membranen dar. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten. Diese Forschung wurde ursprünglich im Journal of Biological Chemistry veröffentlicht [168], © die Autoren.

Die Daten der Western Blot Analyse bestätigten die Ergebnisse des Proliferationsassays, da auch hier eine Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 bei den Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2($\Delta 310$) Zellen detektiert werden konnte, welche mit GFP-mCherry stimuliert wurden. Eine Stimulation des mCherry_{VHH}IL-10R2($\Delta 310$) Rezeptors als Homodimer zeigte hierbei ebenfalls keine Aktivität. Auch die Stimulation der Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}IL-10R2($\Delta 280$) Zellen zeigte keine Phosphorylierung von STAT3 oder ERK1/2 nach einer Stimulation mit GFP-mCherry. Als Kontrolle wurde auch der gp130-SyCyR als Homodimer mit GFP-Fc stimuliert. Der Rezeptor zeigte bei beiden Zelllinien eine vergleichbare Aktivität mit der durch Hyper-IL-6 induzierten Signaltransduktion auf.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der IL-10R2($\Delta 310$) in der Lage ist, funktionale Heterodimere mit dem gp130-Rezeptor zu bilden. Dabei geht die STAT3 und ERK1/3 Phosphorylierung ausschließlich vom gp130-Rezeptor aus, wie die Daten mit den IL-10R2 Deletionsvarianten zeigten. Der IL-10R2($\Delta 310$) ist, wie in Abschnitt 3.2.2 gezeigt wurde, nicht mehr in der Lage als Homodimer zu agieren, jedoch weist er noch einen Rest Januskinase-Aktivität auf. Währenddessen ist der IL-10R2($\Delta 280$) vollständig funktionslos und kann auch in der Kombination mit dem gp130-SyCyR keine aktiven Heterodimere mehr ausbilden.

3.3 Aktivierung des trimeren TNFR1 und TNFR2 als synthetischen Rezeptor

Zur Weiterentwicklung des SyCyR Systems wurde versucht, Rezeptoren zu aktivieren, welche nur als Trimer aktiv sind, wie z.B. Rezeptoren der TNFR-Superfamilie. Die TMD und ICD sowie

neun AS der ECD des humanen TNFR1 und des humanen TNFR2 wurden hierfür mit einem Nanobody gegen GFP oder mCherry (GFP_{VHH} , $\text{mCherry}_{\text{VHH}}$) fusioniert (**Abbildung 42A, B**, Sequenz siehe Anhang **Abbildung 71**). Die TNFR-SyCyRs wurden stabil in Ba/F3/gp130 Zellen transduziert (**Abbildung 42C**), wobei zwei Zelllinien generiert wurden, welche jeweils Co-transduziert wurden. Ba/F3/gp130/ GFP_{VHH} TNFR1/ $\text{mCherry}_{\text{VHH}}$ TNFR1 Zellen exprimieren nur den TNFR1, jedoch einmal mit dem GFP- und einmal mit dem mCherry-Nanobody. Ba/F3/gp130/ GFP_{VHH} TNFR1/ $\text{mCherry}_{\text{VHH}}$ TNFR2 Zellen exprimieren sowohl den TNFR1 als auch den TNFR2 (**Abbildung 42C**). Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgte durch trimeres GFP (3xGFP) oder trimeres mCherry (3xmCherry), welches als CHO K1 Zellkulturüberstand vorlag. Die Proteinkonzentration von 3xGFP wurde mittels ELISA bestimmt. Die Konzentration von 3xmCherry wurde durch einen Vergleich der Intensität der Aktivierung der Signalkaskade zu einer Aktivierung mit 3xGFP abgeschätzt [29].

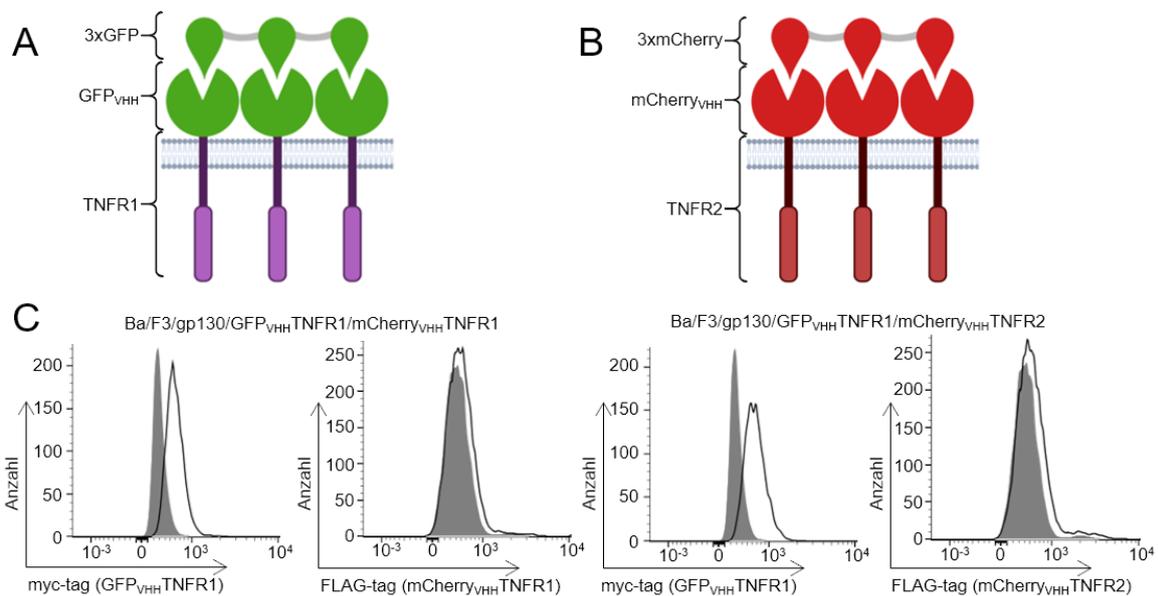


Abbildung 42: Schematische Darstellung der Trimerisierung des TNFR1- und TNFR2-SyCyRs. (A) Bindung von 3xGFP (grün) an den GFP_{VHH} TNFR1 (grün, violett) und **(B)** Bindung von 3xmCherry (rot) an den $\text{mCherry}_{\text{VHH}}$ TNFR2 (rot, dunkelrot). Die Abbildung wurde mit BioRender generiert. **(C)** Kontrolle der Oberflächenexpression des GFP_{VHH} TNFR1 (myc-tag) bzw. $\text{mCherry}_{\text{VHH}}$ TNFR1 (FLAG-tag) und des $\text{mCherry}_{\text{VHH}}$ TNFR2 (FLAG-tag) (durchgezogene Linie) in transduzierten Ba/F3/gp130-Zellen. Die graue Fläche zeigt die Ausgangs-Ba/F3/gp130-Zellen. Die Detektion erfolgte durch einen myc- oder FLAG-Antikörper.

Die Aktivierung der Trimere wurde mittels Western Blot analysiert, wobei die Phosphorylierung des NF- κ B Inhibitors I κ B detektiert wurde. Durch die Phosphorylierung von I κ B dissoziiert dieser von NF- κ B und der Transkriptionsfaktor kann die Transkription seiner Zielgene initiieren. Hierfür wurden die Zellen sowohl mit Homo-/Heterotrimeren als auch mit Homo-/Heterodimeren oder monomeren synthetischen Liganden stimuliert (**Abbildung 43**).

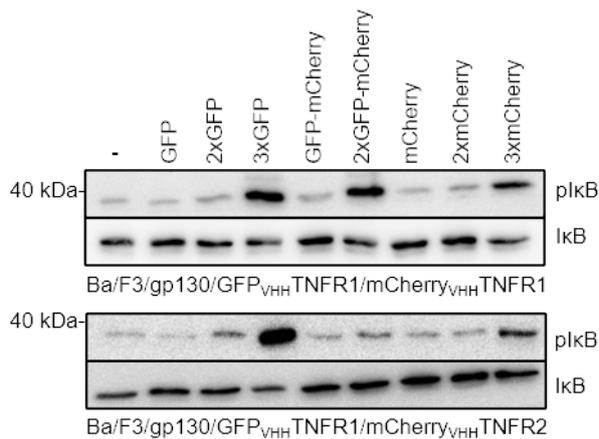


Abbildung 43: Analyse der TNFR-Aktivierung mittels Western Blot. IκB Aktivierung in Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}TNFR1/mCherry_{VHH}TNFR1 und Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}TNFR1/mCherry_{VHH}TNFR2 Zellen, welche 60 min mit 100 ng/mL GFP, 2xGFP, 3xGFP, GFP-mCherry, 2xGFP-mCherry, mCherry, 2xmCherry oder 3xmCherry stimuliert wurden. Zuvor wurden die Zellen für 30 min mit 2,5 μM des Proteaseinhibitors MG132 vorinkubiert. Gleiche Mengen an Protein (50 μg pro Spur) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen IκB und pIκB detektiert. Dargestellt ist ein Experiment aus n=3 unabhängigen Experimenten.

Die Detektion von pIκB zeigt, dass im Falle der Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}TNFR1/mCherry_{VHH}TNFR1 Zellen eine Aktivierung erfolgte, wenn diese mit trimeren Proteinen stimuliert wurden. Dabei war die Phosphorylierung unabhängig davon, ob die Rezeptoren als Homotrimer mit 3xGFP, Homotrimer mit 3xmCherry oder als „Heterotrimer“ mit 2xGFP-mCherry stimuliert wurden. Für die Stimulation der Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}TNFR1/mCherry_{VHH}TNFR2 Zellen wird ersichtlich, dass nur eine Stimulation der Homotrimere (TNFR1 oder TNFR2) zu einer Phosphorylierung von IκB führt. Eine heterotrimere Stimulation aus TNFR1 und TNFR2 (hier: 2x TNFR1, 1xTNFR2) wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben und konnte auch mittels synthetischer Rezeptoren nicht gezeigt werden. Die Phosphorylierung von IκB nach einer Stimulation des TNFR1 zeigte, dass hierbei der Komplex 1 gebildet wird und somit Gene für das Überleben der Zellen transkribiert werden.

Des Weiteren wurde analysiert, ob die Aktivierung des TNFR1 und TNFR2 auch zu einer Proliferation der transduzierten Ba/F3/gp130-Zellen führt. Die Zellen wurden hierfür mit steigenden Konzentrationen von 3xmCherry oder 3xGFP inkubiert (**Abbildung 44**).

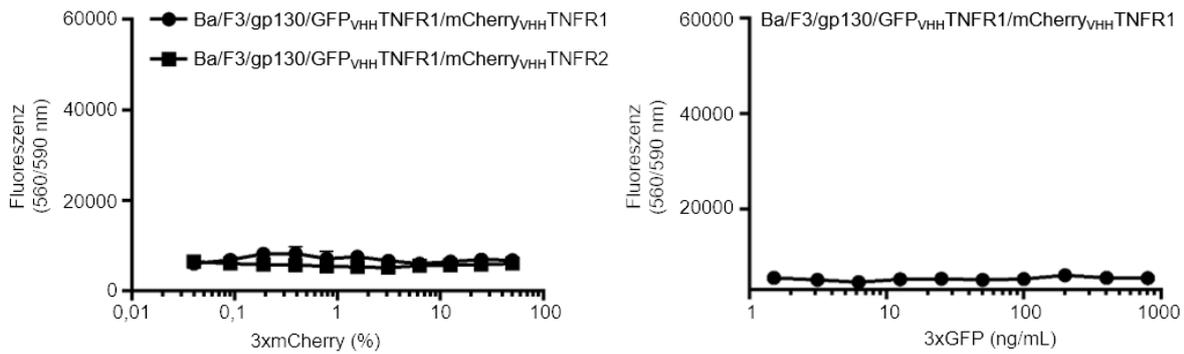


Abbildung 44: Proliferation von TNFR-SyCyRs. Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}TNFR1/mCherry_{VHH}TNFR1 und Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}TNFR1/mCherry_{VHH}TNFR2 Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von 0,04 - 50 % 3xmCherry inkubiert. Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}TNFR1/mCherry_{VHH}TNFR1 Zellen wurden zudem auch mit steigenden Konzentrationen von 1,5 – 800 ng/mL 3xGFP inkubiert. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten.

Der konzentrationsabhängige Proliferationsassay zeigte jedoch, dass es zu keinem Zytokin-abhängigen Wachstum der Zellen gekommen ist. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Rezeptoren der TNFR-Familie je nach Zelltyp und Zustand der Zelle sehr unterschiedliche Signalwege induzieren können. Des Weiteren aktivieren die TNFR kein STAT bzw. ERK1/2, welches für die Proliferation von Ba/F3/gp130 benötigt wird.

Für eine selektive Aktivierung von trimere Rezeptoren war es notwendig, gereinigte, trimere Fluoreszenzproteine zu exprimieren. Hierbei wurde sich wieder der Fc-Tag Strategie aus Abschnitt 3.1 bedient und 3xGFP sowie 3xmCherry mit einer Fc-Domäne eines humanen IgG Antikörpers fusioniert (Sequenz siehe Anhang **Abbildung 64, Abbildung 65, Abbildung 45A, B**). Die Fusionsproteine wurden in CHO K1 Zellen stabil exprimiert und in den Überstand sezerniert. Der Überstand wurde anschließend über eine Protein-A Affinitätschromatographie gereinigt (**Abbildung 45C, D**). Weiterhin wurde die Fc-Dimerisierung mittels Western Blot analysiert, wobei die Proteine unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetragen wurden (**Abbildung 45E, F**).

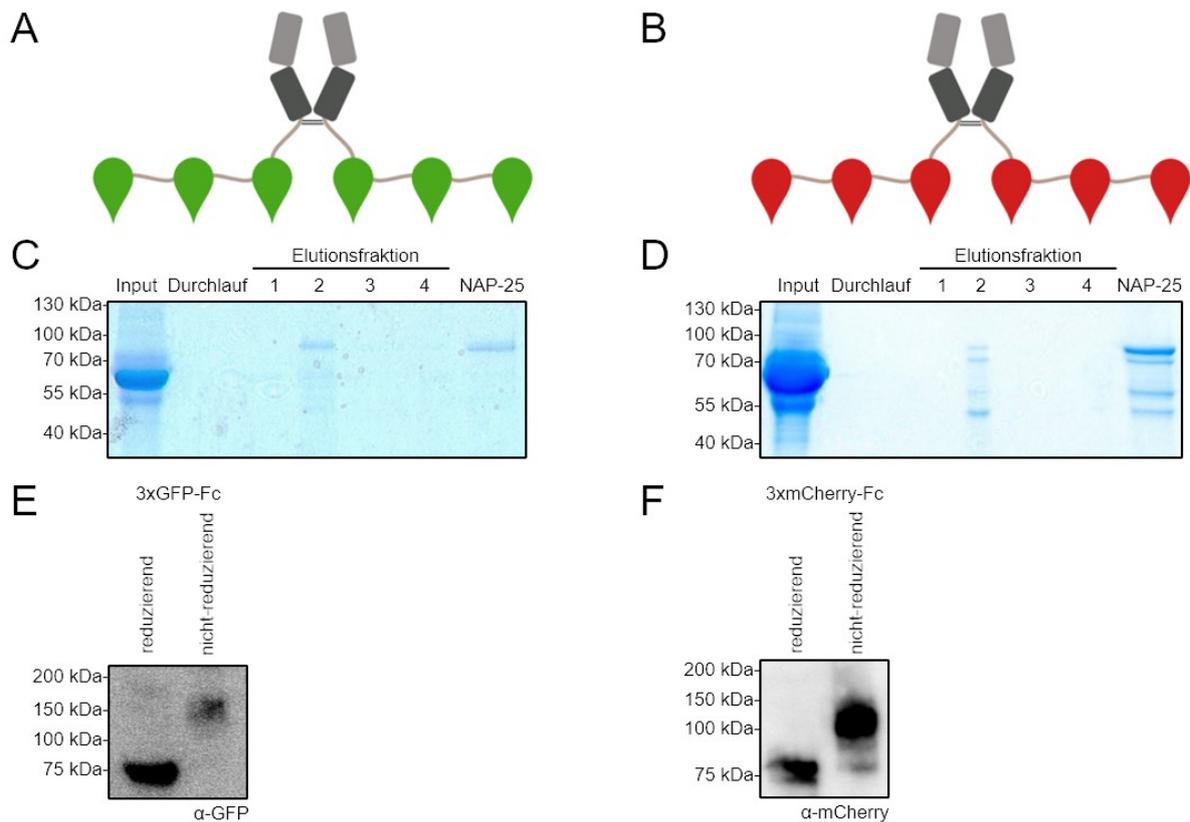


Abbildung 45: Expression und Reinigung von 3xGFP-Fc und 3xmCherry-Fc. (A) Schematische Darstellung der Dimerisierung von 3xGFP-Fc und (B) 3xmCherry-Fc zu Homohexameren. Die Abbildung wurde mit BioRender generiert. (C, D) Die Proteine wurden in CHO K1 Zellen exprimiert und 1 L Zellkulturüberstand mittels Protein-A Affinitätschromatographie gereinigt. Proben der einzelnen Reinigungsschritte wurden per Coomassie Gel analysiert. (E) Western Blot von 3xGFP-Fc unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. Die Detektion erfolgte mittels GFP-Antikörper. (F) Western Blot von 3xmCherry-Fc unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. Die Detektion erfolgte mittels mCherry-Antikörper.

Es ergaben sich hierbei Ausbeuten von 0,16 mg/L für 3xGFP-Fc und 0,45 mg/L für 3xmCherry-Fc. Durch die Fc-Domäne bilden auch diese Fusionsproteine Dimere, was hierbei in Homohexameren resultierte.

Für manche Rezeptoren der TNFR-Superfamilie wurde beschrieben, dass diese nicht ausschließlich als Trimer aktiviert werden, sondern Cluster aus mehreren Rezeptoren und Liganden bilden [179]. Um zu analysieren, ob es einen Unterschied macht, ob die Zellen als Homotrimer oder -hexamer aktiviert werden, wurde die Fc-Domäne von 3xmCherry-Fc durch die TEV-Protease mittels Hydrolyse entfernt. Die Schnittstelle der TEV-Protease liegt hierbei in der Linkerregion zwischen dem Fluoreszenzprotein und der Fc-Domäne. Nach der Hydrolyse erfolgte erneut eine Protein-A Affinitätschromatographie, um die hydrolysierte Fc-Domäne und nicht-hydrolysiertes 3xmCherry-Fc vom alleinigen 3xmCherry zu trennen. 3xmCherry und die TEV Protease befanden sich hierbei im Durchfluss und wurden anschließend mittels *size exclusion chromatographie* (SEC) voneinander getrennt. Dies war möglich, da die TEV Protease ein Molekulargewicht von ca. 27 kDa und 3xmCherry ein Molekulargewicht von 82 kDa hat (**Abbildung 46**). Die Ausbeute betrug hierbei 34 µg/mL.

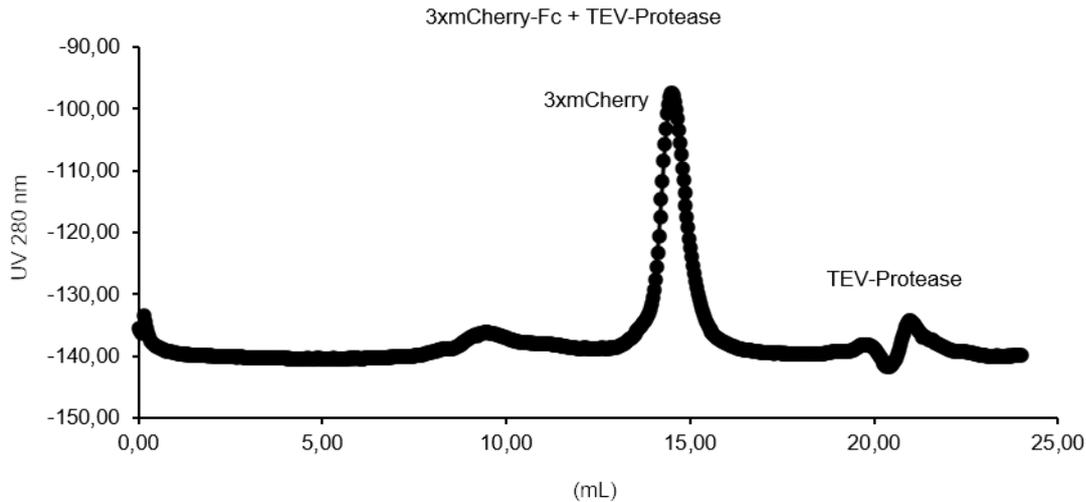


Abbildung 46: Reinigung von hydrolysiertem 3xmCherry mittels SEC. 128 μg 3xmCherry-Fc wurden über Nacht mit 10 μg TEV-Protease bei 4 °C inkubiert. Die hydrolysierte Fc-Domäne wurde über eine Protein-A Affinitätschromatographie entfernt und im Anschluss die TEV-Protease von 3xmCherry mittels SEC getrennt.

Die Aktivität dieser synthetischen, trimeren Liganden wurde im Folgenden an einem weiteren Mitglied der TNFR-Superfamilie getestet, dem FasR.

3.4 FasR-SyCyR induziert selektiv Apoptose in Ba/F3/gp130-Zellen

Der FasR wird in der TNFR-Superfamilie als “Kaiser“ der Todesrezeptoren aufgeführt und wird ebenfalls als Trimer aktiviert. Es wurde bereits erwähnt, dass die Rezeptoren der TNFR-Superfamilie bei ihrer Aktivierung häufig Cluster aus mehr als drei Rezeptoren bilden, was eine apoptotische Signaltransduktion verstärkt [179]. Die TMD, ICD sowie zehn AS der ECD des humanen FasR wurden mit einem Nanobody gegen GFP zum GFP_{VHH}FasR-SyCyR fusioniert (**Abbildung 47A** Sequenz im Anhang **Abbildung 72**). Der SyCyR wurde stabil in Ba/F3/gp130-Zellen exprimiert und die Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie analysiert (**Abbildung 47B**).

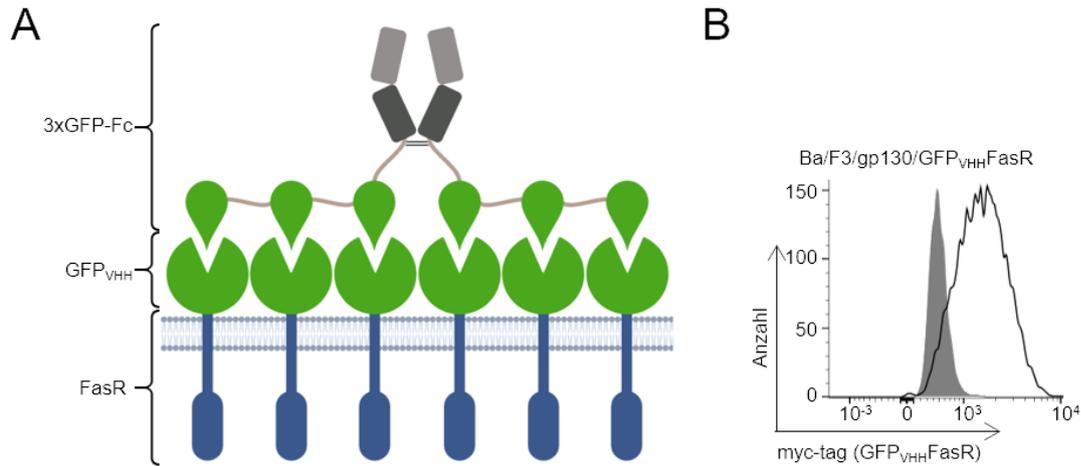


Abbildung 47: Schematische Darstellung der Bindung von 3xGFP-Fc an den GFP_{VHH}FasR-SyCyR. (A) 3xGFP-Fc (grün, grau) bildet ein Homohexamer, welches ein Cluster von GFP_{VHH}FasR-SyCyRs (grün, blau) rekrutiert. Die Abbildung wurde mit BioRender generiert. **(B)** Die Oberflächenexpression von GFP_{VHH}FasR (myc-tag) (durchgezogene Linie) in Ba/F3/gp130-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die graue Fläche zeigt die ursprünglichen Ba/F3/gp130-Zellen. Die Detektion erfolgte durch einen myc-Antikörper.

Die Aktivität des GFP_{VHH}FasR-SyCyR wurde zunächst in einem Proliferationsassay analysiert. Hierbei wurden Ba/F3/gp130 und Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}FasR Zellen ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder mit je 100 ng/mL GFP, GFP-Fc oder 3xGFP-Fc inkubiert. Ba/F3/gp130-Zellen proliferierten nur Zytokin-abhängig, weshalb eine Analyse der Induktion von Apoptose durch den FasR nur dann aussagekräftig war, wenn die Zellen zusätzlich zu GFP, GFP-Fc und 3xGFP-Fc auch mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 inkubiert wurden (**Abbildung 48A**). Bei einem konzentrationsabhängigen Proliferationsassay wurde ebenfalls zu jeder 3xGFP-Fc Konzentration 10 ng/mL Hyper-IL-6 gegeben und somit eine letale Konzentration (LC₅₀) von 0,49 ng/mL ermittelt (**Abbildung 48B**).

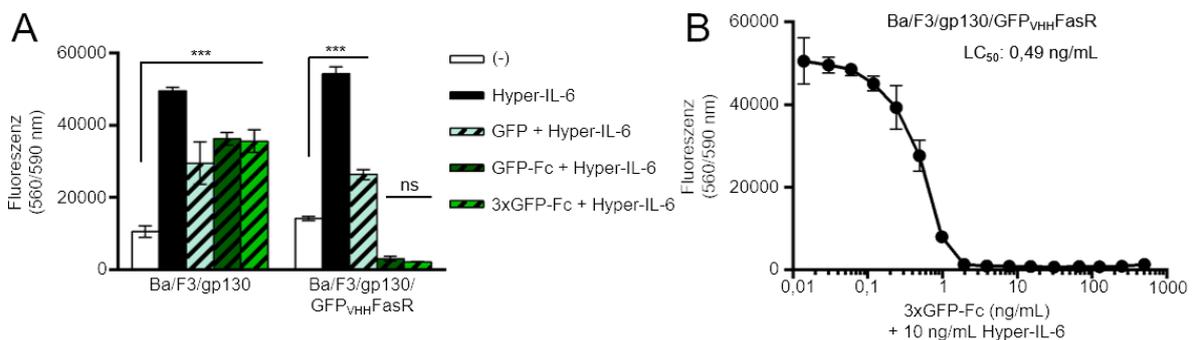


Abbildung 48: Aktivierung des GFP_{VHH}FasR-SyCyRs. (A) Proliferation von Ba/F3/gp130 und Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}FasR Zellen ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL GFP, GFP-Fc, 3xGFP-Fc, wobei letzteren Bedingungen je 10 ng/mL Hyper-IL-6 zugefügt wurden. **(B)** Proliferation von Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}FasR Zellen mit steigenden Konzentrationen von 0,014 – 500 ng/mL 3xGFP-Fc. Dabei wurden allen Bedingungen 10 ng/mL Hyper-IL-6 zugefügt. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines two-way ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$). Die Berechnung der LC₅₀ erfolgte mittels nichtlinearer Regression.

Die **Abbildung 48A** zeigt, dass Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}FasR Zellen, welche mit GFP und Hyper-IL-6 inkubiert wurden, normal proliferieren. Im Gegensatz dazu zeigen die Zellen, welche mit GFP-Fc oder 3xGFP-Fc und Hyper-IL-6 inkubiert wurden, keinerlei Proliferation. Es ist hierbei überraschend, dass bereits eine Inkubation mit dem dimeren GFP-Fc zu einem Verlust der Proliferation von Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}FasR Zellen führt, da der FasR laut Literatur nur als Trimer aktiv ist. Eine Analyse, ob der FasR auch als Dimer aktiv ist, wurde jedoch bisher nicht durchgeführt, da der endogene Ligand FasL stets als Trimer vorliegt.

Die TMD, ICD sowie zehn AS der ECD des humanen FasR wurden zusätzlich auch mit einem mCherry_{VHH} als extrazelluläre Domäne fusioniert (**Abbildung 49A**) und der SyCyR stabil in Ba/F3/gp130-Zellen exprimiert (**Abbildung 49B**).

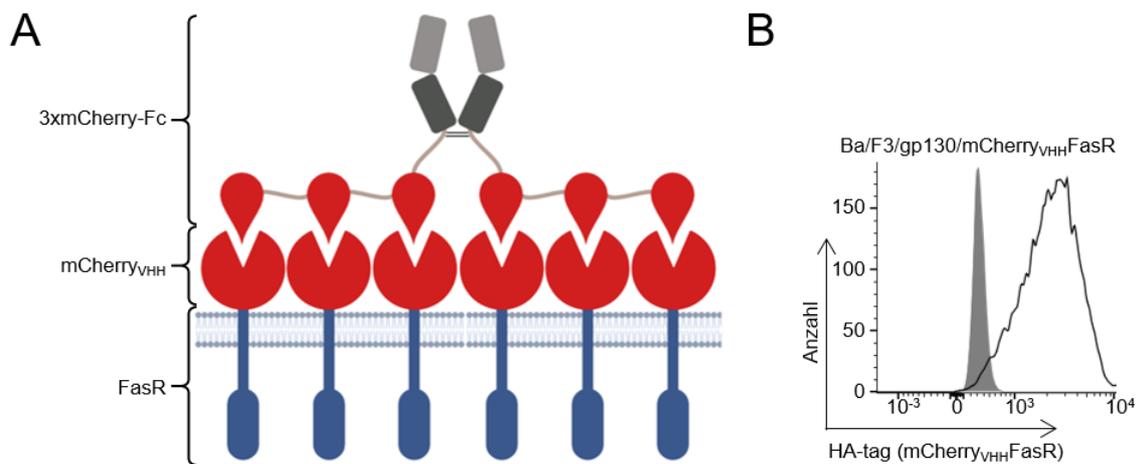


Abbildung 49: Schematische Darstellung der Bindung von 3xmCherry-Fc an den mCherry_{VHH}FasR-SyCyR. (A) 3xmCherry-Fc (rot, grau) bildet ein Homohexamer, welches ein Cluster von mCherry_{VHH}FasR-SyCyRs (rot, blau) rekrutiert. Die Abbildung wurde mit BioRender generiert. (B) Die Oberflächenexpression von mCherry_{VHH}FasR (HA-tag) (durchgezogene Linie) in Ba/F3/gp130-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die graue Fläche zeigt die Ausgangs-Ba/F3/gp130-Zellen. Die Detektion erfolgte durch einen HA-Antikörper.

Die Aktivität des Rezeptors wurde ebenfalls in einem Proliferationsassay analysiert, wobei Ba/F3/gp130 und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL mCherry, mCherry-Fc, 3xmCherry-Fc plus je 10 ng/mL Hyper-IL-6 inkubiert wurden (**Abbildung 50A**). Die LC₅₀ für 3xmCherry-Fc von Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen betrug hierbei 1 ng/mL (**Abbildung 50B**). Die LC₅₀ für eine Inkubation mit 3xmCherry betrug 9,9 ng/mL. Dies zeigt, dass der FasR als Trimer aktiviert ist. Eine Aktivierung des Rezeptors als Cluster bewirkt jedoch bereits bei geringeren Konzentrationen des Liganden den Verlust der Proliferation.

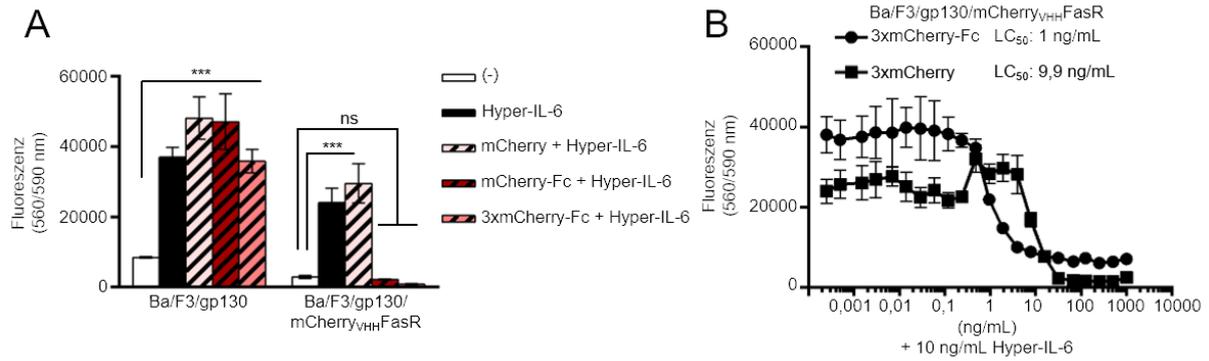


Abbildung 50: Aktivierung des mCherry_{VHH}FasR-SyCyRs. (A) Proliferation von Ba/F3/gp130 und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL mCherry, mCherry-Fc, 3xmCherry-Fc, wobei letzteren Bedingungen je 10 ng/mL Hyper-IL-6 zugefügt wurden. (B) Proliferation von Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen mit steigenden Konzentrationen von 0,00025 – 1000 ng/mL 3xmCherry-Fc oder 3xmCherry. Dabei wurden allen Bedingungen 10 ng/mL Hyper-IL-6 zugefügt. Dargestellt ist ein Experiment aus n=3 unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$). Die Berechnung der LC₅₀ erfolgte mittels nichtlinearer Regression.

Auch für die Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen zeigte sich, dass diese bei einer Inkubation mit monomerem mCherry und Hyper-IL-6 normal proliferierten. Eine Inkubation mit mCherry-Fc oder 3xmCherry-Fc und Hyper-IL-6 bewirkte auch hier einen Verlust der Proliferation. Wie bereits für Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}FasR Zellen beschrieben, war auch bei Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen eine Inkubation mit dimerem mCherry-Fc bereits ausreichend, um eine Proliferation durch Hyper-IL-6 zu unterbinden. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass der FasR bereits eine Aktivität als Dimer aufweist, welche jedoch bisher nicht analysiert werden konnte. Es zeigte sich zudem, dass es keinen Unterschied zwischen einer Aktivierung des FasR-SyCyRs mit GFP_{VHH} oder mCherry_{VHH} als ECD gibt. Weiterhin wurde hierbei auch die LC₅₀ von gereinigtem 3xmCherry ermittelt, welches, wie unter 3.3 beschrieben, generiert wurde. Die LC₅₀ von 3xmCherry war mit 9,9 ng/mL etwas höher als die LC₅₀ von 3xmCherry-Fc (1 ng/mL). Es kann daher gesagt werden, dass sowohl hexameres als auch trimeres mCherry in der Lage ist, die Hyper-IL-6 induzierte Proliferation durch gp130 zu unterbinden. Dabei zeigt sich eine geringfügig schwächere Aktivierung des FasR-SyCyR, wenn die Zellen als Trimer stimuliert werden im Vergleich zu einer hexameren Stimulation, welche eine Cluster-Bildung nachempfindet.

Ob tatsächlich Apoptose durch die Aktivierung des FasR-SyCyRs ausgelöst wird, wurde mittels Western Blot analysiert. Hierfür wurden die Zellen, wie in Abschnitt 2.2.3.6 beschrieben, nicht *gestarvt*, sondern in DMEM^{+/+} Medium aufgenommen und für 6 h mit den angegebenen Zytokinen stimuliert. Auch in diesem Versuch wurde die Vitalität der Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}FasR Zellen durch die Zugabe von 10 ng/mL Hyper-IL-6 zu allen Bedingungen gewährleistet (**Abbildung 51**).

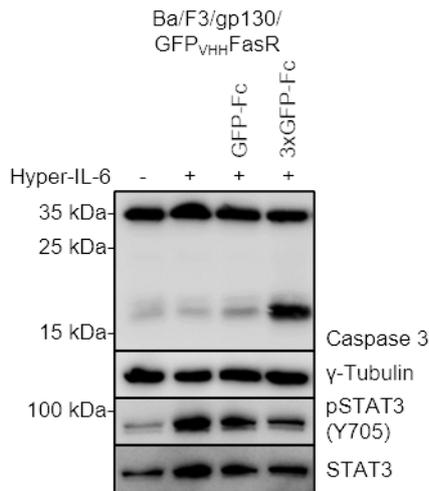


Abbildung 51: Analyse der Aktivierung des FasR-SyCyR per Western Blot. Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}FasR Zellen wurden für 6 h je mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen bei zwei Bedingungen auch mit 100 ng/mL GFP-Fc und 3xGFP-Fc stimuliert. Gleiche Mengen an Protein (50 µg pro Spur) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen Caspase-3, γ-Tubulin, pSTAT3 und STAT3 detektiert. Dargestellt ist ein Experiment aus n=3 unabhängigen Experimenten.

Die Analyse der Stimulation von Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}FasR Zellen mit 3xGFP-Fc zeigte, dass bereits nach 6 h eine Aktivierung der Caspase-3 zu erkennen ist. Pro-Caspase-3 ist inaktiv und hat ein Molekulargewicht von 35 kDa. Durch die Bindung des Liganden an den FasR wird die Initiator-Caspase-8 aktiviert, welche wiederum die Effektor-Caspase-3 proteolytisch spaltet und dadurch aktiviert. In ihrer aktiven Form hat die Caspase-3 ein Molekulargewicht von 17 kDa. Diese aktivierte Caspase-3 konnte nach einer Stimulation der Zellen mit 3xGFP-Fc detektiert werden. Eine Stimulation mit dimerem GFP-Fc wies hier nur eine sehr schwache Aktivierung der Caspase-3 auf. Es kann vermutet werden, dass die Aktivierung des FasR als Dimer schwächer und langsamer abläuft als eine Aktivierung als Trimer, weshalb eine Stimulationszeit von 6 h nur bedingt Apoptose induziert. Die Analyse der Proliferationsassays erfolgte nach 72 h und bot der Aktivierung des FasR als Dimer demnach deutlich mehr Zeit, Apoptose zu induzieren. Die Detektion von phosphoryliertem STAT3 zeigte, dass die Zellen durch die Zugabe von Hyper-IL-6 theoretisch in der Lage waren zu proliferieren und die Detektion von aktiver Caspase-3 auf die Aktivierung des FasR-SyCyRs zurückzuführen ist.

Zusätzlich wurde mit Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}FasR Zellen ein Annexin V Bindeassay durchgeführt. Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}FasR Zellen wurden für 24 h mit den gekennzeichneten Zytokinen inkubiert, wobei erneut je eine Zugabe von Hyper-IL-6 erfolgte. Die Zellen wurden sowohl mit Annexin V als auch mit 7-AAD gefärbt, was es ermöglichte, eine Einteilung in lebendige Zellen, Zellen in früher oder später Apoptose oder Nekroptose durchzuführen. Als Kontrolle wurden Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}FasR Zellen auch ohne Zytokin inkubiert, was zu einer langsamen Abnahme der Vitalität führen sollte, da Ba/F3/gp130-Zellen nur Zytokin-abhängig proliferieren. Als weitere Kontrolle wurden Zellen nur mit Hyper-IL-6 inkubiert, was eine normale Proliferation dieser Zellen gewährleistet. Als Positivkontrolle für Zelltod wurden Zellen,

welche zuvor nur mit Hyper-IL-6 inkubiert wurden, vor der Analyse zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen (**Abbildung 52**).

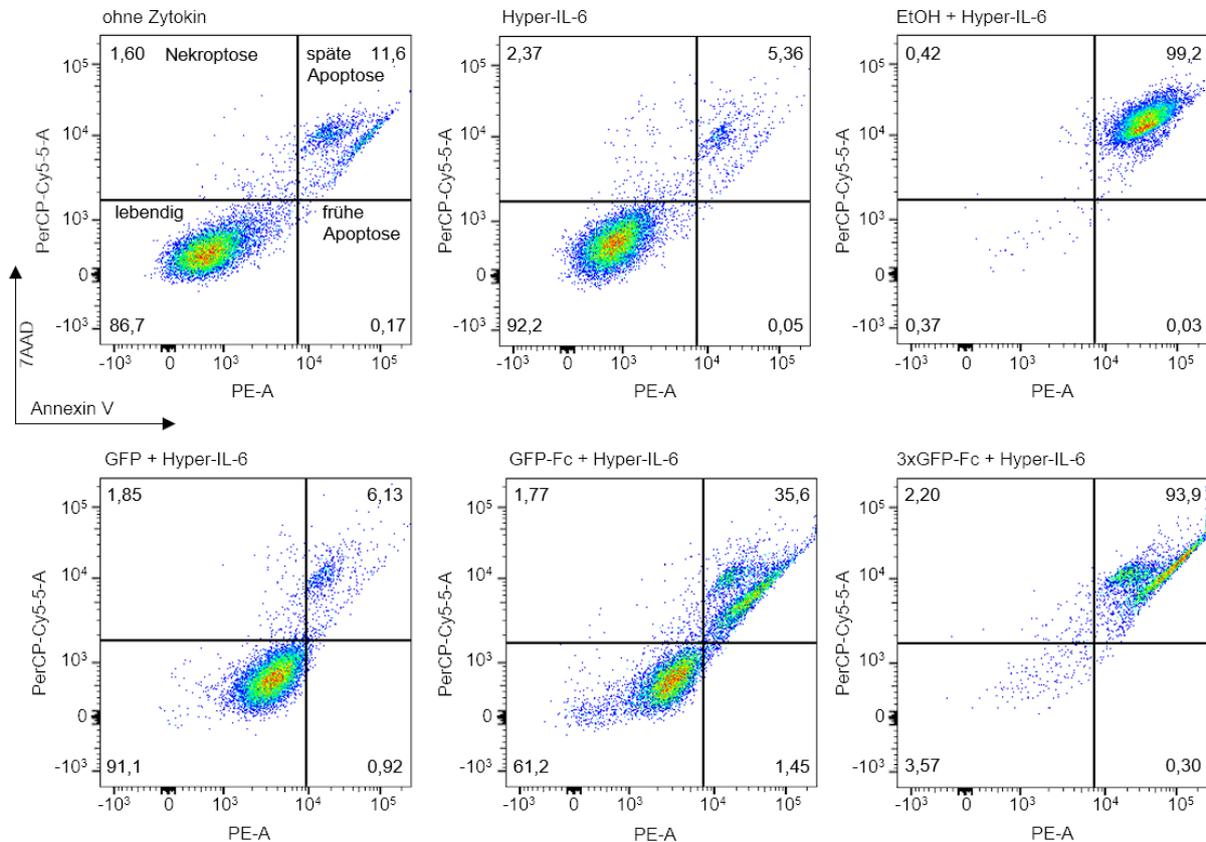


Abbildung 52: Zelltodanalyse mittels Annexin V und 7-AAD. Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}FasR Zellen wurden für 24 h ohne Zytokin oder mit je 10 ng/mL Hyper-IL-6 inkubiert. Bei manchen Bedingungen wurden die Zellen zusätzlich mit 100 ng/mL GFP, GFP-Fc oder 3xGFP-Fc inkubiert. Als Positivkontrolle für Zelltod wurden Zellen, welche für 24 h nur mit Hyper-IL-6 inkubiert wurden vor der Messung zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Die Zellen wurden gleichzeitig mit Annexin V und mit 7-AAD für 15 min inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist ein Experiment aus n=3 unabhängigen Experimenten.

Nach 24 h ohne Zytokin waren die meisten Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}FasR Zellen, welche ohne Zytokin inkubiert wurden, noch lebendig. Nur ca. 12 % waren bereits in später Apoptose. Bei einer Inkubation mit Hyper-IL-6 waren nahezu alle Zellen lebendig, wobei das Waschen dieser Zellen mit Ethanol zu 99 % Apoptose führte. Eine Inkubation mit monomerem GFP und Hyper-IL-6 wies keinen Unterschied zu einer Inkubation der Zellen nur mit Hyper-IL-6 auf. Die Analyse der Zellen, welche mit dimerem GFP-Fc und Hyper-IL-6 inkubiert wurden, zeigte, dass sich bereits 35 % der Zellen in später Apoptose befinden. Dieses Ergebnis stützt die Annahme, dass eine Aktivierung des FasR als Dimer zu einer vergleichsweise langsameren Aktivierung der Apoptose führt. Nach 48 h waren bereits bei 86 % der Zellen in später Apoptose. Nach 72 h, derselben Inkubationszeit wie bei einem Proliferationsassay, waren hingegen nahezu alle Zellen in später Apoptose (siehe Anhang **Abbildung 74**). Eine Inkubation von Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}FasR mit 3xGFP-Fc und Hyper-IL-6 bewirkte hingegen bereits nach 24 h eine vollständige Induktion von Apoptose.

Im Folgenden wurde eine Ba/F3/gp130 Zelllinie generiert, welche sowohl den FasR ($mCherry_{VHH}FasR$), als auch den gp130 ($GFP_{VHH}gp130$) Rezeptor als SyCyR exprimiert (**Abbildung 53A, B**).

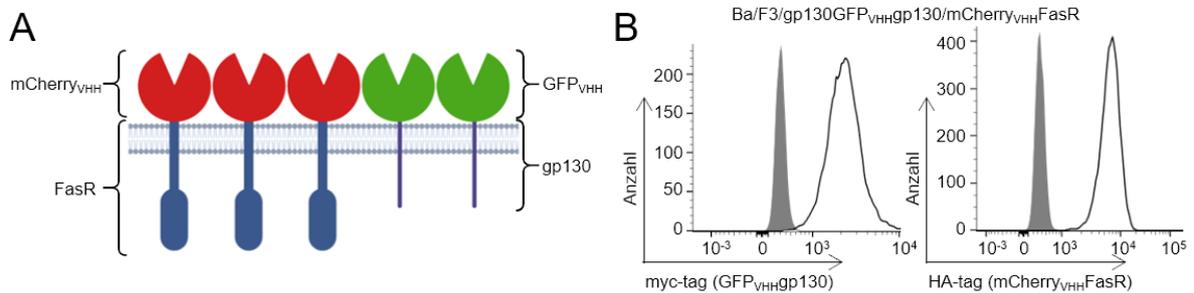


Abbildung 53: Schematische Darstellung der Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}FasR Zelllinie. (A) Der $mCherry_{VHH}FasR$ - und der $GFP_{VHH}gp130$ -SyCyR wurden gemeinsam in einer Zelllinie exprimiert. Die Abbildung wurde mit BioRender generiert. (B) Die Co-Oberflächenexpression von $GFP_{VHH}gp130$ (myc-tag) und $mCherry_{VHH}FasR$ (myc-tag) (durchgezogene Linie) in Ba/F3/gp130-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die graue Fläche zeigt die Ausgangs-Ba/F3/gp130-Zellen. Die Detektion erfolgte durch einen myc- und HA-Antikörper.

Unter Verwendung dieser Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen konnte nun in einer Zelllinie entweder Proliferation durch die Aktivierung des gp130-SyCyRs oder Apoptose durch die Stimulation des FasR-SyCyRs induziert werden. Die Aktivität der Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen wurde zunächst mittels Proliferationsassay analysiert. Hierbei wurde den Bedingungen, welche den $mCherry_{VHH}FasR$ aktivieren, je 10 ng/mL Hyper-IL-6 zugegeben (**Abbildung 54A**). Ein konzentrationsabhängiger Proliferationsassay verdeutlichte, dass die EC_{50} für GFP-Fc mit 7,4 ng/mL und die LC_{50} von 3xmCherry-Fc mit 0,6 ng/mL in einem ähnlichen Konzentrationsbereich liegen (**Abbildung 54B**).

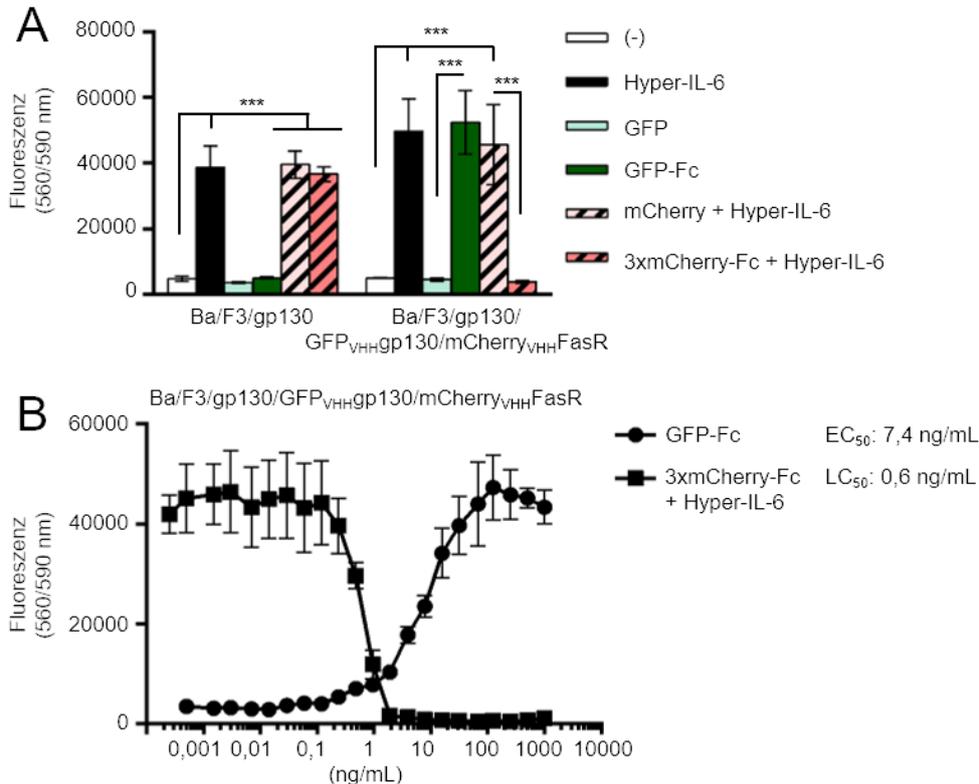


Abbildung 54: Aktivierung der Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}FasR Zelllinie. (A) Proliferation von Ba/F3/gp130 und Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL GFP, GFP-Fc, mCherry sowie 3xmCherry. Den Inkubationen mit mCherry und 3xmCherry-Fc wurden je 10 ng/mL Hyper-IL-6 zugefügt. (B) Proliferation von Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen mit steigenden Konzentrationen von 0,00025 – 1000 ng/mL GFP-Fc oder 3xmCherry-Fc. Dabei wurden allen 3xmCherry-Fc Konzentrationen je 10 ng/mL Hyper-IL-6 zugefügt. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$). Die Berechnung der EC₅₀ und LC₅₀ erfolgte mittels nichtlinearer Regression.

Die **Abbildung 54A** zeigt, dass Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen bei einer Inkubation mit Hyper-IL-6 oder GFP-Fc in gleicher Weise proliferierten. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen der Aktivierung des endogenen gp130-Rezeptors und des GFP_{VHH}gp130-SyCyRs. Weiterhin konnte in derselben Zelllinie durch eine Inkubation mit 3xmCherry-Fc durch den mCherry_{VHH}FasR-SyCyR Apoptose induziert werden. Der konzentrationsabhängige Proliferationsassay verdeutlichte einen spiegelbildlichen Verlauf der Proliferation mit GFP-Fc oder 3xmCherry-Fc + Hyper-IL-6. Durch eine Inkubation mit höheren Konzentrationen von GFP-Fc waren die Zellen genauso vital, wie bei einer Inkubation mit niedrigen Konzentrationen von 3xmCherry-Fc + Hyper-IL-6. Höhere Konzentrationen von 3xmCherry-Fc + Hyper-IL-6 zeigten zudem einen ähnlichen Verlust der Proliferation, wie auch niedrige GFP-Fc Konzentrationen.

Dieselben Zellen wurden im Folgenden erneut in einem Proliferationsassay analysiert (**Abbildung 55**). Dabei wurden nun gleichzeitig der mCherry_{VHH}FasR und der GFP_{VHH}gp130 Rezeptor aktiviert.

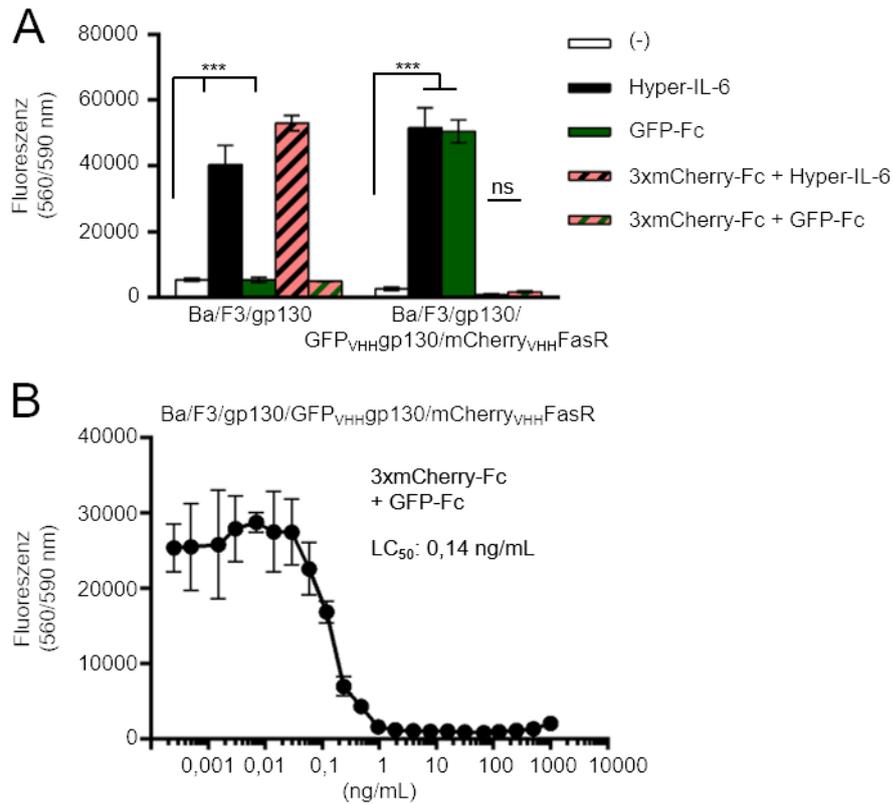


Abbildung 55: Gleichzeitige Aktivierung beider SyCyRs in Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}FasR Zelllinie. (A) Proliferation von Ba/F3/gp130 und Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL GFP-Fc. Den Inkubationen mit 3xmCherry-Fc wurden entweder 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL GFP-Fc zugefügt. **(B)** Proliferation von Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen mit steigenden Konzentrationen von 0,00025 – 1000 ng/mL 3xmCherry-Fc. Dabei wurden allen 3xmCherry-Fc Konzentrationen je 100 ng/mL GFP-Fc zugefügt. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$). Die Berechnung der EC₅₀ und LC₅₀ erfolgte mittels nichtlinearer Regression.

Die Proliferationsassays zeigten, dass es keinen Unterschied macht, ob der wildtypische gp130- oder der synthetische gp130-Rezeptor aktiviert wird. In beiden Fällen führte eine gleichzeitige Aktivierung des FasR durch 3xmCherry-Fc zu einem Verlust der Proliferation (**Abbildung 55A**). Auch der konzentrationsabhängige Proliferationsassay zeigte, dass durch die gleichzeitige Aktivierung der synthetischen Rezeptoren gp130 und FasR es zu einer ähnlichen LC₅₀ von 0,14 ng/mL kam, wie wenn der wildtypische gp130 Rezeptor stimuliert wurde (**Abbildung 55B**).

Anschließend wurde die Aktivierung der Signaltransduktion mittels Western Blot analysiert. Der Anteil der Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen, bei welchem der gp130-SyCyR stimuliert wurde, wurde mit PBS gewaschen, 6 h *gestarvt* und dann für 15 – 20 min stimuliert. Der Anteil der Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen, bei welchem der FasR-SyCyR stimuliert wurde, wurde direkt für 6 h mit den jeweiligen Liganden stimuliert (**Abbildung 56**).

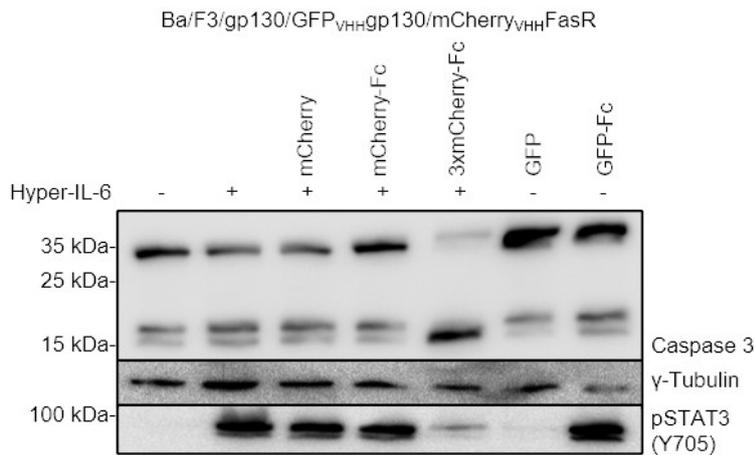


Abbildung 56: Analyse der Aktivierung der Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}FasR Zelllinie per Western Blot. Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen wurden für 6 h mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 und 100 ng/mL mCherry, mCherry-Fc oder 3xmCherry-Fc stimuliert. Die Stimulation mit 100 ng/mL GFP und GFP-Fc erfolgte für 15 – 20 min. Gleiche Mengen an Protein (50 µg pro Spur) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen Caspase-3, γ-Tubulin und pSTAT3 detektiert. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten.

Die Analyse der Stimulation zeigte, dass eine Induktion von Apoptose durch 3xmCherry-Fc zu einer vollständigen Aktivierung der Caspase-3 führt, da nahezu keine Pro-Caspase-3 mehr detektiert werden konnte. Die Stimulation bewirkte weiterhin, dass kaum pSTAT3 nachweisbar war. Dies lässt sich durch die fortgeschrittene Apoptose erklären, welche das Erliegen jeglicher Signaltransduktion bewirkt. Die Stimulation des gp130-SyCyRs derselben Zelllinie zeigte eine spezifische Phosphorylierung von STAT3 nach einer Stimulation mit dimerem GFP-Fc, jedoch nicht durch eine Stimulation mit monomerem GFP.

Mit der Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}FasR Zelllinie wurde ebenfalls ein Annexin V Bindeassay durchgeführt, um die Aktivierung von Apoptose durch den FasR-SyCyR zu verifizieren (**Abbildung 57**).

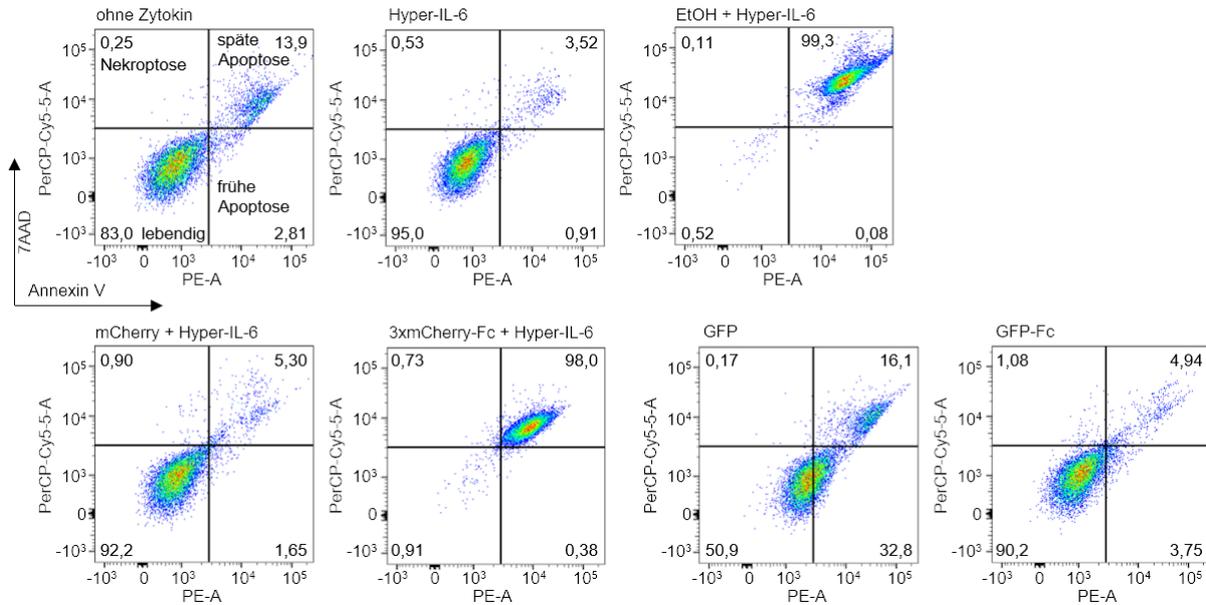


Abbildung 57: Zelltod-Analysen mittels Annexin V und 7-AAD. Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen wurden für 24 h ohne Zytokin oder mit je 10 ng/mL Hyper-IL-6 und 100 ng/mL mCherry oder 3xmCherry-Fc inkubiert. Die Inkubation mit 100 ng/mL GFP oder GFP-Fc erfolgte ohne den Zusatz von Hyper-IL-6. Als Positivkontrolle für Zelltod wurden Zellen, welche für 24 h nur mit Hyper-IL-6 inkubiert wurden vor der Messung zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Die Zellen wurden gleichzeitig mit Annexin V und mit 7-AAD für 15 min inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist ein Experiment aus n=3 unabhängigen Experimenten.

Die Analyse der Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen erfolgte nach 24 h. Ohne Zytokin waren nur ca. 14 % der Zellen apoptotisch, während 95 % der Zellen, welche mit Hyper-IL-6 inkubiert wurden, lebendig waren. Der Verlust der Zytokin-abhängigen Proliferation bewirkte demnach nur ein langsames Absterben der Zellen. Eine Inkubation mit 3xmCherry-Fc führte, ebenso wie ein Waschen der Zellen mit Ethanol, zu einer vollständigen Aktivierung von Apoptose. Die Aktivierung des gp130-SyCyRs durch GFP-Fc zeigte, dass zu 90 % der Zellen die Vitalität behielten, während eine Inkubation mit monomerem GFP, wie auch eine Inkubation ohne Zytokin, zu einem langsamen Verlust der Vitalität führten.

Die Ergebnisse zeigten, dass mittels der SyCyR Technologie innerhalb einer Zelllinie durch die Aktivierung des jeweiligen SyCyRs sehr genau zwischen Proliferation und Apoptose unterschieden werden kann. Es bestätigte sich demnach erneut die hohe Spezifität dieser Kombination aus synthetischen Liganden und Rezeptoren, welche hintergrundfrei erfolgt.

Im Folgenden wurde dies weiter analysiert durch die Verwendung eines mutierten FasR. 1999 entdeckten Peters und Kollegen bei Patienten mit einem autoimmunen Canale-Smith Syndrom eine Punktmutation in der Death Domain des FasR [180]. Die Punktmutation von Adenin zu Guanin an der Position 1009 bewirkt einen Aminosäureaustausch von Glutaminsäure zu Glycin (E256G) und führt zu einem vollständigen Verlust der Fas-induzierten Apoptose [180]. Mittels Mutagenese-PCR wurde diese Punktmutation in die intrazelluläre Domäne des

mCherry_{VHH}FasR eingebracht (**Abbildung 58A**) und der mutierte SyCyR in Ba/F3/gp130-Zellen stabil transduziert (**Abbildung 58B**, Sequenz siehe Anhang **Abbildung 72**).

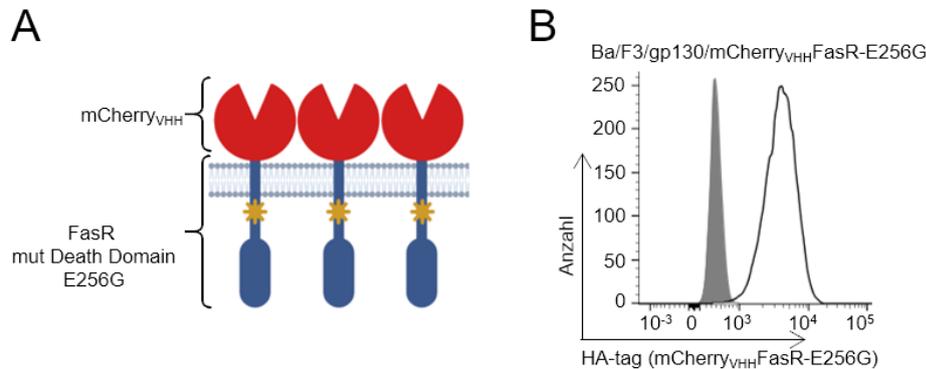


Abbildung 58: Schematische Darstellung des mutierten mCherry_{VHH}FasR-E256G-SyCyRs. (A) Die Mutation in der Death Domain des FasR erfolgte an der AS-Position 256 und wurde per Mutagenese-PCR eingefügt. Die Mutation ist als gelber Stern dargestellt. Die Abbildung wurde mit BioRender generiert. (B) Die Oberflächenexpression von mCherry_{VHH}FasR-E256G (HA-tag) (durchgezogene Linie) in Ba/F3/gp130-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die graue Fläche zeigt die ursprünglichen Ba/F3/gp130-Zellen. Die Detektion erfolgte durch einen HA-Antikörper.

Die Aktivität des mCherry_{VHH}FasR-E256G Rezeptors wurde per Proliferationsassay (**Abbildung 59A**) und Western Blot (**Abbildung 59B**) analysiert.

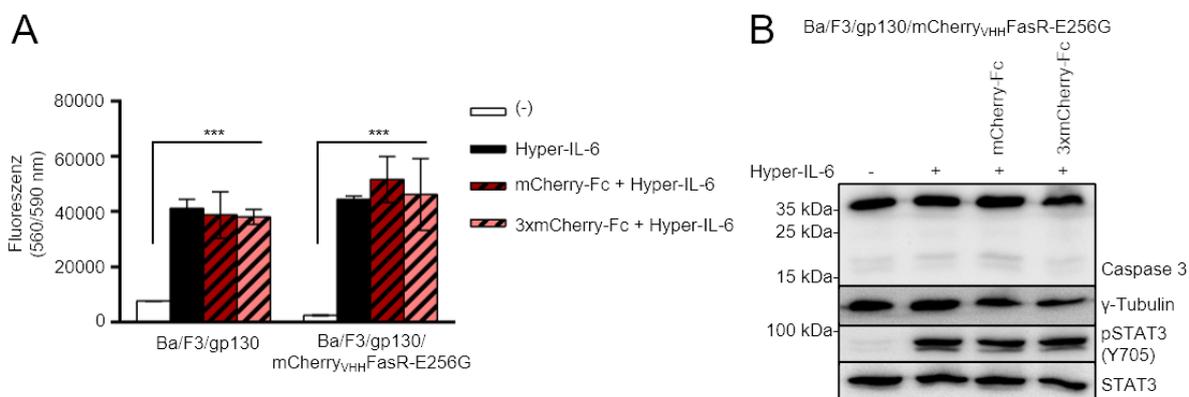


Abbildung 59: Analyse der Aktivierung des mCherry_{VHH}FasR-E256G-SyCyRs. (A) Proliferation von Ba/F3/gp130 und Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}FasR-E256G Zellen ohne Zytokin, mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL mCherry-Fc, 3xmCherry-Fc, wobei letzteren Bedingungen je 10 ng/mL Hyper-IL-6 zugefügt wurden. (B) Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen wurden für 6 h je mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen bei zwei Bedingungen auch mit 100 ng/mL mCherry-Fc und 3xmCherry-Fc stimuliert. Gleiche Mengen an Protein (50 µg pro Spur) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen Caspase-3, γ-Tubulin, pSTAT3 und STAT3 detektiert. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines two-way ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt (p ≤ 0,05 = *, p ≤ 0,01 = **, p ≤ 0,001 = ***).

Die Proliferation von Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}FasR-E256G Zellen zeigte, dass weder durch eine Inkubation der Zellen mit mCherry-Fc noch durch eine Inkubation mit 3xmCherry-Fc die durch Hyper-IL-6-induzierte Proliferation beeinträchtigt wurde. Auch eine Analyse im Western Blot veranschaulicht, dass der mutierte mCherry_{VHH}FasR-E256G Rezeptor nicht mehr in der Lage ist, Caspase-3 zu aktivieren und somit Apoptose zu induzieren.

Die Ergebnisse des inaktiven, mutierten mCherry_{VHH}FasR-E256G Rezeptors verdeutlichen, dass die zuvor gezeigte Apoptose der Ba/F3/gp130-Zellen ausschließlich auf die Aktivierung des synthetische FasR zurückzuführen ist und es keine auto-Aktivierung des Rezeptors gab.

3.5 Modifizierung des SyCyR-Systems für eine klinische Anwendung.

Die vorangegangenen Ergebnisse veranschaulichen die vielfältige Anwendbarkeit des synthetischen Zytokinrezeptorsystems. So wurde gezeigt, dass Zytokinrezeptoren verschiedener Klassen als SyCyR mittels synthetischer Liganden aktiviert werden können. Diese Analyse diverser SyCyRs, welche unterschiedliche Signalwege induzieren, kann z.B. bei einer Erweiterung der CAR T-Zell Technologie von Nutzen sein. Dabei könnten die SyCyRs gemeinsam mit dem CAR mittels 2A-Peptid transduziert [181] werden und je nach Entwicklung des Krankheitszustandes des Patienten aktiviert werden. Erschöpfte T-Zellen, könnten z.B. durch eine Stimulation des gp130- oder IL-10R2-SyCyRs neu aktiviert werden. Zudem gibt es viele Patienten, welche auf Grund eines *cytokine release syndrome* (CRS) intensivmedizinisch behandelt werden müssen und zum Teil auch versterben. Bei diesen Patienten könnte durch eine Aktivierung des FasR-SyCyRs die Apoptose der CAR T-Zellen induziert werden, was ggf. zu einer Abschwächung des CRS führt. Für eine solche Anwendung ist es jedoch notwendig das SyCyR-System umzubauen, da eine wiederholte Stimulation der SyCyRs mit GFP- oder mCherry-Fusionsproteinen Immunreaktionen hervorrufen würde.

Eine Möglichkeit eines solchen neuen Aufbaus der SyCyRs besteht in der Verwendung von PD-1 und PD-L1. Bei PD-1 handelt es sich um *programmed cell death 1*, einen T-Zell Rezeptor, der 1992 von Tasuku Honjo als Apoptose-assoziiertes Molekül identifiziert wurde [182]. PD-1 wird auf aktivierten CD4 und CD8 T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen exprimiert [183-185]. Der entsprechende Ligand PD-L1 wurde 1999 von Chen und Kollegen identifiziert [186]. Bei PD-L1 handelt es sich um einen membranständigen Liganden, welcher z.B. auf T- und B-Zellen, Makrophagen oder dendritischen Zellen exprimiert wird [184]. Die Interaktion von PD-1 und PD-L1 zeigte deren Rolle in der negativen Regulation von Immunantworten [187, 188]. PD-1 induzierte Signalwege inhibieren den Glukosestoffwechsel von T-Lymphozyten, die Zytokinproduktion, Proliferation und das Überleben der Zellen [189]. Der Ligand PD-L1 wird von manchen Tumoren verstärkt exprimiert und seine Bindung an PD-1 bewirkt eine Inhibierung des Immunsystems, wobei PD-1 exprimierende T-Zellen erschöpft werden und den Tumor tolerieren [190]. Es wurden daher diverse therapeutische Ansätze entwickelt, welche die Bindung von PD-1 an PD-L1 durch den Einsatz von anti-PD-1 Antikörpern verhindern [191].

Für die Weiterentwicklung des SyCyR-Systems wurde die extrazelluläre Domäne von PD-1 per SOE-PCR an die TMD und ICD von gp130 fusioniert (Sequenz siehe Anhang **Abbildung**

73). Die Aktivierung des SyCyRs soll durch die Bindung von PD-1-gp130 an PD-L1-Fc erfolgen. Hierfür wurde die extrazelluläre Domäne von PD-L1, welche für die Bindung an PD-1 verantwortlich ist, mit einer Fc-Domäne eines humanen IgG Antikörpers fusioniert (**Abbildung 60A**, Sequenz siehe Anhang **Abbildung 73**). Es wurden CHO K1 Zellen transfiziert und durch Einzelklonselektion wurden stabile PD-L2-Fc exprimierende CHO K1 Zellen generiert. In Abschnitt 3.1 konnte bereits gezeigt werden, dass eine solche Fc-Dimerisierung des zuvor monomeren Liganden ausreichend sein kann, um einen gp130-SyCyR zu aktivieren. Das PD-1-gp130 Fusionsprotein wurde stabil in Ba/F3/gp130-Zellen transduziert (**Abbildung 60B**).

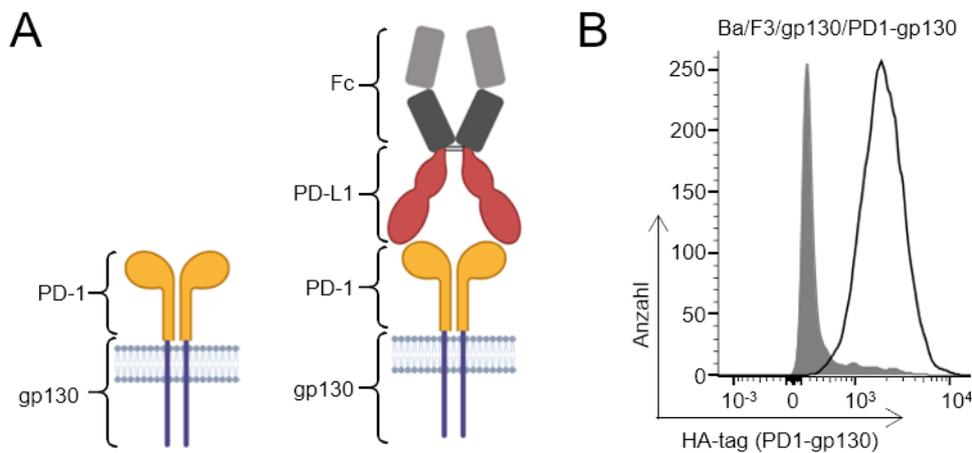


Abbildung 60: Aufbau des PD-1-gp130-SyCyRs. (A) Die extrazelluläre Domäne des gp130-Rezeptors (lila) wurde mittels SOE-PCR durch die ECD von PD-1 (gelb) ersetzt. Ebenfalls wurde die ECD von PD-L1 (rot) mit einer Fc-Domäne (grau) fusioniert, was zu einem PD-L1-Fc Dimer führt. Der Dimer kann nun an den PD-1-gp130 Rezeptor binden und diesen aktivieren. Die Abbildung wurde mit BioRender generiert. (B) Die Oberflächenexpression von PD-1-gp130 (HA-tag) (durchgezogene Linie) in Ba/F3/gp130-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Die graue Fläche zeigt die ursprünglichen Ba/F3/gp130-Zellen. Die Detektion erfolgte durch einen HA-Antikörper.

Die Aktivierung des PD-1-gp130 SyCyRs wurde per Proliferationsassay (**Abbildung 61A**) und Western Blot (**Abbildung 61B**) analysiert.

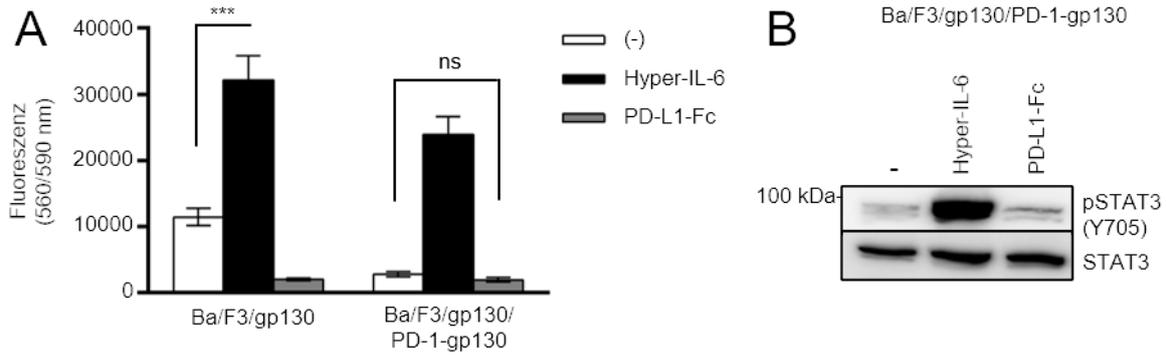


Abbildung 61: Aktivierung des PD-1-gp130-SyCyRs durch PD-L1-Fc. (A) Ba/F3/gp130 und Ba/F3/gp130/PD-1-gp130 Zellen wurden mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL PD-L1-Fc inkubiert und die Proliferation nach 72 h bestimmt. (B) Ba/F3/gp130/PD-1-gp130 Zellen wurden für 20 min mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 100 ng/mL PD-L1-Fc stimuliert und die Phosphorylierung von STAT3 mittels Western Blot analysiert. Gleiche Mengen an Protein (50 µg pro Spur) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen pSTAT3 und STAT3 detektiert. Dargestellt ist ein unabhängiges Experiment aus n=3 Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines two-way ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$).

Der Proliferationsassay zeigte, dass Ba/F3/gp130/PD-1-gp130 Zellen nicht in der Lage sind, mit PD-L1-Fc als synthetischen Liganden zu proliferieren. Auch eine Analyse der Signaltransduktion per Western Blot zeigte, dass es zu keiner Phosphorylierung von STAT3 nach einer Stimulation mit PD-L1-Fc kommt. Es ist daher möglich, dass eine Fc-Dimerisierung von PD-L1 nicht in der erforderlichen Distanz erfolgt, welche für eine Dimerisierung von gp130 notwendig wäre. Weiterhin kann jedoch auch die Struktur von PD-1 als extrazelluläre Domäne der Grund für die fehlende Aktivierung von gp130 sein. Eine weitere Entwicklung ähnlicher Rezeptor-Liganden-Paare als Teil des SyCyR-Systems wären daher notwendig, um die Methode für eine klinische Anwendung einsetzbar zu machen.

4. Diskussion

Innerhalb dieser Dissertation wurde die Signaltransduktion diverser Rezeptoren anhand eines synthetischen Rezeptorsystems analysiert. Die Zytokin-induzierte Signaltransduktion ist essenziell für die Regulation des Immunsystems [192]. Diese wird durch die Bindung des Zytokins an seine Rezeptoren induziert, welche eine Konformationsänderung des Rezeptorkomplexes bewirkt und somit die Transphosphorylierung der Januskinasen ermöglicht [39, 74, 75, 193]. Die phosphorylierten Kinasen bewirken dann die Aktivierung der jeweiligen Signalwege, wie z.B. den JAK/STAT, PI3K/AKT oder MAPK Signalweg [194]. Zytokine und auch Zytokinrezeptoren besitzen innerhalb einer Familie meist ähnliche Strukturen, was zu einer gewissen Redundanz in ihrer Signaltransduktion führt [22, 23]. Es ist daher ungemein wichtig, Systeme zu entwickeln, welche die Wirkweise von Zytokinen hintergrundfrei und spezifisch analysieren können. Das 2018 von Engelowski und Kollegen entwickelte synthetische Zytokinrezeptorsystem (SyCyR) stellt ein solches Werkzeug dar [29]. Das System ist modular aufgebaut mit einem Nanobody gegen GFP oder mCherry als extrazelluläre Domäne und der TMD und ICD des zu analysierenden Rezeptors [35, 36]. Die Aktivierung dieser SyCyRs erfolgt ebenfalls durch synthetische Zytokine, welche aus GFP- und mCherry-Fusionsproteinen bestehen [29]. Nanobodies und auch die Fluoreszenzproteine GFP und mCherry eignen sich für dieses System, da bereits an Säugetieren gezeigt wurde, dass sie für deren Zellen nicht toxisch sind [195-197]. Diese synthetischen Liganden wurden in CHO K1 Zellen exprimiert, welche mittlerweile standardisiert für die Herstellung rekombinanter Proteine eingesetzt werden [198]. Die in CHO K1 Zellen exprimierten Fusionsproteine weisen eine hohe Stabilität auf, jedoch fehlte es bisher an einer Strategie zur Reinigung der synthetischen Liganden aus dem Zellkulturüberstand [29, 169].

4.1 Fc-Fusionsproteine aktivieren die Signaltransduktion von gp130

Eine solche Strategie wurde im Abschnitt 3.1 dieser Arbeit thematisiert. GFP und mCherry sowie die Fusionsproteine GFP-mCherry, 2xGFP-mCherry, 3xGFP und 3xmCherry wurden dafür über einen Linker mit der Fc-Domäne eines humanen IgG-Antikörpers fusioniert [169]. Die Fc-Domäne eines IgG-Antikörpers wird in der Biotechnologie für diverse Funktionen eingesetzt. Der Fc-Tag eignet sich z.B. für eine Ein-Schritt-Reinigung von Fc-Fusionsproteinen mittels Protein-A Sepharose oder aber als Dimerisierungswerkzeug [199]. Im Folgenden wurden diese beiden Eigenschaften für die Optimierung der Expression von synthetischen Liganden genutzt. Wie in Abschnitt 3.1 und 3.3 gezeigt, wurden die genannten Fc-Fusionsproteine erfolgreich in CHO K1 Zellen exprimiert und mittels Protein-A Affinitätschromatographie gereinigt. Die Dimerisierung der Liganden wurde ebenfalls mittels reduzierender und nicht reduzierender Coomassiegele nachgewiesen. Um die Aktivität der gereinigten synthetischen Liganden zu testen, wurden gp130-SyCyRs verwendet [169]. gp130

ist als Homodimer aktiv und bewirkt die Induktion des JAK/STAT Signalwegs [61, 62]. Die Funktionalität des gp130-SyCyRs wurde bereits nachgewiesen, weswegen er für die Analyse der Fc-Fusionsproteine verwendet wurde [29]. Die Analysen der Aktivität der Fusionsproteine erfolgte in Ba/F3/gp130-Zellen, welche ausschließlich zytokinabhängig proliferieren. Ba/F3/gp130-Zellen proliferieren mit Hyper-IL-6 über das wildtypische gp130, weshalb sie für eine Vergleichsstudie mit gp130-SyCyRs geeignet waren.

Es konnte gezeigt werden, dass GFP- und mCherry-Fc die Proliferation und die Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 in Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}gp130 oder in Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}gp130 Zellen bewirkt. Die Aktivierung der SyCyRs erfolgte hierbei im gleichen Maße, wie die durch den wildtypischen gp130 Rezeptor mit Hyper-IL-6 induzierte Signaltransduktion. Der Abstand, welchen die GFP- oder mCherry-Proteine durch die Fc-Dimerisierung haben, passt demnach genau, um die Aktivierung des homodimeren gp130-Rezeptors zu gewährleisten. Hierbei ermöglichte die Verwendung der Fc-Fusionsproteine zudem eine einfache Reinigung via Protein-A Sepharose und eine verbesserte Stabilität der Proteine im Vergleich zu den zuvor verwendeten GFP-GFP oder mCherry-mCherry Fusionsproteinen [169].

Die Analyse der durch GFP-mCherry-Fc und 2xGFP-mCherry-Fc induzierten Signaltransduktion hat gezeigt, dass die Positionen von GFP und mCherry in dem generierten Heterotetramer (GFP-mCherry-Fc-Fc-mCherry-GFP) entscheidend sind für eine effiziente Rezeptoraktivierung [169]. Es konnte gezeigt werden, dass der Heterotetramer in der Lage ist, mCherry_{VHH}gp130-SyCyRs zu aktivieren, aber nicht GFP_{VHH}gp130-SyCyRs. Dies liegt vermutlich daran, dass Zytokinrezeptoren in einer nahen Juxtaposition vorliegen müssen, um effizient aktiviert zu werden [200]. Der Abstand der beiden GFP Moleküle in GFP-mCherry-Fc ist demnach bereits zu groß für eine effiziente Aktivierung, da sowohl die Proliferation als auch die Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 nur in geringem Maße erfolgte. Der Heterotetramer kann demnach zukünftig dazu eingesetzt werden, die Aktivität von zwei SyCyRs genau zu steuern und zwei Rezeptoren in unterschiedlicher Intensität zu aktivieren. Während der mCherry_{VHH}-SyCyR vollständig durch den mCherry-Dimer aktiviert wird, führt der distanzierte GFP-Dimer nur zu einer minimalen Aktivierung des GFP_{VHH}-SyCyRs [169]. Im Gegensatz dazu führte eine Stimulation der Zellen mit 2xGFP-mCherry-Fc Heterohexamer zu einer gleichen Aktivierung der GFP_{VHH}gp130- und mCherry_{VHH}gp130-SyCyRs.

Die Ausbeuten der Expression der Fc-Fusionsproteine haben mit zunehmender Proteingröße immer weiter abgenommen. Dies konnte bereits bei weiteren Proteinen, welche in CHO K1 Zellen exprimiert wurden, beobachtet werden. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass bei CHO K1 Zellen, unabhängig vom Protein, ein zunehmendes Molekulargewicht zu einer schlechteren Expression führt. Eine weitere Möglichkeit zur Expression der

Fluoreszenzproteine stellen Pflanzen dar. Wie in Mossner *et al.* 2020 gezeigt wurde konnten GFP und mCherry Trimere erfolgreich in *Nicotiana bethamiana* Blättern exprimiert werden [169]. Dabei waren die Ausbeuten hier mit 200 mg (GFP₃) und 5 mg (mCherry₃) pro kg Blatt deutlich höher als bei der Expression in CHO K1 Zellen [169]. Auch die Aktivität der pflanzlichen, synthetischen Liganden wurde in Ba/F3/gp130-Zellen analysiert und es zeigte sich, dass diese Proteine noch effektivere Aktivatoren des SyCyR-Systems darstellen [169].

Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Ausbeute stellt die Expression der Proteine in ExpiCHO-S™ oder Expi293F™ Zellen dar. Hierbei handelt es sich um CHO K1 oder HEK293 Zellen, welche für die Expression rekombinanter Proteine optimiert wurden [201]. Die Zellen wurden adaptiert in hohen Zelldichten und in speziellem serum-freiem Medium als Suspensionszelllinie zu wachsen [201]. Die Transfektion erfolgt transient und die Expression der Proteine wird über ein eigenes Reagenz induziert. Dabei werden in einem Ansatz ähnliche Expressionsmengen erreicht, wie ansonsten in ca. 20 separaten Ansätzen, wodurch Zeit, Material und Medium gespart werden können [202].

Insgesamt konnte die Expression der synthetischen Liganden durch die Verwendung von Fc-Fusionsproteinen deutlich verbessert werden. Die Expression der Proteine in CHO K1 Zellen hat dabei den Vorteil, dass diese im Vergleich zu einer Expression in Bakterien Endotoxin-frei ist. Die gereinigten Proteine sind in PBS gelöst und können demnach direkt für eine *in vivo* Anwendung eingesetzt werden. Auch eine Expression in Pflanzen oder ExpiCHO-S™ Zellen bietet einen solchen Vorteil. Das vollständig synthetische Ligand-Rezeptor-System ermöglicht somit die Analyse neuer Hetero- oder Homorezeptorpaare oder noch höher geordneter Rezeptor-Cluster [169]. Das System stellt somit eine Erweiterung zu bereits bestehenden Synthekinen dar, welche nicht-natürliche Rezeptorkombinationen erzwingen und somit nicht-natürliche, einzigartige Signalwege erschaffen [1].

4.2 Synthetische Rezeptoren kopieren die IL-22 Signaltransduktion

Bisher wurde die Funktionalität des steuerbaren synthetischen Zytokinrezeptor-Systems ausschließlich mit Rezeptoren der IL-6-/IL-12-Zytokinfamilie analysiert [29, 169]. In Abschnitt 3.2 konnte daher erstmals gezeigt werden, dass das SyCyR-System auch auf andere Zytokinrezeptorklassen übertragbar ist. Es wurden hierbei biologisch aktive SyCyRs für IL-22 generiert. Der Austausch der extrazellulären Domäne des Zytokinrezeptors mit einem Nanobody, welcher den Liganden bindet, ist demnach wahrscheinlich für eine große Auswahl an Zytokinrezeptoren, welche mit Tyrosinkinasen assoziieren, anwendbar.

Die beiden IL-22 bindenden Rezeptoren IL-22Rα1 und IL-10R2 gehören zur Zytokinrezeptor-Familie Klasse II [203]. Die Unterschiede zwischen Klasse I und Klasse II Zytokinrezeptoren

beziehen sich auf die extrazelluläre Domäne [204], welche für das SyCyR-System gegen einen Nanobody ausgetauscht wurde. Demnach war es zu erwarten, dass das SyCyR-System auch auf Klasse II Zytokinrezeptoren übertragbar war. Beide Rezeptoren wurden stabil in Ba/F3/gp130-Zellen transduziert und die Signaltransduktion von IL-22 zunächst anhand der vollständigen, wildtypischen Rezeptoren analysiert. Der langkettige Rezeptor IL-22R α 1 ist hauptsächlich mit Jak1, der kurzkettige IL-10R2 mit Tyk2 assoziiert [178, 203]. Nach einer Stimulation der Zellen mit IL-22 konnte die Phosphorylierung von Jak1 und Tyk1 sowie STAT3 und ERK1/2 nachgewiesen werden. Die Zelllinie Ba/F3/gp130 eignete sich demnach für diese Art der Analyse, da nach einer Stimulation der in der Literatur benannte Signalweg von IL-22 aktiviert wurde. Die generierten IL-22-SyCyRs wurden ebenfalls stabil in Ba/F3/gp130-Zellen transduziert und zeigten nach einer heterodimeren Stimulation mit GFP-mCherry ebenfalls eine Phosphorylierung von Jak1, Tyk2, STAT3, ERK1/2. Die durch IL-22 (Wildtyp) oder GFP-mCherry (SyCyR) induzierten Signalwege wurden ferner in einem Microarray analysiert. Der Vergleich von 28944 Genen zeigte hierbei, dass die überwiegende Mehrheit der Gene gleich reguliert wurde.

Der IL-10R2 wird auf vielen Zellen im Körper exprimiert, während der IL-22R α 1 hauptsächlich auf Epithelzellen exprimiert wird [83, 106]. Im Darmepithel ist IL-22 für die Immunhomöostase sowie die Wundheilung verantwortlich [205]. Es spielt jedoch auch bei der Pathogenese diverser Darmerkrankungen eine entscheidende Rolle und ist daher ein vielversprechendes Ziel therapeutischer Ansätze [206]. Das hier entwickelte synthetische IL-22 System kann daher bei der Analyse von pro- und anti-inflammatorischen Reaktionen in verschiedenen Zelltypen von Nutzen sein. Bisher wurden die synthetischen Rezeptoren in Zellen stets überexprimiert, was gegebenenfalls zu einer artifiziellen Signaltransduktion führen kann. Es ist demnach notwendig, die SyCyRs unter einem endogenen Promotor zu exprimieren. Dies ist durch eine gezielte Integration ins Genom z.B. mittels CRISPR-Cas9 möglich. Weiter kann eine Analyse der IL-22-SyCyRs in Cre-induzierbaren, transgenen Mäusen dazu genutzt werden, die Funktion von IL-22 gewebespezifisch zu untersuchen. Mittels dieser Tiere könnte die IL-22 Signaltransduktion auch in verschiedenen Krankheitsmodellen weiter untersucht werden.

4.3 Der IL-10R2-Homodimer kann eine Signaltransduktion induzieren

Die Stimulation der IL-22-SyCyR Zellen offenbarte zusätzlich, dass auch eine homodimere Stimulation des IL-10R2 zu einer Aktivierung der Signaltransduktion führt. Die Verwendung des SyCyR-Systems ermöglicht es, Rezeptoren zu dimerisieren, für welche bisher keine natürlichen Zytokine bekannt sind oder es keine gibt. Dies erfolgte auch bei einer homodimeren Stimulation der beiden IL-22 Rezeptoren. Die intrazelluläre Domäne des langkettigen IL-22R α 1 ist 346 AS lang und weist ein mögliches Box1 (AS 255-262) und Box2 (AS 282-287) Motiv für die Bindung von Jak1 auf sowie weitere kanonische Aktivierungsstellen

für Signaltransduktionsmoleküle wie z.B. STATs und ERK1/2 [174]. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass eine homodimere Stimulation des Rezeptors zu einer Signaltransduktion führt, da dies bereits für die Homodimerisierung von diversen weiteren, langkettigen Rezeptoren wie gp130, IL-12R β 2 und den IL-23R gezeigt wurde [9, 29, 207]. Überraschend wurde jedoch nach einer homodimeren Stimulation weder die Aktivierung von Jak1 oder STAT noch zelluläre Proliferation induziert. Dabei konnte die Bindung von GFP-Fc an den GFP_{VHH} des IL-22R α 1 per Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Der IL-22R α 1-SyCyR ist demnach in dieser Form als Homodimer biologisch inaktiv. Es könnte jedoch sein, dass der IL-22R α 1-SyCyR mit einem alternativen Aufbau durchaus aktiv ist. Demnach ist z.B. der endogene Linker zwischen dem Nanobody und der Transmembrandomäne entweder zu kurz oder aber zu lang. Eine Variation dieses Bereiches könnte somit zu einer Aktivierung des Rezeptors führen. Ein weiterer Ansatz könnte die Verwendung des endogenen Linkers von z.B. gp130 sein, welcher biologisch aktiv ist.

Die intrazelluläre Domäne des IL-10R2 ist nur 76 AS lang und ihre Funktion wurde bisher in der alleinigen Rekrutierung von Tyk2 angesehen [178]. Ein Sequenzvergleich offenbarte keine klassischen Box1 oder Box2 Motive [208]. Im Gegensatz zu einer homodimeren Stimulation des IL-22R α 1 zeigte eine Homodimerisierung des IL-10R2 jedoch eine Aktivierung der Signaltransduktion. Der aktive IL-10R2 Homodimer bewirkte zelluläre Proliferation sowie die Phosphorylierung von STAT3, ERK1/2, Jak1, Tyk2 und auch Jak2. Ein Vergleich der als Homo- (mCherry_{VHH}IL-10R2) und Heterodimer (mCherry_{VHH}IL-10R2/GFP_{VHH}IL-22R α 1) induzierten Signaltransduktion erfolgte mittels Microarray und qPCR. Es zeigte sich hierbei, dass die durch den Homodimer transkribierten Gene nahezu vollständig den transkribierten Genen der heterodimeren Stimulation ähneln. Demnach ist der IL-10R2 in der Lage, allein nahezu dieselbe Transkription zu aktivieren wie der Heterodimer aus IL-22R α 1 und dem IL-10R2.

1996 haben Kotenko und Kollegen mittels chimärer Rezeptoren die homodimere Aktivierung des humanen IL-10R2 gezeigt, welche eine Phosphorylierung von STAT1 bewirkte [178]. Eine homodimere Aktivierung des wildtypischen IL-10R2 und IL-22R α 1 wurde versucht, mittels dimerem IL-22-Fc zu simulieren. Es zeigte sich hierbei jedoch keine zelluläre Proliferation. Dies könnte im Falle des IL-10R2 daran liegen, dass der wildtypische IL-10R2 nahezu keine Affinität zu IL-22 aufweist, eine typische Eigenschaft von Rezeptoren mit kurzen ICD [209, 210]. Erst die Bindung von IL-22 an den IL-22R α 1 erhöht die Affinität zum IL-10R2 und es kommt zu einer Bindung [87, 211-213]. Eine Inkubation von Ba/F3/gp130/IL-22R α 1 Zellen mit dimerem IL-22-Fc bewirkte jedoch ebenfalls keine Proliferation.

Das SyCyR-System stellt, ebenso wie der chimäre Ansatz von Kotenko, eine Plattform dar, mit dessen Hilfe Rezeptoren genauer analysiert werden können, welche allein keine Affinität

zu ihrem Zytokin aufweisen. Diese meist kurzkettigen Rezeptoren werden häufig pauschal als nicht-signalgebende Rezeptoren bezeichnet. Dabei konnte ihre potenzielle Signaltransduktion bisher noch nicht analysiert werden. Eine Immunpräzipitation des murinen IL-10R2 und der Kinasen Jak1, Jak2, Tyk2 bestätigte die Bindung dieser an den Rezeptor. Eine solche Analyse erfolgte bisher nur für Tyk2 und Jak2 mit dem humanen IL-10R2, welche die Bindung des humanen IL-10R2 an Tyk2 nachwies [178].

Die schrittweise Deletion der intrazellulären Domäne des IL-10R2 lässt vermuten, dass die Aminosäuren im Bereich 310 – 330 für die Weiterleitung der Signaltransduktion mittels STATs und ERK1/2 verantwortlich sind. Es war allerdings nicht möglich, die verantwortlichen Aminosäuren in diesem Bereich zu identifizieren. Ein mögliches SH3-Bindemotiv PxxP, welches eine Grb2 Bindestelle darstellt, wurde mutiert. Die Mutation zeigte jedoch nur einen schwachen Einfluss auf die Aktivierung von STAT3 und ERK1/2 [214, 215]. Grb2 ist in der Aktivierung des Ras/Raf/ MAPK Signalwegs involviert und besitzt, wie auch STATs, eine SH2-Domäne und bindet an phosphorylierte Tyrosine in einem pYxxQ-Motiv, welches im IL-10R2 jedoch nicht vorhanden ist [194]. Eine Tyrosin-unabhängige Aktivierung von STATs wurde bereits für den *granulocyte colony-stimulating factor receptor* (G-CSFR, STAT3), IL-22R α 1 (STAT3) und Interferon- α - β Rezeptor β (IFNAR2, STAT2) gezeigt und auch für weitere Zytokinrezeptoren vermutet [216-219]. Eine Konsensussequenz dieser nicht-kanonischen STAT-Aktivierung konnte jedoch nicht gefunden werden. Eine Deletion nach der Aminosäure 310 führte zu einer schwächeren Phosphorylierung von Jak1, doch erst die weitere Deletion (Δ 280) resultierte in einem vollständigen Verlust der Signaltransduktion. Jak1, Jak2 und Tyk2 Bindestellen befinden sich demnach voraussichtlich im Bereich 280 – 310 der intrazellulären Domäne.

Insgesamt konnte mit Hilfe synthetischer Rezeptoren gezeigt werden, dass der IL-10R2 auch als Homodimer einen ähnlichen Signalweg aktivieren kann, wie als Heterodimer mit dem IL-22R α 1. Ob diese Signaltransduktion endogen erfolgt ist fraglich, da bisher kein Zytokin identifiziert wurde, welches ausschließlich an den IL-10R2 bindet. Jedoch ist die Information, dass der IL-10R2 theoretisch als Homodimer aktiv sein kann, in Bezug auf seine ubiquitäre Expression und Beteiligung an verschiedenen Signalwegen als β -Rezeptor durchaus relevant.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der IL-10R2 auch biologisch aktive Heterodimere mit dem gp130-Rezeptor bilden kann, welcher der signalgebende Rezeptor bei IL-6 ist. Mittels der neuen SyCyR-Technik können somit auch Interaktionen zwischen verschiedenen Rezeptorfamilien analysiert werden welche, wie in diesem Beispiel gezeigt, funktional sein können. Eine solche Interaktion zwischen Rezeptoren verschiedener Familien scheint eine Gemeinsamkeit bei Rezeptoren zu sein, welche mit Januskinasen assoziiert sind [29].

4.4 Das SyCyR-System ist auf höhergeordnete Rezeptoren übertragbar

Bisher konnte gezeigt werden, dass das SyCyR-System für verschiedene Rezeptorklassen anwendbar ist. Es wurde sich dabei jedoch auf eine Aktivierung von dimeren Zytokinrezeptoren beschränkt [29, 169]. Auch weitere synthetische Systeme, wie die Anwendung von chimären Rezeptoren oder Synthekinen, sind auf die Analyse von dimeren Rezeptoren limitiert [9, 25]. In Abschnitt 3.3 und 3.4 konnte gezeigt werden, dass das SyCyR-System auch auf höher geordnete Rezeptoren der TNFR Superfamilie anwendbar ist.

4.4.1 Es gibt keinen *cross-talk* zwischen dem TNFR1 und TNFR2

Die TNFR-Superfamilie besteht aus 19 bekannten Liganden und 29 Rezeptoren und spielt bei der Regulation zellulärer Funktionen eine zentrale Rolle [117, 118]. Dabei interagieren die vorwiegend membrangebundenen Liganden der TNFR-Superfamilie meist mit mehreren Rezeptoren [117]. TNF α bindet z.B. an den TNFR1 und den TNFR2, wobei die beiden Rezeptoren verschiedenen Untergruppen zugeordnet werden. Der TNFR1 gehört zu den Todesrezeptoren, während der TNFR2 zu den nicht-Zelltod induzierenden Rezeptoren der TNFR-Superfamilie gehört [134]. Weiterhin können auch verschiedene Liganden der Superfamilie an denselben Rezeptor binden. Die Liganden LIGHT, FasL und TL1A binden z.B. an den *decoy receptor 3* (DcR3). Diese Bindung dient der Regulation von LIGHT- und FasL-induzierter Apoptose, da der Rezeptor DcR3 durch die Bindung der Liganden deren apoptotische Wirkung inhibiert [220]. Die TNFR-Superfamilie umfasst demnach diverse Mitglieder, welche sich unter anderem gegenseitig regulieren. Dies ermöglicht eine Bandbreite der Regulation durch Mitglieder der TNFR-Superfamilie, die von Überleben bis Zelltod reicht [133].

In Abschnitt 3.3 wurde die Funktionalität von trimeren SyCyRs am Beispiel des TNFR1 und TNFR2 nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der TNFR-SyCyRs in Ba/F3/gp130-Zellen zu einer Phosphorylierung des NF- κ B Inhibitors I κ B führt, wodurch die Transkription von NF- κ B Zielgenen induziert wurde. Im Falle des TNFR1 wurde bereits gezeigt, dass dieser sowohl das Überleben der Zelle als auch deren Tod induzieren kann [133]. Es wird hierbei je nach Zelltyp und Konstitution, der eine oder der andere Signalweg induziert [133]. Im Falle von Ba/F3/gp130-Zellen wurde stets das Überleben der Zellen durch die Aktivierung des NF- κ B Signalwegs mittels Komplex 1 induziert.

Weiterhin wurde analysiert, ob eine funktionale Interaktion zwischen dem TNFR1 und TNFR2 möglich ist. Hierfür wurden Ba/F3/gp130-Zellen mit beiden TNFR-SyCyRs stabil transduziert und mit 2xGFP-mCherry als Heterotrimer stimuliert. Diese Stimulation führte jedoch zu keiner Aktivierung des NF- κ B Signalwegs. Eine Stimulation derselben Zelllinie als Homotrimer führte

jedoch zu einer Signaltransduktion. Daher scheint es keine biologische Aktivität eines Heterotrimers aus TNFR1 und TNFR2 zu geben. Beide Rezeptoren werden gemeinsam z.B. auf Immunzellen, Endothelzellen und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert [117]. Da beide Rezeptoren durch denselben Liganden TNF α aktiviert werden, ist es für die Funktionalität der Rezeptoren daher essenziell, dass sie nicht als Heterotrimer aktiv sind. Bisher konnte eine solche, biologisch inaktive, Interaktion nicht nachgewiesen werden.

Auf Grund der zentralen Rolle bei der Regulation zellulärer Prozesse bewirkt eine Dysregulation der Mitglieder der TNFR-Superfamilie häufig die Entwicklung verschiedener Krankheiten. So führt eine autosomal dominant vererbte Mutation des TNFR1 zum Tumornekrosefaktor-Rezeptorassoziierten periodischen Syndrom (TRAPS), welches sich z.B. in Fieberschüben und Hautausschlägen äußert [221]. Weiterhin ist die Überexpression von TNF α auch an der Entwicklung von rheumatoider Arthritis (RA) beteiligt [222]. Im Zusammenhang mit RA sind derzeit fünf TNF-Inhibitoren in der Therapie zugelassen, welche sowohl lösliches (sTNF α) als auch membranständiges mTNF α mit verschiedenen Affinitäten binden können [223, 224]. Dies führt zu einer Milderung der Entzündungsreaktionen und verlangsamt den Krankheitsverlauf [224]. Auch in weiteren Erkrankungen wie z.B. *inflammatory bowel disease* (IBD) sind erhöhte TNF α Mengen an der Krankheitsentstehung beteiligt [225]. Hierbei ist jedoch eine selektive Hemmung von mTNF α und nicht sTNF α entscheidend für eine Remission [226]. mTNF α aktiviert vorwiegend den TNFR2, welcher dem Anschein nach die Hauptrolle bei IBD spielt [226]. Die vielseitige Beteiligung von TNF α , TNFR1 und TNFR2 bei diversen Erkrankungen zeigt, dass eine selektive und steuerbare Analyse dieser Rezeptoren in verschiedenen Erkrankungen notwendig ist, um weitere Therapien zu entwickeln. Unter Verwendung des SyCyR-Systems könnten demnach neue Therapieansätze entwickelt und Krankheitsbilder detaillierter analysiert werden. So könnte in Bezug auf den TNFR1 in verschiedenen Zellen/Geweben unter unterschiedlichen Bedingungen analysiert werden, welchen Signalweg der Rezeptor aktiviert. Die Stimulation des SyCyRs ermöglicht es hierbei, die alleinige Aktivierung des TNFR1 zu untersuchen. Dabei kann genauer bestimmt werden, unter welchen Gegebenheiten der TNFR1 das Überleben der Zelle oder den Zelltod einleitet. Gleichmaßen kann auch die alleinige Analyse des TNFR2 seine Rolle z.B. bei IBD weiter entschlüsseln. Besonders die TNFR-Superfamilie stellt eine breite Anwendbarkeit des SyCyR-Systems dar, da viele Rezeptoren denselben Liganden binden wie z.B. der Ligand *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), welcher an fünf verschiedene Rezeptoren binden kann [117]. Eine gezielte Analyse von je nur einem Rezeptor kann dabei neue Aufschlüsse über dessen Signaltransduktion liefern. Weiter kann auch eine Heterodimerisierung bzw. Heterotrimerisierung verschiedener Mitglieder der TNFR-Superfamilie oder weiterer Zytokinrezeptoren analysiert werden und ein *cross-talk* zwischen verschiedenen Rezeptorklassen, wie bei der IL-10 Familie, aufgedeckt werden.

4.4.2 Aktivierung von FasR-SyCyR führt zur Apoptose in Ba/F3/gp130-Zellen

1989 wurde der FasR parallel von zwei unterschiedlichen Gruppen als Apoptose-induzierender Rezeptor identifiziert [153, 227]. Der Rezeptor gehört, wie auch der TNFR1, zur Untergruppe Zelltod-induzierenden Rezeptoren und besitzt intrazellulär eine *Death Domain* (DD) [131]. Der FasR ist ein Typ I Transmembranrezeptor und liegt als vorassemblierter Trimer in der Zellmembran vor [228]. Diese trimere Anordnung des Rezeptors ist für die anschließende Initiierung der apoptotischen Kaskade notwendig, da diese durch die autokatalytische Aktivierung der Caspase-8 eingeleitet wird [157]. Der Ligand FasL ist ebenfalls ein Trimer und durch seine Bindung an den schon vorliegenden Rezeptortrimer wird die Bildung des *death inducing signaling complex* (DISC) eingeleitet. Der DISC induziert wiederum eine schnelle Apoptose der Zellen [158, 159]. Die Bindung des FasL an den FasR bewirkt eine Konformationsänderung der DD. Diese führt dann zu einer Rekrutierung weiterer FasR, welche durch den FasL zu Clustern zusammengefügt werden [160]. Diese Clusterbildung bewirkt, dass die Pro-Caspase-8, welche an den FasR assoziiert ist, in räumliche Nähe mit vielen weiteren Pro-Caspasen-8 kommt. Die folgende autokatalytische Aktivierung zu Caspase-8 erfolgt demnach umso schneller, je mehr Rezeptoren in einem Cluster zusammenkommen [141].

In dieser Arbeit wurde das SyCyR-System dazu verwendet, solche Cluster-Bildungen von synthetischen FasR in Ba/F3/gp130-Zellen zu analysieren. Der FasR-SyCyR wurde sowohl mit einem GFP_{VHH} als auch mit einem mCherry_{VHH} generiert. Es wurden die zelluläre Proliferation und die Aktivierung der Caspase-3 analysiert sowie eine Färbung mit Annexin V und 7-AAD durchgeführt. Ba/F3/gp130-Zellen proliferieren ausschließlich Zytokin-abhängig, weshalb für eine normale Vitalität der Zellen stets Hyper-IL-6 zu den Konditionen gegeben wurde. Es zeigte sich jedoch, dass die Aktivierung des FasR-SyCyRs durch den hexameren, synthetische Liganden trotzdem zu einem Verlust der zellulären Proliferation und einer Aktivierung der Caspase-3 führte. Zwischen der Verwendung des GFP_{VHH} oder mCherry_{VHH} zeigte sich dabei kein Unterschied. Wie bereits erwähnt, bildet der wildtypische FasR Cluster für eine schnelle Ausübung der induzierten Apoptose. Hier konnte jedoch festgestellt werden, dass bereits eine Aktivierung als Dimer zum Verlust der zellulären Proliferation führte. Dabei erfolgte diese Analyse nach einer Inkubationszeit von 72 h. Hingegen wurde die Aktivierung von Caspase-3 ausschließlich nach einer Inkubation mit dem hexameren Liganden nachgewiesen. Diese Analyse erfolgte nach einer Stimulationszeit von 6 h. Die Färbung der Zellen mit Annexin V und 7-AAD zeigte, dass die durch dimere Liganden aktivierten FasR-SyCyRs zwar Apoptose induzieren, dies jedoch zeitlich verzögert tun. Eine Analyse der Zellen nach 24 h zeigte bereits eine schwache Induktion von Apoptose bei den Zellen, welche als Dimer aktiviert wurden. Nach 48 h war der Anteil der apoptotischen Zellen bereits deutlich

größer und nach 72 h waren alle Zellen apoptotisch. Eine Aktivierung als Trimer bzw. Cluster bewirkte hingegen bereits nach 24 h die vollständige Aktivierung von Apoptose. Auch ein Vergleich der zellulären Proliferation von Ba/F3/gp130/mCherry_{VHH}FasR Zellen mit trimerem oder hexamerem mCherry zeigte, dass es zu einer etwas schwächeren IC₅₀ nach einer Inkubation mit 3xmCherry kommt.

Der FasR ist zwar ein trimerer Rezeptor, jedoch zeigt er auch als Dimer bereits eine leicht abgeschwächte Aktivität. Eine Rekrutierung als Cluster scheint ebenfalls die Aktivität des FasR im Vergleich zu einer trimeren Aktivierung zu steigern. Dies kann damit zusammenhängen, dass die Pro-Caspase-8 sich im DISC autokatalytisch aktiviert [141]. Die Aktivierung des FasR bewirkt eine Dimerisierung der Pro-Caspase-8, welche in einer autokatalytischen Spaltung des Pro-Caspase-8 Monomers in eine große und eine kleine Untereinheit resultiert [229]. Diese Untereinheiten stabilisieren den Dimer und initiieren die Aktivierung der Effektorcaspase-3 [141]. Die dimere Aktivität des FasR wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben, was an der fehlenden Möglichkeit einer solchen Aktivierung liegt, da der FasL nur als Trimer vorliegt. Diese Art der Analyse ist anhand des SyCyR-Systems nun auch für weitere Rezeptoren möglich.

Die Anwendung des GFP_{VHH}gp130- und mCherry_{VHH}FasR-SyCyRs in einer Zelllinie zeigte eine mögliche kombinatorische Anwendbarkeit des Systems. Die Zellen können sowohl über die Aktivierung von GFP_{VHH}gp130 durch GFP-Fc proliferieren als auch durch die Aktivierung des mCherry_{VHH}FasR-SyCyRs in Apoptose gebracht werden. Dabei zeigte sich kein Unterschied zu einer Aktivierung der SyCyRs in Zellen, welche nur einen Rezeptor exprimieren. Auch können beide SyCyRs gleichzeitig aktiviert werden und zeigten dabei keinen Unterschied in ihrer Signaltransduktion. Dies verdeutlicht erneut die Spezifität und dadurch hintergrundfreie Aktivierung des Systems. Weiterhin zeigte die Analyse des FasR-SyCyRs mit der mutierten DD, dass die zuvor gezeigte Apoptose ausschließlich durch den aktiven FasR-SyCyR induziert wurde, da eine Stimulation des mutierten Rezeptors keinerlei Effekt zeigte.

Die Mutation der DD des FasR wurde in Patienten mit autoimmunem lymphoproliferativem Syndrom (ALPS) identifiziert [180]. Diese Erkrankung kann durch diverse Mutationen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) der *death domain* (DD) des FasR hervorgerufen werden [230]. Eine Analyse, ob die Mutationen zu einer Abschwächung des apoptotischen Potenzials oder zum vollständigen Verlust dieses führen, könnte in Zukunft unter Verwendung des SyCyR-Systems erfolgen (**Abbildung 62**).

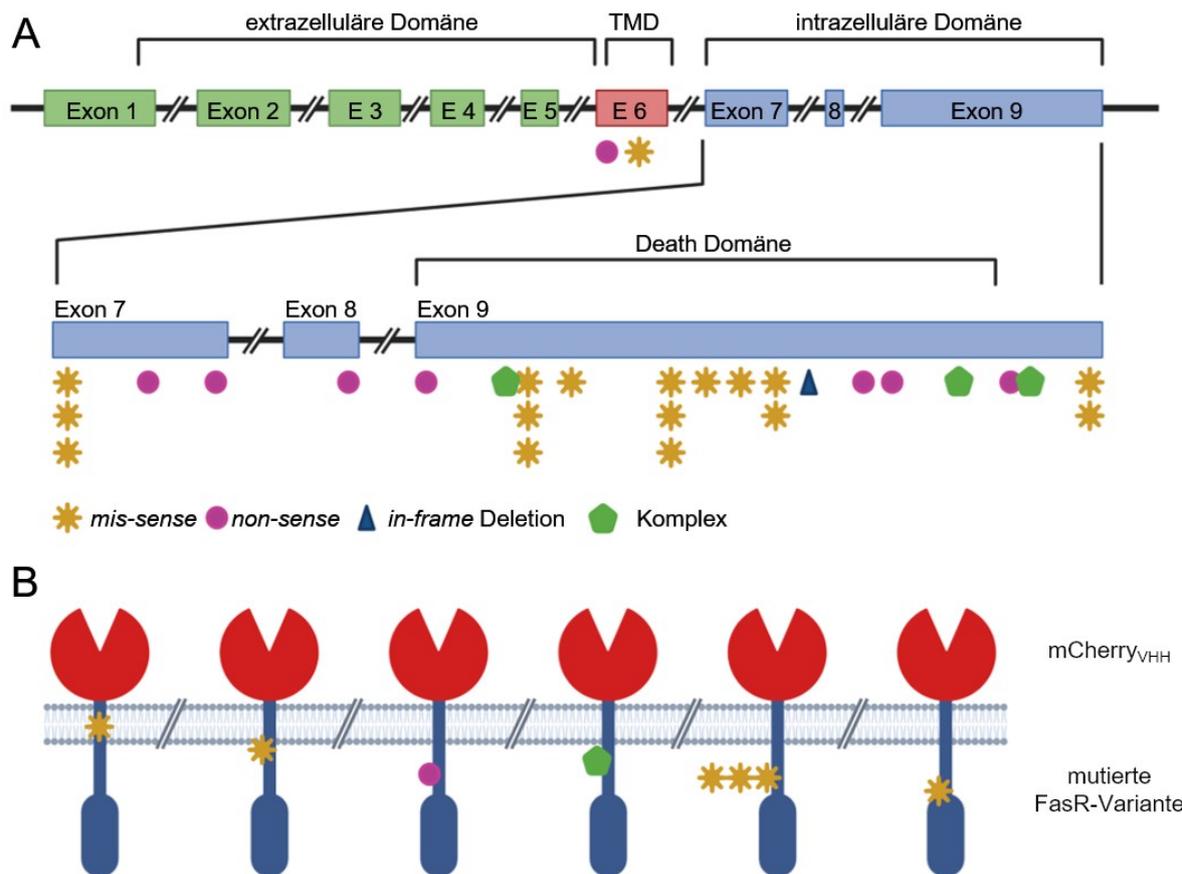


Abbildung 62: Screening diverser SNPs in der TMD und ICD des FasR unter Verwendung des SyCyR-Systems. (A) Schematische Darstellung der FasR Sequenz. Exon 1- 5 (grün) bilden die extrazelluläre Domäne, Exon 6 (rot) kodiert die Transmembrandomäne und Exon 7 – 9 (blau) beinhalten die Sequenzen für die intrazelluläre Domäne. Exon 9 der ICD umfasst dabei die Death Domäne des Rezeptors. Beispielhaft sind SNPs der TMD und ICD eingezeichnet: *missense* (gelb), *non-sense* (pink), *in-frame* Deletion (blau), Komplex (grün). **(B)** Schematische Darstellung generierter FasR-SyCyRs mit entsprechenden Mutationen der TMD und ICD. Die Abbildung wurde mit BioRender generiert und modifiziert nach Price *et al.* [231].

Die meisten Mutationen, welche ALPS verursachen, liegen im Bereich der DD des FasR [231]. Die Mutation liegt dabei meist heterozygot vor, da eine homozygote Mutation der Death Domäne zumeist letal ist [232]. Bei einer Vielzahl bekannter Mutationen ist es noch nicht bekannt, welchen Einfluss sie auf die Funktion des FasR haben, da es bisher kein System gab, um diese zu untersuchen. Anhand des SyCyR-Systems können dadurch Mutationen gezielt sowohl als Homotrimer, als auch als Heterotrimer in Kombination mit dem wildtypischen FasR-SyCyR analysiert werden. Hierbei sind besonders SNPs interessant, welche zu einem Aminosäureaustausch führen (*missense*) oder auch *in-frame* Deletionen.

Weiterhin wird der FasR in diversen Tumoren verstärkt exprimiert, was zu der Hoffnung führte, diesen durch die Aktivierung des FasR leicht eliminieren zu können [153]. Ein solcher Ansatz führte jedoch zu erheblichen Nebenwirkungen mit massiven Leberschäden durch Fas-induzierte Apoptose [233]. Demnach zeigte die Verwendung eines agonistischen anti-Fas Antikörpers in Mäusen, dass bereits 50 % der Tiere bei einer Dosierung von 10 µg des Antikörpers innerhalb von 8 h verstarben [233]. Ursache hierfür waren massive Leberschäden.

So waren bereits nach 2 h in vielen Bereichen der Leber starke Blutungen zu erkennen und die meisten Hepatozyten waren apoptotisch [233]. Normalerweise werden tote Zellen über Phagozytose entfernt, jedoch untergingen hier deutlich mehr Zellen Apoptose, als phagozytiert werden konnten. Dieses Fas-induzierte Leberversagen könnte demnach als Modellsystem für Hepatitis weiter mit Hilfe der SyCyR-Technologie untersucht werden. Später wurde erkannt, dass der FasR eher ein Tumorpromoter als -suppressor ist [163-165]. Dabei zeigte sich, dass eine starke Aktivität der Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) die Aggregation des FasR verhindert [234]. Das Resultat der nachgeschalteten PI3K-Signalkaskade ist die Interaktion von phosphoryliertem astrozytischen Phosphoprotein-15 (PEA-15) mit FADD, wodurch die Formation des DISC-Komplex und somit eine Aktivierung von Apoptose verhindert wird [235, 236]. Der FasR ist weiterhin in der Lage, den MAPK- und NF- κ B-Signalweg zu aktivieren, jedoch ist dieser Mechanismus noch unbekannt [163]. Eine weitere Analyse des FasR im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen und unterschiedlichen Signalwegen kann durch das SyCyR-System in diversen Zelltypen oder Geweben detailliert entschlüsselt werden. Der schaltbare synthetische Ansatz ermöglicht es dabei, das System bei starken Nebenwirkungen schnell und gezielt abzuschalten. Dies kann zum einen durch das Stoppen der Ligandenzugabe und zum anderen durch den Einsatz von GFP oder mCherry Nanobodies erfolgen. Wie bereits gezeigt wurde, können löslichen Nanobodies an die synthetischen Liganden binden und verhindern somit, dass die Liganden an die synthetischen Rezeptoren binden und diese aktivieren [29].

4.5 Zukünftige Anwendung des SyCyR-Systems

In Zell-basierten Versuchen konnte bereits für verschiedene Rezeptorarten die Funktionalität des SyCyR-Systems nachgewiesen werden. Einen weiteren Schritt stellt nun die Anwendung des Systems *in vivo* dar. Erste Versuche mittels hydrodynamischer Injektion haben hier bereits die Aktivität der SyCyRs *in vivo* bestätigt [29].

Des Weiteren wurden in Kooperation mit der Firma Cyagen über die CRISPR-Cas9 Methode Mäuse generiert, welche den GFP_{VHH}gp130 und mCherry_{VHH}FasR exprimieren (**Abbildung 63**).

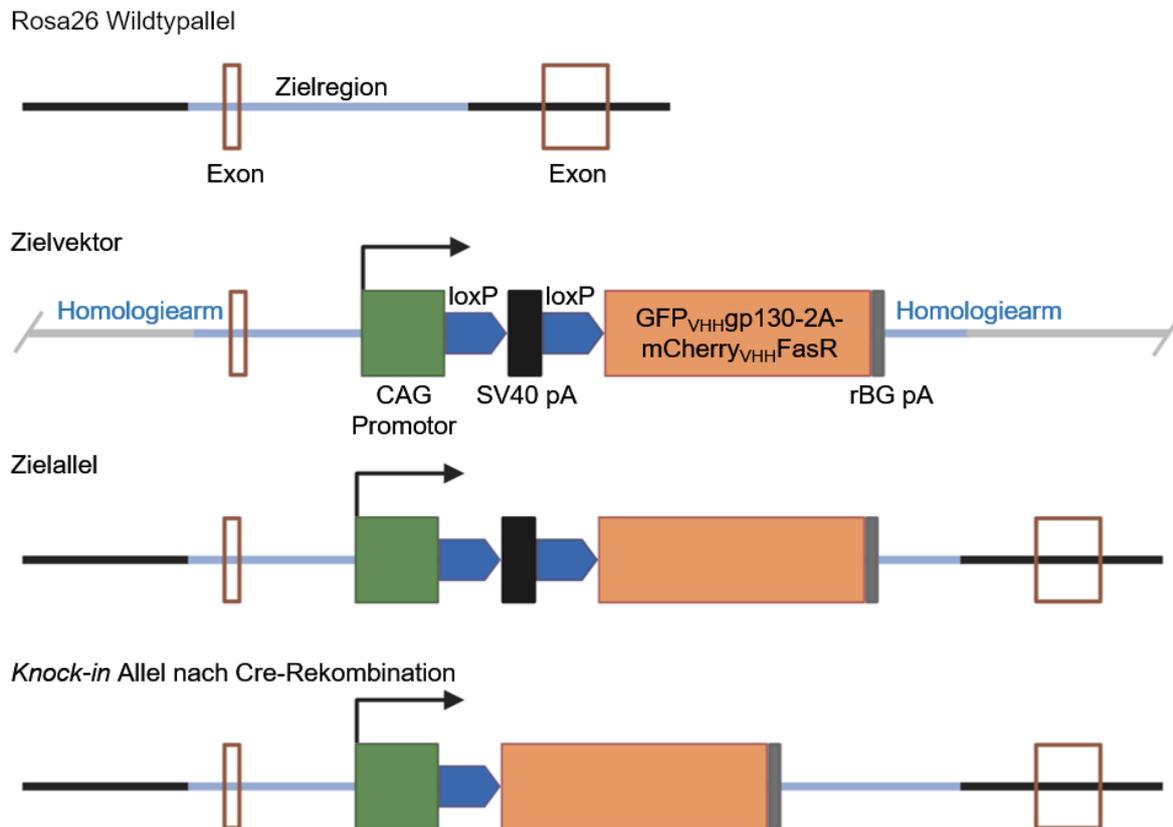


Abbildung 63: Schematische Darstellung der knock-in Strategie der transgenen SyCyR-Mäuse. Die Zielregion des knock-in im Rosa26 Allel und des Homologiearms sind in hellblau dargestellt, die flankierenden Exons in braun. Aufbau der knock-in Sequenz: CAG-Promotor (grün), loxP (blau), SV40 pA Stopcodon (schwarz), SyCyR-Sequenz (orange), rBG pA Stopcodon (grau). Die Abbildung wurde mit BioRender generiert.

Die beiden SyCyRs wurden dabei in das Intron 1 (Zielregion) des Rosa26 Gens eingefügt, welches auf dem Maus-Chromosom 6 liegt. Dafür wurde der Zielvektor zusammen mit einer *guidance* RNA (gRNA) für das Rosa26 Allel und der mRNA für Cas9 in befruchtete Eizellen injiziert [237]. Die resultierenden knock-in-Mäuse wurden per PCR identifiziert und mit wildtypischen Mäusen verpaart, um eine Keimbahnübertragung zu testen. Diese Tiere besitzen zwar die SyCyR-Gene, jedoch befindet sich nach dem CAG-Promotor das Stopcodon SV40 pA, welches wiederum von zwei loxP-Sequenzen flankiert wird. Eine Verpaarung dieser Tiere mit Cre-Aktivator Tieren führt dazu, dass die Cre-Rekombinase das Stopcodon zwischen den loxP-Sequenzen durch Rekombination entfernt, was in der Transkription der SyCyR-Sequenz resultiert [238]. Dieses Cre/loxP-System ermöglicht es, die SyCyRs gewebespezifisch zu exprimieren, da die loxP-Tiere mit Cre-Tieren verpaart werden können, welche die Cre-Rekombinase nur in bestimmten Geweben oder Zelltypen exprimieren [239]. Eine Expression der SyCyRs in Hepatozyten könnte demnach dazu verwendet werden durch die Aktivierung des FasR-SyCyRs einen akuten Leberschaden hervorzurufen. Die anschließende Aktivierung des gp130-SyCyRs könnte dann im Folgenden dazu genutzt werden den Einfluss von IL-6 *trans-signaling* auf die Leberregeneration zu analysieren [240].

Es ergeben sich somit neuartige Methoden, Krankheitsbilder zum einen zu generieren und zum anderen zu behandeln.

Um eine weitreichende Nutzung des SyCyR-Systems zu erreichen, ist es jedoch notwendig das System weiterzuentwickeln. Es wurde zwar gezeigt, dass GFP- oder mCherry-Fusionsproteine auf Säugetierzellen nicht toxisch wirken, jedoch kann eine mehrfache Injektion mit diesen zu einer Immunantwort führen [195-197]. In Folge einer wiederholten Injektion der synthetischen Liganden würde das Immunsystem Antikörper gegen diese entwickeln, was zum einen zu einer Immunantwort führen würde und zum anderen die Aktivierung der synthetischen Rezeptoren inhibiert. Daher ist es notwendig, einen synthetischen Liganden zu entwickeln, bei welchem bekannt ist, dass dieser keine Immunreaktion im Menschen hervorruft.

Eine Möglichkeit stellte die Verwendung von PD-1 als extrazelluläre Domäne und PD-L1-Fc als semi-synthetischen Liganden dar. Bei PD-L1 handelt es sich um ein Protein, welches auch endogen exprimiert wird, weshalb hier keine Immunreaktion ausgelöst werden würde. Jedoch kann PD-L1 deswegen auch weiterhin endogen exprimiertes PD-1 aktivieren. Dadurch würde es zu einer Hintergrundaktivität des endogenen Rezeptors kommen, und der Vorteil des SyCyR-Systems, seine Rezeptoren spezifisch zu aktivieren, wäre zunichte. Weiterhin zeigte der Versuch in Ba/F3/gp130-Zellen, dass es zu keiner Aktivierung von PD-1-gp130 durch PD-L1-Fc kam.

Eine weitere Möglichkeit stellt die Anwendung von Nanobodies als Liganden dar. Nanobodies sind bereits für verschiedene klinische Anwendungen zugelassen und können daher ohne toxikologischen Test eingesetzt werden [241]. Zusätzlich sind die Proteine aufgrund ihrer geringen Größe in der Lage, jegliche Gewebe zu erreichen und auch die Blut-Hirn-Schranke zu passieren [242]. Als extrazelluläre Domäne dieses Systems würde dabei das Protein oder Fragment dienen, welches der jeweilige Nanobody bindet. Hierbei könnten auch neue Nanobodies durch die Immunisierung von Lamas mit dem als extrazelluläre Domäne verwendeten Protein generiert werden.

Das bisherige System könnte in seinem jetzigen Aufbau bereits für die Verbesserung der CAR T-Zell-Technologie verwendet werden, da in diesem Zusammenhang ggf. nur eine einmalige Injektion des synthetischen Liganden notwendig wäre. Bereits *ex vivo* könnte die Verwendung von z.B. gp130- oder IL-10R2-SyCyRs zu einer schnelleren Expansion der generierten CAR T-Zellen führen. Bisher werden hierfür *chronic myeloid leukemia* Zellen (K562) als Fütterzellen verwendet, welche die T-Zellen in einem aktiven Zustand halten [243]. Des Weiteren stellen erschöpfte T-Zellen und damit verbundene Dysfunktionen eine erhebliche Limitierung der CAR T-Zell Technologie dar [244]. Eine Stimulation der SyCyRs im Patienten hätte dabei die

Möglichkeit, diese erschöpften T-Zellen neu zu reaktivieren. Im Gegensatz dazu könnte die Verwendung eines PD-1-SyCyRs dazu genutzt werden CAR T-Zellen zu inhibieren. Dies kann bei einer Verschlechterung des Gesundheitszustandes des Patienten dazu genutzt werden, die Aktivität der CAR T-Zellen für eine gewisse Zeit zu blockieren. Ist die Therapie abgeschlossen oder das Leben des Patienten durch die CAR T-Therapie akut in Gefahr, kann die Verwendung eines FasR-SyCyRs genutzt werden, um die CAR T-Zellen schnell zu eliminieren. Dabei wurde gezeigt, dass die Aktivierung des FasR-SyCyRs sehr schnell Apoptose induziert [158, 159]. Ein Vorteil der genannten synthetischen Rezeptoren ist es, dass sie alle als Homodimer oder -trimer aktiv sind. Es ist daher nicht notwendig, einen weiteren Rezeptor für die Induktion der jeweiligen Signaltransduktion zu transfizieren.

5. Literaturverzeichnis

1. Jürgen Scheller, E.E., Jens M Moll, Doreen M Floss, *Immunoreceptor Engineering and Synthetic Cytokine Signaling for Therapeutics*. Trends in Immunology, 2019. **40**(3): p. 258-272.
2. Deboki Chakravarti, W.W.W., *Synthetic Biology in Cell-Based Cancer Immunotherapy*. Trends in Biotechnology, 2015. **33**: p. 449-461.
3. U Hemmann, C.G., B Heesel, J Sasse, G Kurapkat, J Grötzinger, A Wollmer, Z Zhong, J E Darnell Jr, L Graeve, P C Heinrich, F Horn, *Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(22): p. 12999-13007.
4. Sandra Rebouissou, M.A., Gabrielle Couchy, Karine Poussin, Sandrine Imbeaud, Camilla Pilati, Tina Izard, Charles Balabaud, Paulette Bioulac-Sage, Jessica Zucman-Rossi, *Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours*. Nature, 2009. **457**(7226): p. 200-204.
5. Dirk Schmidt-Arras, M.M., Marija Stevanovic, Silke Horn, Antje Schütt, Juri Bergmann, Ruven Wilkens, Annett Lickert, Stefan Rose-John, *Oncogenic deletion mutants of gp130 signal from intracellular compartments*. Journal of Cell Science, 2014. **127**(2): p. 341-353.
6. Karine Poussin, C.P., Gabrielle Couchy, Julien Calderaro, Paulette Bioulac-Sage, Yannick Bacq, Valérie Paradis, Emmanuelle Leteurtre, Nathalie Sturm, Jeanne Ramos, Catherine Guettier, Armelle Bardier-Dupas, Anais Boulai, Dominique Wendum, Janick Selves, Tina Izard, Jean-Charles Nault & Jessica Zucman-Rossi, *Biochemical and functional analyses of gp130 mutants unveil JAK1 as a novel therapeutic target in human inflammatory hepatocellular adenoma*. OncoImmunology, 2013. **2**(12): p. e27090.
7. Christiane Stuhlmann-Laeisz, S.L., Athena Chalaris, Paliga Krzysztof, Sudarman Enge, Jutta Eichler, Ursula Klingmüller, Michael Samuel, Matthias Ernst, Stefan Rose-John, Jürgen Scheller, *Forced dimerization of gp130 leads to constitutive STAT3 activation, cytokine-independent growth, and blockade of differentiation of embryonic stem cells*. Molecular Biology of the Cell, 2006. **17**(7): p. 2986-2995.
8. Larissa Lamertz, D.M.F., Jürgen Scheller, *Combined deletion of the fibronectin-type III domains and the stalk region results in ligand-independent, constitutive activation of the Interleukin 6 signal-transducing receptor gp130*. Cytokine, 2018. **110**: p. 428-434.
9. D. M. Floss, M.S., M. Franke, F. C. Horstmeier, E. Engelowski, A. Schneider, E. M. Rosenfeldt & J. Scheller, *IL-6/IL-12 Cytokine Receptor Shuffling of Extra- and Intracellular Domains Reveals Canonical STAT Activation via Synthetic IL-35 and IL-39 Signaling*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 15172.
10. Amelia E Firor, A.J., Yupo Ma, *From humble beginnings to success in the clinic: Chimeric antigen receptor-modified T-cells and implications for immunotherapy*. Experimental Biology and Medicine, 2015. **240**(8): p. 1087-1098.
11. Donald B Kohn, G.D., Renier Brentjens, Barbara Savoldo, Michael Jensen, Laurence JN Cooper, Carl H June, Steven Rosenberg, Michel Sadelain, Helen E Heslop, *CARs on track in the clinic: workshop of the blood and marrow transplant clinical trials network subcommittee on cell and gene therapy*. Molecular Therapy, 2011. **19**(3): p. 432-438.
12. Wen Si, C.L., Ping Wei, *Synthetic immunology: T-cell engineering and adoptive immunotherapy*. Synthetic and Systems Biotechnology, 2018. **3**(3): p. 179-185.
13. Christopher C Kloss, M.C., Marc Cartellieri, Michael Bachmann, Michel Sadelain, *Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells*. Nature Biotechnology, 2013. **31**(1): p. 71-75.

14. Victor D Fedorov, M.T., Michel Sadelain, *PD-1– and CTLA-4–Based Inhibitory Chimeric Antigen Receptors (iCARs) Divert Off-Target Immunotherapy Responses*. Science Translational Medicine, 2013. **5**(215): p. 215ra172.
15. Michel Sadelain, I.R., Stanley Riddell, *Therapeutic T cell engineering*. Nature, 2017. **545**(7655): p. 423-431.
16. G Dotti, H.E.H., *Current status of genetic modification of T cells for cancer treatment*. Cytotherapy, 2005. **7**(3): p. 262-272.
17. Claudia Rossig, M.K.B., *Genetic modification of T lymphocytes for adoptive immunotherapy*. Molecular Therapy, 2004. **10**(1): p. 5-18.
18. Ettore Biagi, V.M., Greta Maria Paola Giordano Attianese, Erica Dander, Giovanna D'Amico, Andrea Biondi, *Chimeric T-cell receptors: new challenges for targeted immunotherapy in hematologic malignancies*. Haematologica, 2007. **92**: p. 381-388.
19. Diogo Gomes-Silva, C.A.R., *Cancer Immunotherapy Using CAR-T Cells: From the Research Bench to the Assembly Line*. Biotechnology Journal, 2017. **13**(2): p. 10.1002/biot.201700097.
20. James N. Kochenderfer , M.E.D., Sadik H. Kassim , Robert P.T. Somerville , Robert O. Carpenter , Maryalice Stetler-Stevenson James C. Yang , Giao Q. Phan , Marybeth S. Hughes , Richard M. Sherry , Mark Raffeld , Steven Feldman , Lily Lu , Yong F. Li , Lien T. Ngo , Andre Goy , Tatyana Feldman , David E. Spaner , Michael L. Wang , Clara C. Chen , Sarah M. Kranick , Avindra Nath , Debbie-Ann N. Nathan , Kathleen E. Morton , Mary Ann Toomey , Steven A. Rosenberg, *Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor*. Journal of Clinical Oncology, 2015. **33**(6): p. 540-549.
21. Marco Ruella, J.X., David M. Barrett, Joseph A. Fraietta, Tyler J. Reich, David E. Ambrose, Michael Klichinsky, Olga Shestova, Prachi R. Patel, Irina Kulikovskaya, Farzana Nazimuddin, Vijay G. Bhoj, Elena J. Orlando, Terry J. Fry, Hans Bitter, Shannon L. Maude, Bruce L. Levine, Christopher L. Nobles, Frederic D. Bushman, Regina M. Young, John Scholler, Saar I. Gill, Carl H. June, Stephan A. Grupp, Simon F. Lacey & J. Joseph Melenhorst, *Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell*. Nature Medicine, 2018. **24**(10): p. 1499-1503.
22. M Michallet, F.M., M Delain, A Hellmann, A Rosas, R T Silver, C Tendler, PEG-Intron CML Study Group, *Pegylated recombinant interferon alpha-2b vs recombinant interferon alpha-2b for the initial treatment of chronic-phase chronic myelogenous leukemia: a phase III study*. Leukemia, 2004. **18**(2): p. 309-315.
23. Laura A Pachella, L.T.M., Joyce E Dains, *The toxicity and benefit of various dosing strategies for interleukin-2 in metastatic melanoma and renal cell carcinoma*. Journal of the Advanced Practitioner in Oncology, 2015. **6**(3): p. 212-221.
24. E Sporeno, R.S., L Ciapponi, G Paonessa, A Cabibbo, A Lahm, K Pulkki, R X Sun, C Toniatti, B Klein, G Ciliberto, *Human interleukin-6 receptor super-antagonists with high potency and wide spectrum on multiple myeloma cells*. Blood, 1996. **87**(11): p. 4510-4519.
25. Ignacio Moraga, J.B.S., Juan L Mendoza, Milica Gakovic, Tom S Wehrman, Peter Krutzik, K Christopher Garcia, *Synthetic cytokines are surrogate cytokine and growth factor agonists that compel signaling through non-natural receptor dimers*. Elife, 2017. **6**: p. e22882.
26. Rodrigo Vazquez-Lombardi, B.R.a.D.C., *Molecular Engineering of Therapeutic Cytokines*. Antibodies, 2013. **2**(3): p. 426-451.
27. Ulrich Brinkmann, R.E.K., *The making of bispecific antibodies*. MAbs, 2017. **9**(2): p. 182-212.
28. P Ruf, O.G., M Jäger, K Fellingner, J Atz, H Lindhofer, *Characterisation of the new EpCAM-specific antibody HO-3: implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer*. British Journal of Cancer, 2007. **97**(3): p. 315-321.
29. Erika Engelowski, A.S., Manuel Franke, Haifeng Xu, Ramona Clemen, Alexander Lang, Paul Baran, Christian Binsch, Birgit Knebel, Hadi Al-Hasani, Jens M. Moll,

- Doreen M. Floß, Philipp A. Lang & Jürgen Scheller, *Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands*. Nature Communications, 2018. **9**(1): p. 2034.
30. C Hamers-Casterman, T.A., S Muyldermans, G Robinson, C Hamers, E B Songa, N Bendahman, R Hamers, *Naturally occurring antibodies devoid of light chains*. Nature, 1993. **363**(6428): p. 446-448.
 31. Peter Bannas, L.W., Alexander Lenz, Björn Rissiek, Friedrich Haag, Joanna Schmid, Katja Hochgräfe, Martin Trepel, Gerhard Adam, Harald Ittrich, Friedrich Koch-Nolte, *In vivo near-infrared fluorescence targeting of T cells: comparison of nanobodies and conventional monoclonal antibodies*. Contrast Media & Molecular Imaging, 2014. **9**: p. 135-142.
 32. R H van der Linden, L.G.F., B de Geus, M M Harmsen, R C Ruuls, W Stok, L de Ron, S Wilson, P Davis, C T Verrips, *Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1999. **1431**(1): p. 37-46.
 33. M Arbabi Ghahroudi, A.D., L Wyns, R Hamers, S Muyldermans, *Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies*. FEBS Letters, 1997. **414**(3): p. 521-526.
 34. M Lauwereys, M.A.G., A Desmyter, J Kinne, W Hölzer, E De Genst, L Wyns, S Muyldermans, *Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies*. The EMBO Journal, 1998. **17**(13): p. 3512-3520.
 35. Peter C Fridy, Y.L., Sarah Keegan, Mary K Thompson, Ilona Nudelman, Johannes F Scheid, Marlene Oeffinger, Michel C Nussenzweig, David Fenyö, Brian T Chait & Michael P Rout, *A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires*. Nature Methods, 2014. **11**(12): p. 1253-1260.
 36. Ulrich Rothbauer, K.Z., Serge Muyldermans, Aloys Schepers, M Cristina Cardoso, Heinrich Leonhardt, *A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins*. Molecular and Cellular Proteomics, 2008. **7**(2): p. 282-289.
 37. Anja Feldmann, C.A., Stefanie Koristka, Nicole Berndt, Ralf Bergmann & Michael P. Bachmann, *Conventional CARs versus modular CARs*. Cancer Immunology Immunotherapy, 2019. **68**(10): p. 1713-1719.
 38. P C Heinrich, I.B., G Müller-Newen, F Schaper, L Graeve, *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. Biochemistry Journal, 1998. **334**(2): p. 297-314.
 39. Doreen M Floss, J.S., Manuel Franke, Jürgen Scheller, *Insights into IL-23 biology: From structure to function*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2015. **26**(5): p. 569-578.
 40. Doreen M Floss, J.S., *Naturally occurring and synthetic constitutive-active cytokine receptors in disease and therapy*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2019. **47**: p. 1-20.
 41. Eugene Y Kim, K.D.M., *Immunomodulation of autoimmune arthritis by pro-inflammatory cytokines*. Cytokine, 2017. **30097**(17): p. 1043-4666.
 42. Simon A Jones, J.S., Stefan Rose-John, *Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling*. Journal of Clinical Investigation, 2011. **121**(9): p. 3375-83.
 43. Jennifer R Tisoncik, M.J.K., Cameron P Simmons, Jeremy Farrar, Thomas R Martin, Michael G Katze, *Into the eye of the cytokine storm*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 2012. **76**(1): p. 16-32.
 44. Niclas, R.H., *Guidebook to Cytokines and Their Receptors*. Oxford University Press, 1995. **23**(4): p. 226.
 45. Mübeccel Akdis, S.B., Reto Cramer, Thomas Eiwegger, Hiroyuki Fujita, Enrique Gomez, Sven Klunker, Norbert Meyer, Liam O'Mahony, Oscar Palomares, Claudio Rhyner, Nadia Ouaked, Anna Schaffartzik, Willem Van De Veen, Sabine Zeller, Maya Zimmermann, Cezmi A Akdis, *Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma:*

- receptors, functions, and roles in diseases*. Allergy Clinical Immunology, 2011. **127**(3): p. 701-721
46. Bazan, J.F., *Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily*. Biochemistry Journal, 1990. **87**(18): p. 6934-6938.
 47. Lindsay L Jones, D.A.A.V., *Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily*. Immunology Research, 2011. **51**(1): p. 5-14.
 48. O'Shea, W.J.L.a.J.J., *JAKS AND STATS: Biological Implications*. Annual Reviews of Immunology 1998. **16**: p. 293-322.
 49. Jason S Rawlings, K.M.R., Douglas A Harrison, *The JAK/STAT signaling pathway*. Cell Science, 2004. **117**(8): p. 1281-1283.
 50. Y Fujitani, M.H., T Fukada, M Takahashi-Tezuka, H Yoshida, T Yamaguchi, K Sugiyama, Y Yamanaka, K Nakajima, T Hirano, *An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT*. Oncogene, 1997. **14**(7): p. 751-761.
 51. Andrew J Brooks, W.D., Megan L O'Mara, Daniel Abankwa, Yash Chhabra, Rebecca A Pelekanos, Olivier Gardon, Kathryn A Tunny, Kristopher M Blucher, Craig J Morton, Michael W Parker, Emma Sierecki, Yann Gambin, Guillermo A Gomez, Kirill Alexandrov, Ian A Wilson, Manolis Doxastakis, Alan E Mark, Michael J Waters *Mechanism of Activation of Protein Kinase JAK2 by the Growth Hormone Receptor*. Science, 2014. **344**(6185): p. 1249783.
 52. C M Horvath, J.E.D., *The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus*. Current Opinion in Cell Biology, 1997. **9**(2): p. 233-239.
 53. Jonathan D Nardozi, K.L., Gino Cingolani, *Phosphorylation meets nuclear import: a review*. Cell Communication and Signaling, 2010. **8**: p. 32.
 54. Martin J. Boulanger, D.-c.C., Elena E. Brevnova, K. Christopher Garcia, *Hexameric Structure and Assembly of the Interleukin-6/IL-6 α -Receptor/gp130 Complex*. Science, 2003. **300**(5628): p. 2101-2104.
 55. D. M. Floss, M.S., M. Franke, F. C. Horstmeier, E. Engelowski, A. Schneider, E. M. Rosenfeldt & J. Scheller *IL-6/IL-12 Cytokine Receptor Shuffling of Extra- and Intracellular Domains Reveals Canonical STAT Activation via Synthetic IL-35 and IL-39 Signaling*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 15172.
 56. Taga, T., *gp130, a Shared Signal Transducing Receptor Component for Hematopoietic and Neuropoietic Cytokines*. Journal of Neurochemistry, 1996. **67**(1): p. 1-10.
 57. M Hibi, M.M., M Saito, T Hirano, T Taga, T Kishimoto, *Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130*. Cell, 1990. **63**(6): p. 1149-1157.
 58. S Pflanz, I.K., J Grötzinger, P C Heinrich, G Müller-Newen, *Two different epitopes of the signal transducer gp130 sequentially cooperate on IL-6-induced receptor activation*. Journal of Immunology, 2000. **165**(12): p. 7042-7049.
 59. J. William Tanner, W.C., Robert L. Young, Gregory D. Longmore and Andrey S. Shaw, *The Conserved Box 1 Motif of Cytokine Receptors Is Required For Cytokine Association With JAK Kinases*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(12): p. 6523-6530.
 60. N Stahl, T.G.B., T Farruggella, N Y Ip, S Davis, B A Witthuhn, F W Quelle, O Silvennoinen, G Barbieri, S Pellegrini, *Association and activation of JAK-TYK kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components*. Science, 1994. **263**(5143): p. 93-95.
 61. C Gerhartz, B.H., J Sasse, U Hemmann, C Landgraf, J Schneider-Mergener, F Horn, P C Heinrich, L Graeve, *Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(22): p. 12991-12998.
 62. J Schmitz 1, H.D., C Grimm, C Gendo, G Müller-Newen, P C Heinrich, F Schaper, *The cytoplasmic tyrosine motifs in full-length glycoprotein 130 have different roles in IL-6 signal transduction*. Journal of Immunology, 2000. **164**(2): p. 848-854.

63. Lauren W Collison, G.M.D., Clifford S Guy, Kate M Vignali, Vandana Chaturvedi, DeLisa Fairweather, Abhay R Satoskar, K Christopher Garcia, Christopher A Hunter, Charles G Drake, Peter J Murray, Dario A A Vignali, *The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional*. Nature Immunology, 2012. **13**(3): p. 290-299.
64. D J Hilton, A.A.H., A Raicevic, S Rakar, M Harrison-Smith, N M Gough, C G Begley, D Metcalf, N A Nicola, T A Willson, *Cloning of a murine IL-11 receptor α -chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction*. The EMBO Journal, 1994. **13**(20): p. 4765-4775.
65. Christiane Stuhlmann-Laeisz, S.L., Athena Chalaris, Paliga Krzysztof, Sudarman Enge, Jutta Eichler, Ursula Klingmüller, Michael Samuel, Matthias Ernst, Stefan Rose-John, Jürgen Scheller, *Forced dimerization of gp130 leads to constitutive STAT3 activation, cytokine-independent growth, and blockade of differentiation of embryonic stem cells*. Cell, 2006. **17**(7): p. 2986-2995.
66. M Murakami, M.H., N Nakagawa, T Nakagawa, K Yasukawa, K Yamanishi, T Taga, T Kishimoto, *IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase*. Science, 1993. **260**(5115): p. 1808-1810.
67. Hans-Heinrich Oberg, D.W., Sandra Grüssel, Stefan Rose-John, Dieter Kabelitz, *Differential expression of CD126 and CD130 mediates different STAT-3 phosphorylation in CD4+CD25- and CD25high regulatory T cells*. International Immunopharmacology, 2006. **4**: p. 555-563.
68. Jürgen Scheller, S.R.-J., *Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside*. Medical Microbiology and Immunology, 2006. **195**(5): p. 173-183.
69. Athena Chalaris, C.G., Björn Rabe, Stefan Rose-John, Jürgen Scheller, *The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer*. European Journal Cell Biology, 2011. **90**: p. 484-494.
70. Rose-John, S., *IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6*. International Journal of Biological Sciences, 2012. **8**(9): p. 1237-1247.
71. J Müllberg, E.D., L Graeve, C Gerhartz, K Yasukawa, T Taga, T Kishimoto, P C Heinrich, S Rose-John, *Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor*. FEBS Letters, 1993. **332**(1-2): p. 174-178.
72. Steffen Riethmueller, P.S., Johanna C. Ehlers, Chien-Wen Hung, Charlotte M. Flynn, Juliane Lokau, Maria Agthe, Stefan Dusterhöft, Yijue Zhu, Joachim Grötzinger, Inken Lorenzen, Tomas Koudelka, Kosuke Yamamoto, Ute Pickhinke, Rielana Wichert, Christoph Becker-Pauly, Marisa Rädisch, Alexander Albrecht, Markus Hessefort, Dominik Stahnke, Carlo Unverzagt, Stefan Rose-John, Andreas Tholey, Christoph Garbers, *Proteolytic origin of the soluble human IL-6R in vivo and a decisive role of N-glycosylation*. PLoS Biology, 2017. **15**(1): p. e2000080.
73. L D Ward, G.J.H., G Discolo, K Yasukawa, A Hammacher, R L Moritz, R J Simpson, *High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **296**(37): p. 23286-23289.
74. L D Ward, A.H., G J Howlett, J M Matthews, L Fabri, R L Moritz, E C Nice, J Weinstock, R J Simpson, *Influence of interleukin-6 (IL-6) dimerization on formation of the high affinity hexameric IL-6 receptor complex*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(33): p. 20138-20144.
75. C Lütticken, U.M.W., J Yuan, J Buschmann, C Schindler, A Ziemiecki, A G Harpur, A F Wilks, K Yasukawa, T Taga, *Association of transcription factor APRF and protein kinase JAK1 with the interleukin-6 signal transducer gp130*. Science, 1994. **263**(5143): p. 89-92.
76. Patrick Fischer, U.L., Radoslaw M Sobota, Jochen Schmitz, Claudia Niemand, Sonja Linnemann, Serge Haan, Iris Behrmann, Akihiko Yoshimura, James A Johnston, Gerhard Müller-Newen, Peter C Heinrich, Fred Schaper, *The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitization of interleukin-6 signalling*. Biochemical Journal, 2004. **378**(2): p. 449-460.

77. Ute Lehmann, J.S., Manuela Weissenbach, Radoslaw M Sobota, Michael Hortner, Kerstin Friederichs, Iris Behrmann, William Tsiaris, Atsuo Sasaki, Jens Schneider-Mergener, Akihiko Yoshimura, Benjamin G Neel, Peter C Heinrich, Fred Schaper, *SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(1): p. 661-671.
78. Nadia J Kershaw, J.M.M., Nicholas P D Liau, Leila N Varghese, Artem Laktyushin, Eden L Whitlock, Isabelle S Lucet, Nicos A Nicola, Jeffrey J Babon, *SOCS3 binds specific receptor–JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2013. **20**(4): p. 469-476.
79. René Eulenfeld, A.D., Christina Khouri, Pia J Müller, Barbara Mütze, Alexandra Wolf, Fred Schaper, *Interleukin-6 signalling: more than JAKs and STATs*. *European Journal Cell Biology*, 2012. **91**(6-7): p. 486-495.
80. Manica Negahdaripour, N.N., Younes Ghasemi, *A panoramic review and in silico analysis of IL-11 structure and function*. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2016. **32**: p. 41-61.
81. Wenjun Ouyang, A.O.G., *IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation*. *Immunity Review*, 2019. **50**(4): p. 871-891.
82. Jan Hendrik Niess, P.H., Tanay Kaymak, *The Interleukin-20 Cytokines in Intestinal Diseases*. *Frontiers in Immunology*, 2018. **9**: p. 1373.
83. Wenjun Ouyang, S.R., Natasha K Crellin, Patricia A Valdez, Sarah G Hymowitz, *Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease*. *Annual Reviews of Immunology*, 2011. **29**: p. 71-109.
84. K W Moore 1, R.d.W.M., R L Coffman, A O'Garra, *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptors*. *Annual Review of Immunology*, 2001. **19**: p. 683-765.
85. Renaud, J.-C., *Class II cytokine receptors and their ligands: Key antiviral and inflammatory modulators*. *Nature Reviews Immunology*, 2003. **3**(8): p. 667-676.
86. K Josephson, N.J.L., M R Walter, *Crystal Structure of the IL-10/IL-10R1 Complex Reveals a Shared Receptor Binding Site*. *Immunity*, 2001. **15**(1): p. 35-46.
87. Brandi C Jones, N.J.L., Mark R Walter, *Structure of IL-22 Bound to Its High-Affinity IL-22R1 Chain*. *Structure*, 2008. **16**(9): p. 1333-1344.
88. Zdanov, A., *Structural analysis of cytokines comprising the IL-10 family*. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2010. **21**(5): p. 325-330.
89. S V Kotenko, C.D.K., L S Izotova, B P Pollack, W Wu, S Pestka, *Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex*. *The EMBO Journal*, 1997. **16**(19): p. 5894-5903.
90. A S Ho, Y.L., T A Khan, D H Hsu, J F Bazan, K W Moore, *A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993. **90**(23): p. 11267-11272.
91. L Dumoutier, D.L., D Colau, J C Renaud, *Cloning and Characterization of IL-22 Binding Protein, a Natural Antagonist of IL-10-Related T Cell-Derived Inducible Factor/IL-22*. *Journal of Immunology*, 2001. **166**(12): p. 7090-7095.
92. S V Kotenko, L.S.I., O V Mirochnitchenko, E Esterova, H Dickensheets, R P Donnelly, S Pestka, *Identification, Cloning, and Characterization of a Novel Soluble Receptor That Binds IL-22 and Neutralizes Its Activity*. *Journal of Immunology*, 2001. **166**(12): p. 7096-7103.
93. Hal Blumberg, D.C., WenFeng Xu, Angelika Grossmann, Ty Brender, Susan Carollo, Maribeth Eagan, Don Foster, Betty A Haldeman, Angie Hammond, Harald Haugen, Laura Jelinek, James D Kelly, Karen Madden, Mark F Maurer, Julia Parrish-Novak, Donna Prunkard, Shannon Sexson, Cindy Sprecher, Kim Waggle, Jim West, Theodore E Whitmore, Lena Yao, Melanie K Kuechle, Beverly A Dale, Yasmin A Chandrasekher., *Interleukin 20: Discovery, Receptor Identification, and Role in Epidermal Function*. *Cell*, 2001. **104**(1): p. 9-19.
94. L Dumoutier, C.L., D Lejeune, S V Kotenko, J C Renaud, *Cutting Edge: STAT Activation By IL-19, IL-20 and mda-7 Through IL-20 Receptor Complexes of Two Types*. *Journal of Immunology*, 2001. **167**(7): p. 3545-3549.

95. Julia Parrish-Novak, W.X., Ty Brender, Lena Yao, Crystal Jones, Jim West, Cameron Brandt, Laura Jelinek, Karen Madden, Patricia A McKernan, Donald C Foster, Stephen Jaspers, Yasmin A Chandrasekher, *Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes: Differences in receptor-ligand interactions mediate unique biological functions*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(49): p. 47517-47523.
96. Mai Wang, Z.T., Rong Zhang, Sergei V Kotenko, Peng Liang, *Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(9): p. 7341-7347.
97. Sergei V Kotenko, G.G., Vitaliy V Baurin, Anita Lewis-Antes, Meiling Shen, Nital K Shah, Jerome A Langer, Faruk Sheikh, Harold Dickensheets, Raymond P Donnelly, *IFN-As mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex*. *Nature Immunology*, 2003. **4**(1): p. 69-77.
98. Paul Sheppard, W.K., Wenfeng Xu, Katherine Henderson, Stacy Schlutsmeyer, Theodore E Whitmore, Rolf Kuestner, Ursula Garrigues, Carl Birks, Jenny Roraback, Craig Ostrander, Dennis Dong, Jinu Shin, Scott Presnell, Brian Fox, Betty Haldeman, Emily Cooper, David Taft, Teresa Gilbert, Francis J Grant, Monica Tackett, William Krivan, Gary McKnight, Chris Clegg, Don Foster, Kevin M Klucher, *IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R*. *Nature Immunology*, 2003. **4**(1): p. 63-68.
99. Yoon, S.I., et al., *Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(46): p. 35088-35096.
100. Sidney Pestka, C.D.K., Devanand Sarkar, Mark R Walter, Yufang Shi, Paul B Fisher, *Interleukin-10 and related cytokines and receptors*. *Annual Reviews of Immunology*, 2004. **22**: p. 929-979.
101. Kerstin Wolk, S.K., Khusru Asadullah, Robert Sabat, *Cutting Edge: Immune Cells as Sources and Targets of the IL-10 Family Members?* *Journal of Immunology*, 2002. **168**(11): p. 5397-5402.
102. Gregory F Sonnenberg 1, L.A.M., Theresa Alenghat, Thomas C Fung, Natalie A Hutnick, Jun Kunisawa, Naoko Shibata, Stephanie Grunberg, Rohini Sinha, Adam M Zahm, Mélanie R Tardif, Taheri Sathaliyawala, Masaru Kubota, Donna L Farber, Ronald G Collman, Abraham Shaked, Lynette A Fouser, David B Weiner, Philippe A Tessier, Joshua R Friedman, Hiroshi Kiyono, Frederic D Bushman, Kyong-Mi Chang, David Artis, *Innate Lymphoid Cells Promote Anatomical Containment of Lymphoid-Resident Commensal Bacteria*. *Science*, 2012. **336**(6086): p. 1321-1325.
103. Yan Zheng, P.A.V., Dimitry M Danilenko, Yan Hu, Susan M Sa, Qian Gong, Alexander R Abbas, Zora Modrusan, Nico Ghilardi, Frederic J de Sauvage, Wenjun Ouyang, *Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens*. *Nature Medicine*, 2008. **14**(3): p. 282-289.
104. Hanna Bergmann, S.R., Konstanze Pechloff, Elina A. Kiss, Sabine Kuhn, Mathias Heikenwälder, , Andreas Diefenbach, Florian R. Greten, Jürgen Ruland, *Card9-dependent IL-1 β regulates IL-22 production from group 3 innate lymphoid cells and promotes colitis-associated cancer*. *European Journal of Immunology*, 2017. **47**(8): p. 1342-1353.
105. Kerstin Wolk, E.W., Elizabeth Wallace, Wolf-Dietrich Döcke, Stefanie Kunz, Khusru Asadullah, Hans-Dieter Volk, Wolfram Sterry, Robert Sabat, *IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis*. *European Journal of Immunology*, 2006. **36**(5): p. 1309-1323.
106. Sascha Rutz, X.W., Wenjun Ouyang, *The IL-20 subfamily of cytokines — from host defence to tissue homeostasis*. *Nature Reviews Immunology*, 2014. **14**(12): p. 783-795.
107. Celine Eidenschenk, S.R., Oliver Liesenfeld, Wenjun Ouyang; Hrsg.: Simon Fillatreau, Anne O'Garra, *Interleukin-10 in Health and Disease: Kapitel: Role of IL-22 in Microbial Host Defense*. Springer, 2014. **380**: p. 213-236.

108. Gregory F Sonnenberg, L.A.F., David Artis, *Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22*. *Nature Immunology*, 2011. **12**(5): p. 383-390.
109. Kerstin Wolk, S.K., Ellen Witte, Markus Friedrich, Khusru Asadullah, Robert Sabat, *IL-22 increases the innate immunity of tissues*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 241-254.
110. Nidhi Malhotra, J.Y., Juan Manuel Leyva-Castillo, Claire Galand, Nathan Archer, Lloyd S Miller, Raif S Geha, *IL-22 derived from $\gamma\delta$ T cells restricts Staphylococcus aureus infection of mechanically injured skin*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2017. **138**(4): p. 1098-1107.
111. Susan M Sa, P.A.V., Jianfeng Wu, Kenneth Jung, Fiona Zhong, Linda Hall, Ian Kasman, Jane Winer, Zora Modrusan, Dimitry M Danilenko, Wenjun Ouyang, *The Effects of IL-20 Subfamily Cytokines on Reconstituted Human Epidermis Suggest Potential Roles in Cutaneous Innate Defense and Pathogenic Adaptive Immunity in Psoriasis*. *Journal of Immunology*, 2007. **178**(4): p. 2229-2240.
112. Robert Sabat, W.O., Kerstin Wolk, *Therapeutic opportunities of the IL-22–IL-22R1 system*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2014. **13**(1): p. 21-38.
113. Samuel Huber, N.G., Lauren A Zenewicz, Francis J Huber, Lidia Bosurgi, Bo Hu, Matija Hedl, Wei Zhang, William O'Connor Jr, Andrew J Murphy, David M Valenzuela, George D Yancopoulos, Carmen J Booth, Judy H Cho, Wenjun Ouyang, Clara Abraham, Richard A Flavell, *IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine*. *Nature*, 2012. **491**(7423): p. 259-263.
114. Stefanie Kirchberger, D.J.R., Olivier Boulard, Emily Thornton, Fanny Franchini, Rose L Szabady, Oliver Harrison, Fiona Powrie, *Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model*. *Journal of Experimental Medicine*, 2013. **210**(5): p. 917-931.
115. M. J. Shear, A.P., *Chemical Treatment of Tumors. IX Reactions of Mice with Primary Subcutaneous Tumors to Injection of a Hemorrhage-Producing Bacterial Polysaccharide 1*. *Journal of the National Cancer Institute*, 1944. **4**(5): p. 461-476.
116. E A Carswell, L.J.O., R L Kassel, S Green, N Fiore, B Williamson, *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1975. **72**(9): p. 3666-3670.
117. Catherine Dostert, M.G., Elisabeth Letellier, Dirk Brenner, *The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond*. *Physiology Reviews*, 2019. **99**(1): p. 115-160.
118. Faustman, É.S.V.a.D.L., *Structural principles of tumor necrosis factor superfamily signaling*. *Science Signalling*, 2018. **11**(511): p. eaao4910.
119. K J Tracey, S.F.L., A Cerami, *Cachetin/TNF- α in Septic Shock and Septic Adult Respiratory Distress Syndrome*. *American Review of Respiratory Disease*, 1988. **138**(6): p. 1377-1379.
120. D Pennica, G.E.N., J S Hayflick, P H Seeburg, R Derynck, M A Palladino, W J Kohr, B B Aggarwal, D V Goeddel, *Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin*. *Nature*, 1984. **312**(5996): p. 724-729.
121. M Kriegler, C.P., K DeFay, I Albert, S D Lu, *A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF*. *Cell*, 1988. **53**(1): p. 45-53.
122. Jean-Luc Bodmer, P.S., Jürg Tschopp, *The molecular architecture of the TNF superfamily*. *Trends in Biochemical Sciences*, 2002. **27**(1): p. 19-26.
123. R M Locksley, N.K., M J Lenardo, *The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology*. *Cell*, 2001. **104**(4): p. 487-501.
124. D W Banner, A.D.A., W Janes, R Gentz, H J Schoenfeld, C Broger, H Loetscher, W Lesslauer, *Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF β complex: Implications for TNF receptor activation*. *Cell*, 1993. **73**(3): p. 431-445.
125. S G Hymowitz, H.W.C., G Fuh, M Ultsch, M O'Connell, R F Kelley, A Ashkenazi, A M de Vos, *Triggering Cell Death: The Crystal Structure of Apo2L/TRAIL in a Complex with Death Receptor 5*. *Molecular Cell*, 1999. **4**(4): p. 563-571.

126. Yohei Mukai Teruya Nakamura, M.Y., Yasuo Yoshioka, Shin-ichi Tsunoda, Shinsaku Nakagawa, Yuriko Yamagata, Yasuo Tsutsumi, *Solution of the Structure of the TNF-TNFR2 Complex*. Science Signaling, 2010. **3**(148): p. ra83.
127. F K Chan, M.J.L., *A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes*. European Journal of Immunology, 2000. **30**(2): p. 652-660.
128. Roy A. Black, C.T.R., Carl J. Kozlosky, Jacques J. Peschon, Jennifer L. Slack, Martin F. Wolfson, Beverly J. Castner, Kim L. Stocking, Pranitha Reddy, Subhashini Srinivasan, Nicole Nelson, Norman Boiani, Kenneth A. Schooley, Mary Gerhart, Raymond Davis, Jeffrey N. Fitzner, Richard S. Johnson, Raymond J. Paxton, Carl J. March & Douglas Pat Cerretti *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells*. Nature, 1997. **385**: p. 729-733.
129. P Tang, H.M.-C., J Klostergaard, *Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer*. Biochemistry, 1996. **35**(25): p. 8216-8225.
130. N Itoh, S.N., *A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(15): p. 10932-10937.
131. Nicholas S Wilson, V.D., Avi Ashkenazi, *Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks*. Nature Immunology, 2009. **10**(4): p. 348-355.
132. Tamas Sessler, S.H., Afshin Samali, Eva Szegezdi, *Structural determinants of DISC function: New insights into death receptor-mediated apoptosis signalling*. Pharmacology & Therapeutics, 2013. **140**(2): p. 186-199.
133. Lucía Cabal-Hierro, P.S.L., *Signal transduction by tumor necrosis factor receptors*. Cellular Signalling, 2012. **24**(6): p. 1297-305.
134. Denise Faustman, M.D., *TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases*. Nature Reviews Drug Discovery, 2010. **9**(6): p. 482-493.
135. Dirk Brenner, H.B., Tak W Mak, *Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die*. Nature Reviews Immunology, 2015. **15**(6): p. 362-374.
136. Probert, L., *TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects*. Neuroscience, 2015. **302**: p. 2-22.
137. H Hsu, J.X., D V Goeddel, *The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation*. Cell, 1995. **81**(4): p. 495-504.
138. H Hsu, J.H., H B Shu, V Baichwal, D V Goeddel, *TNF-Dependent Recruitment of the Protein Kinase RIP to the TNF Receptor-1 Signaling Complex*. Immunity, 1996. **4**(4): p. 387-396.
139. A T Ting, F.X.P.-M., B Seed, *RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF- κ B but not Fas/APO-1-initiated apoptosis*. The EMBO Journal, 1996. **15**(22): p. 6189-6196.
140. Israël, A., *The IKK complex, a central regulator of NF- κ B activation*. Cold Spring Harbour Perspectives in Biology, 2010. **2**(3): p. a000158.
141. David R McIlwain, T.B., Tak W Mak, *Caspase functions in cell death and disease*. Cold Spring Harbour Perspectives in Biology, 2015. **7**(4): p. a026716.
142. L Galluzzi, I.V., J M Abrams, E S Alnemri, E H Baehrecke, M V Blagosklonny, T M Dawson, V L Dawson, W S El-Deiry, S Fulda, E Gottlieb, D R Green, M O Hengartner, O Kepp, R A Knight, S Kumar, S A Lipton, X Lu, F Madeo, W Malorni, P Mehlen, G Nuñez, M E Peter, M Piacentini, D C Rubinsztein, Y Shi, H-U Simon, P Vandenabeele, E White, J Yuan, B Zhivotovsky, G Melino, G Kroemer, *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. Cell Death & Differentiation, 2012. **19**(1): p. 107-120.
143. Peter Vandenabeele, L.G., Tom Vanden Berghe, Guido Kroemer, *Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010. **11**(10): p. 700-714.
144. Björn Gerlach, S.M.C., Anna C Schmukle, Christoph H Emmerich, Eva Rieser, Tobias L Haas, Andrew I Webb, James A Rickard, Holly Anderton, Wendy W-L Wong, Ueli Nachbur, Lahiru Gangoda, Uwe Warnken, Anthony W Purcell, John Silke, Henning Walczak, *Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling*. Nature, 2011. **471**(7340): p. 591-596.

145. Junichi Hitomi, D.E.C., Aylwin Ng, Jianhua Yao, Alexei Degterev, Ramnik J Xavier, Junying Yuan, *Identification of a Molecular Signaling Network that Regulates a Cellular Necrotic Cell Death Pathway*. Cell, 2008. **135**(7): p. 1311-1323.
146. Olivier Micheau, J.T., *Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes*. Cell, 2003. **114**(2): p. 181-190.
147. Laiqun Zhang, K.B., Aliya Altaeva, Zhaohui Shi, Hasem Habelhah, *TRAF2 phosphorylation promotes NF- κ B-dependent gene expression and inhibits oxidative stress-induced cell death*. Molecular biology of the cell, 2011. **22**(1): p. 128-140.
148. Lai Wang, F.D., Xiaodong Wang, *TNF- α Induces Two Distinct Caspase-8 Activation Pathways*. Cell, 2008. **133**(4): p. 693-703.
149. Tencho Tenev, K.B., Maurice Darding, Meike Broemer, Claudia Langlais, Fredrik Wallberg, Anna Zachariou, Juanita Lopez, Marion MacFarlane, Kelvin Cain, Pascal Meier, *The Ripoptosome, a Signaling Platform that Assembles in Response to Genotoxic Stress and Loss of IAPs*. Molecular Cell, 2011. **43**(3): p. 432-448.
150. Mathieu J M Bertrand, S.M., Kathleen M Dickson, Wai Chi Ho, Alain Boudreault, Jon Durkin, John W Gillard, James B Jaquith, Stephen J Morris, Philip A Barker, *clAP1 and clAP2 Facilitate Cancer Cell Survival by Functioning as E3 Ligases that Promote RIP1 Ubiquitination*. Molecular Cell, 2008. **30**(6): p. 689-700.
151. D Vercammen, G.B., G Denecker, M Van de Craen, W Declercq, W Fiers, P Vandenabeele, *Dual Signaling of the Fas Receptor: Initiation of Both Apoptotic and Necrotic Cell Death Pathways*. Journal of Experimental Medicine, 1998. **188**(5): p. 919-930.
152. N Holler, R.Z., O Micheau, M Thome, A Attinger, S Valitutti, J L Bodmer, P Schneider, B Seed, J Tschopp, *Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule*. Nature Immunology, 2000. **1**(6): p. 489-495.
153. B C Trauth, C.K., A M Peters, S Matzku, P Möller, W Falk, K M Debatin, P H Krammer, *Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis*. Science, 1989. **245**(4915): p. 301-305.
154. T Suda, T.T., P Golstein, S Nagata, *Molecular cloning and expression of the fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family*. Cell, 1993. **75**(6): p. 1169-1178.
155. A H Montel, M.R.B., J A Hobbs, D H Lynch, Z Brahmi, *Fas Involvement in Cytotoxicity Mediated by Human NK Cells*. Cellular Immunology, 1995. **166**(2): p. 236-246.
156. S M Mariani, B.M., C Bäumlner, P H Krammer, *Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases*. European Journal of Immunology, 1995. **25**(8): p. 2303-2307.
157. R M Siegel, J.K.F., D A Zacharias, F K Chan, M Johnson, D Lynch, R Y Tsien, M J Lenardo, *Fas Preassociation Required for Apoptosis Signaling and Dominant Inhibition by Pathogenic Mutations*. Science, 2000. **288**(5475): p. 2354-2357.
158. M E Peter, P.H.K., *Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis*. Current Opinion in Immunology, 1998. **10**(5): p. 545-551.
159. M E Peter, P.H.K., *The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond*. Cell Death & Differentiation, 2003. **10**(1): p. 26-35.
160. Fiona L Scott, B.S., Cristina Pop, Małgorzata K Dobaczewska, JeongEun J Lee, Edward Monosov, Howard Robinson, Guy S Salvesen, Robert Schwarzenbacher, Stefan J Riedl, *The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering*. Nature, 2009. **457**(7232): p. 1019-1022.
161. E M Creagh, S.J.M., *Caspases: cellular demolition experts*. Biochemical Society Transactions, 2001. **29**(6): p. 696-702.
162. Sean P Cullen, S.J.M., *Fas and TRAIL 'death receptors' as initiators of inflammation: Implications for cancer*. Seminars in Cell and Developmental Biology, 2015. **39**: p. 26-34.
163. Amélie Fouqué, L.D., Patrick Legembre, *The CD95/CD95L signaling pathway: A role in carcinogenesis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2014. **1846**(1): p. 130-141.

164. Ana Martin-Villalba, E.L.-B., Damian Wolny, *CD95 in cancer: tool or target?* Trends in Molecular Medicine, 2013. **19**(6): p. 329-335.
165. M E Peter, A.H., A E Murmann, S Brockway, W Putzbach, A Pattanayak, P Ceppi, *The role of CD95 and CD95 ligand in cancer.* Cell Death & Differentiation, 2015. **22**(5): p. 885-886.
166. Ketteler, R.G., S. Sandra, O. Martens, U. M. Klingmüller, U. , *Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors.* Gene Therapy, 2002. **9**(8): p. 477-487.
167. Jan Suthaus, A.T., Inken Lorenzen, Elena Bulanova, Stefan Rose-John, and Jürgen Scheller, *Forced Homo- and Heterodimerization of All gp130-Type Receptor Complexes Leads to Constitutive Ligand-independent Signaling and Cytokine-independent Growth.* Molecular Biology of the Cell, 2010. **21**(15): p. 2797–2807.
168. Sofie Mossner, M.K., Nastaran Fazel Modares, Birgit Knebel, Hadi Al-Hasani, Doreen M. Floss, and Jürgen Scheller, *Synthetic interleukin 22 (IL-22) signaling reveals biological activity of homodimeric IL-10 receptor 2 and functional cross-talk with the IL-6 receptor gp130.* Journal of Biological Chemistry, 2020(doi:10.1074/jbc.RA120.013927).
169. Sofie Mossner, H.T.P., Saskia Triller, Jens M. Moll, Udo Conrad, Jürgen Scheller, *Multimerization strategies for efficient production and purification of highly active synthetic cytokine receptor ligands.* PLoS One, 2020. **15**(4): p. e0230804.
170. M Fischer, J.G., C Peschel, J P Brakenhoff, K J Kallen, A Wollmer, J Grötzinger, S Rose-John, *A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion.* Nature Biotechnology, 1997. **15**(2): p. 142-145.
171. Marta H Kubala, O.K., Kirill Alexandrov, Brett M Collins, *Structural and thermodynamic analysis of the GFP:GFP-nanobody complex.* Protein Science, 2010. **19**(12): p. 2389-2401.
172. James E. Thompson, R.M.C., Richard T. Cummings, Linda S. Wicker, Robert Frankshun, Barry R. Cunningham, Patricia M. Cameron, Peter T. Meinke, Nigel Liverton, Youmin Weng and Julie A. DeMartino, *Photochemical Preparation of a Pyridone Containing Tetracycle: A Jak Protein Kinase Inhibitor.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2002. **12**(8): p. 1219-1223.
173. Isabelle S Lucet, E.F., Michelle Styles, Rebecca Bamert, Onisha Patel, Sophie E Broughton, Mark Walter, Christopher J Burns, Herbert Treutlein, Andrew F Wilks, Jamie Rossjohn, *The structural basis of Janus kinase 2 inhibition by a potent and specific pan-Janus kinase inhibitor.* Blood, 2006. **107**(1): p. 176-183.
174. Diane Lejeune, L.D., Stefan Constantinescu, Wiebe Kruijer, Jan Jacob Schuringa, Jean-Christophe Renaud, *Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10.* Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(37): p. 33676-3382.
175. K Rajasekhar, C.M., T Govindaraju, *Natural Tripeptide-Based Inhibitor of Multifaceted Amyloid beta Toxicity.* ACS Chemical Neuroscience, 2016. **7**(9): p. 1300-1310.
176. Yuko Matsunaga, H.I., Satoru Fukuyama, Hideyuki Yoshida, Atsushi Moriwaki, Takafumi Matsumoto, Koichiro Matsumoto, Yukari Asai, Masato Kubo, Akihiko Yoshimura, Yoichi Nakanishi, *Effects of a Janus kinase inhibitor, pyridone 6, on airway responses in a murine model of asthma.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011. **404**(1): p. 261-267.
177. James E Thompson, R.M.C., Richard T Cummings, Linda S Wicker, Robert Frankshun, Barry R Cunningham, Patricia M Cameron, Peter T Meinke, Nigel Liverton, Youmin Weng, Julie A DeMartino, *Photochemical preparation of a Pyridone Containing Tetracycle: a Jak Protein Kinase Inhibitor.* Bioorganic & Medical Chemistry Letters, 2002. **12**(8): p. 1219-1223.
178. S V Kotenko, L.S.I., B P Pollack, G Muthukumaran, K Pauku, O Silvennoinen, J N Ihle, S Pestka, *Other Kinases Can Substitute for Jak2 in Signal Transduction by Interferon-Gamma.* Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(29): p. 17174-17182.

179. Andera, L., *Signaling Activated By The Death Receptors Of The TNFR Family*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub., 2009. **153**(3): p. 173-180.
180. A M Peters, B.K., H Martin, F Griesinger, B Wörmann, M Gahr, J Roesler, *Defective apoptosis due to a point mutation in the death domain of CD95 associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome, T-cell lymphoma, and Hodgkin's disease*. Experimental Hematology, 1999. **27**(5): p. 868-874.
181. Georgios Trichas, J.B.S.S., *Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice*. BMC Biology, 2008. **6**(1): p. 40.
182. Y Ishida, Y.A., K Shibahara, T Honjo, *Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death*. The EMBO Journal, 1992. **11**(11): p. 3887-3895.
183. H Nishimura, Y.A., A Kawasaki, M Sato, S Imamura, N Minato, H Yagita, T Nakano, T Honjo, *Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative(CD4-CD8-) thymocytes*. International Immunology, 1996. **8**(5): p. 773-780.
184. Tomohide Yamazaki, H.A., Hideyuki Iwai, Hironori Matsuda, Mami Aoki, Yuka Tanno, Tahiro Shin, Haruo Tsuchiya, Drew M Pardoll, Ko Okumura, Miyuki Azuma, Hideo Yagita, *Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC*. Journal of Immunology, 2002. **169**(10): p. 5538-5545.
185. Mary E Keir, M.J.B., Gordon J Freeman, Arlene H Sharpe, *PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity*. Annual Review of Immunology, 2008. **26**(1): p. 677-704.
186. H Dong, G.Z., K Tamada, L Chen, *B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion*. Nature Medicine, 1999. **5**(12): p. 1365-1369.
187. G J Freeman, A.J.L., Y Iwai, K Bourque, T Chernova, H Nishimura, L J Fitz, N Malenkovich, T Okazaki, M C Byrne, H F Horton, L Fouser, L Carter, V Ling, M R Bowman, B M Carreno, M Collins, C R Wood, T Honjo, *Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation*. Journal of Experimental Medicine, 2000. **192**(7): p. 1027-1034.
188. Y Latchman, C.R.W., T Chernova, D Chaudhary, M Borde, I Chernova, Y Iwai, A J Long, J A Brown, R Nunes, E A Greenfield, K Bourque, V A Boussiotis, L L Carter, B M Carreno, N Malenkovich, H Nishimura, T Okazaki, T Honjo, A H Sharpe, G J Freeman, *PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation*. Nature Immunology, 2001. **2**(3): p. 261-268.
189. Kankana Bardhan, T.A., Vassiliki A Boussiotis, *The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation*. Frontiers in Immunology, 2016. **7**: p. 550.
190. Hashem O Alsaab, S.S., Rami Alzhrani, Katyayani Tatiparti, Ketki Bhise, Sushil K Kashaw, Arun Klyer, *PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome*. Frontiers in Pharmacology, 2017. **23**(8): p. 561.
191. Margaret K Callahan, M.A.P., Jedd D Wolchok, *Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy*. Immunity, 2016. **44**(5): p. 1069-1078.
192. Andrew L Croxford, F.M., Burkhard Becher, *IL-23: one cytokine in control of autoimmunity*. European Journal of Immunology, 2012. **42**(9): p. 2263-2273.
193. Jutta Schröder, J.M.M., Paul Baran, Joachim Grötzinger, Jürgen Scheller, Doreen M Floss, *Non-canonical interleukin 23 receptor complex assembly: p40 protein recruits interleukin 12 receptor beta1 via site II and induces p19/interleukin 23 receptor interaction via site III*. Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(1): p. 359-370.
194. Doreen M Floss, S.M., Tobias Klöcker, Jutta Schröder, Joachim Grötzinger, Stefan Rose-John, Jürgen Scheller, *Identification of canonical tyrosine-dependent and non-canonical tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(27): p. 19386-41900.

195. Dieter Fink 1, S.W., Martin Pfeffer, Tabitha Tombe, Christopher J Ong, Poul H B Sorensen, *Ubiquitous expression of the monomeric red fluorescent protein mCherry in transgenic mice*. *Genesis*, 2010. **48**(12): p. 723-729.
196. M Okabe, M.I., K Kominami, T Nakanishi, Y Nishimune, '*Green mice*' as a source of *ubiquitous green cells*. *FEBS Letters*, 1997. **407**(3): p. 313-319.
197. K Vandenbroucke, H.d.H., E Beirnaert, T Dreier, M Lauwereys, L Huyck, J Van Huysse, P Demetter, L Steidler, E Remaut, C Cuvelier, P Rottiers, *Orally administered L. lactis secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis*. *Mucosal Immunology*, 2010. **3**(1): p. 49-56.
198. Soo MinNoh, M., Gyun MinLee, *Development of recombinant Chinese hamster ovary cell lines for therapeutic protein production*. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2013. **2**(4): p. 391-397.
199. T Jostock, J.M., S Ozbek, R Atreya, G Blinn, N Voltz, M Fischer, M F Neurath, S Rose-John, *Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses*. *European Journal of Biochemistry*, 2001. **268**(1): p. 160-167.
200. Georgios Skiniotis, M.J.B., K Christopher Garcia, Thomas Walz, *Signaling conformations of the tall cytokine receptor gp130 when in complex with IL-6 and IL-6 receptor*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2005. **12**(6): p. 545-551.
201. Nina K Jain, S.B.-C., Richard Altman, Krista Johnson, Fang Sun, Jonathan Zmuda, Chao Yan Liu, Adriana Kita, Ryan Schulz, Alyssa Neill, Robert Ballinger, Rekha Patel, Jian Liu, Alinafe Mpanda, Brian Huta, Henry Chiou, Walter Voegtli, Tadas Panavas, *A high density CHO-S transient transfection system: Comparison of ExpiCHO and Expi293*. *Protein Expression and Purification*, 2017. **134**: p. 38-46.
202. Xiaotian Zhong, W.M., Caryl L. Meade, Amy S. Tam, Eliza Llewellyn, Richard Cornell, Kaffa Cote, John J. Scarcelli, Jeffrey K. Marshall, Borianna Tzvetkova, Bruno Figueroa, Dana DiNino, Annette Sievers, Christopher Lee, Jane Guo, Evan Mahan, Christopher Francis, Khetemene Lam, Aaron M. D'Antona, Richard Zollner, Hongli L. Zhu, Ron Kriz, Will Somers, Laura Lin, *Transient CHO expression platform for robust antibody production and its enhanced N-glycan sialylation on therapeutic glycoproteins*. *Biotechnology Progress*, 2019. **35**(1): p. e2724.
203. Helmut Fickenscher, S.H., Heide Küpers, Andrea Knappe, Sabine Wittmann, Heinrich Sticht, *The interleukin-10 family of cytokines*. *Trends in Immunology*, 2002. **23**(2): p. 89-96.
204. Bazan, J.F., *Haemopoietic receptors and helical cytokines*. *Immunology Today*, 1990. **11**(10): p. 350-354.
205. Geethanjali Pickert, C.N., Moritz Leppkes, Yan Zheng, Nadine Wittkopf, Moritz Warntjen, Hans-Anton Lehr, Sebastian Hirth, Benno Weigmann, Stefan Wirtz, Wenjun Ouyang, Markus F Neurath, Christoph Becker, *STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing*. *Journal of Experimental Medicine*, 2009. **206**(7): p. 1465-1472.
206. Olivia B Parks, D.A.P., Zerina Hodzic, Jay K Kolls, Misty Good, *Interleukin-22 Signaling in the Regulation of Intestinal Health and Disease*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2016. **3**: p. 85.
207. Thorben M. Hummel, T.A., Marco Schönberg, Gregor Ciupka, Falk Schulz, Anne Oberdoerster, Joachim Grötzinger, Jürgen Scheller, Doreen M. Floss, *Synthetic deletion of the Interleukin 23 receptor (IL-23R) stalk region led to autonomous IL-23R homodimerization and activation*. *Molecular and Cellular Biology*, 2017. **37**(17): p. e00014-e00017.
208. Anna Usacheva, R.S., Paul Domanski, Sergei V Kotenko, Keats Nelms, Mark A Goldsmith, Oscar R Colamonici, *Contribution of the Box 1 and Box 2 motifs of cytokine receptors to Jak1 association and activation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(50): p. 48220-48226.
209. Murray, P.J., *The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration*. *Journal of Immunology*, 2007. **178**(5): p. 2623-2629.

210. Xinquan Wang 1, P.L., Sherry L Laporte, K Christopher Garcia, *Structural biology of shared cytokine receptors*. Annual Review of Immunology, 2009. **27**: p. 29-60.
211. Sung-Il Yoon, B.C.J., Naomi J Logsdon, Bethany D Harris, Ashlesha Deshpande, Svetlana Radaeva, Brian A Halloran, Bin Gao, Mark R Walter, *Structure and mechanism of receptor sharing by the IL-10R2 common chain*. Structure, 2010. **18**(5): p. 638-648.
212. Naomi J Logsdon, B.C.J., Kristopher Josephson, Jennifer Cook, Mark R Walter, *Comparison of interleukin-22 and interleukin-10 soluble receptor complexes*. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2002. **22**(11): p. 1099-1112.
213. Jing Li, K.N.T., Xiang-Yang Tan, Paul Wu, Grace Yan, Vikki Spaulding, Bijia Deng, Bethany Annis-Freeman, Kathleen Heveron, Richard Zollner, Gerard De Zutter, Jill F Wright, Tara K Crawford, Wei Liu, Kenneth A Jacobs, Neil M Wolfman, Vincent Ling, Debra D Pittman, Geertruida M Veldman, Lynette A Fouser, *Temporal associations between interleukin 22 and the extracellular domains of IL-22R and IL-10R2*. International Immunopharmacology, 2004. **4**(5): p. 693-708.
214. B K Kay, M.P.W., M Sudol, *The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains*. FASEB Journal, 2000. **14**(2): p. 231-241.
215. Mayer, B.J., *SH3 domains: complexity in moderation*. Journal of Cell Science, 2001. **114**(7): p. 1253-1263.
216. Laure Dumoutier 1, C.d.M., Jan Tavernier, Jean-Christophe Renauld, *New Activation Modus of STAT3: A tyrosine-less region of the interleukin-22 receptor recruits stat3 by interacting with its coiled-coil domain*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(39): p. 26377-26384.
217. X Li , S.L., I M Kerr, G R Stark, *Functional subdomains of STAT2 required for preassociation with the alpha interferon receptor and for signaling*. Molecular and Cellular Biology, 1997. **17**(4): p. 2048-2056.
218. A C Ward, M.H.H., L Smith, Y M van Aesch, A M Schelen, C Antonissen, I P Touw, *Tyrosine-dependent and -independent mechanisms of STAT3 activation by the human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor are differentially utilized depending on G-CSF concentration*. Blood, 1999. **93**(1): p. 113-124.
219. Heidi J A Wallweber, C.T., Yvonne Franke, Melissa A Starovasnik, Patrick J Lupardus, *Structural basis of recognition of interferon- α receptor by tyrosine kinase 2*. Nature Structural & Molecular Biology, 2014. **21**(5): p. 443-448.
220. Shie-Liang Hsieh, W.-W.L., *Decoy receptor 3: an endogenous immunomodulator in cancer growth and inflammatory reactions*. Journal of Biomedical Science, 2017. **24**(1): p. 39.
221. Sinisa Savic, L.J.D., Michele Battellino, Michael F McDermott, *Familial Mediterranean fever and related periodic fever syndromes/autoinflammatory diseases*. Current Opinion in Rheumatology, 2012. **24**(1): p. 103-112.
222. Eric Toussiro, D.W., *The use of TNF- α blocking agents in rheumatoid arthritis: an overview*. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2004. **5**(3): p. 581-594.
223. Xixi Ma, S.X., *TNF inhibitor therapy for rheumatoid arthritis*. Biomedical Reports, 2013. **1**(2): p. 177-184.
224. Grzegorz Cessak, O.K., Agnieszka Burda, Krzysztof Lis, Marcin Wojnar, Dagmara Mirowska-Guzel, Ewa Bałkowiec-Iskra, *TNF inhibitors – Mechanisms of action, approved and off-label indications*. Pharmacological Reports, 2014. **66**(5): p. 836-844.
225. Tomasz J Ślebioda, Z.K., *Tumour necrosis factor superfamily members in the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Mediators of Inflammation, 2014. **2014**: p. 325129.
226. Clémentine Perrier, G.d.H., Jonathan Cremer, Severine Vermeire, Paul Rutgeerts, Gert Van Assche, David E Szymkowski, Jan L Ceuppens, *Neutralization of Membrane TNF, but Not Soluble TNF, Is Crucial for the Treatment of Experimental Colitis*. Inflammatory Bowel Diseases, 2012. **19**(2): p. 246-253.

227. S Yonehara, A.I., M Yonehara, *A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor*. Journal of Experimental Medicine, 1989. **169**(5): p. 1747-1756.
228. Iris Behrmann, H.W., Peter H. Krammer, *Structure of the human APO-1 gene*. European Journal of Immunology, 1994. **24**(12): p. 3057-3062.
229. Marta Muzio, B.R.S., Henning R. Stennicke, Guy S. Salvesen and Vishva M. Dixit, *An Induced Proximity Model for Caspase-8 Activation*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(5): p. 2926-2930.
230. Sébastien Tausin, L.D., Jean-François Moreau, Patrick Legembre, *CD95-mediated cell signaling in cancer: mutations and post-translational modulations*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2012. **69**(8): p. 1261-1277.
231. Susan Price, P.A.S., Amy Seitz, Gyan Joshi, Joie Davis, Julie E Niemela, Katie Perkins, Ronald L Hornung, Les Folio, Philip S Rosenberg, Jennifer M Puck, Amy P Hsu, Bernice Lo, Stefania Pittaluga, Elaine S Jaffe, Thomas A Fleisher, V Koneti Rao, Michael J Lenardo, *Natural history of autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with FAS gene mutations*. Blood, 2014. **123**(13): p. 1989-1999.
232. G H Fisher, F.J.R., S E Straus, J K Dale, L A Middleton, A Y Lin, W Strober, M J Lenardo, J M Puck, *Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome*. Cell, 1995. **81**(6): p. 935-946.
233. J Ogasawara, R.W.-F., M Adachi, A Matsuzawa, T Kasugai, Y Kitamura, N Itoh, T Suda, S Nagata, *Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice*. Nature, 1993. **364**(6440): p. 806-809.
234. James W Peacock, J.P., Dieter Fink, Stephen Ip, Eric M Pietras, Alice L-F Mui, Stephen W Chung, Martin E Gleave, Michael E Cox, Ramon Parsons, Marcus E Peter, Christopher J Ong, *PTEN loss promotes mitochondrially dependent type II Fas-induced apoptosis via PEA-15*. Molecular and Cellular Biology, 2009. **29**(5): p. 1222-1234.
235. Hemamalini Renganathan, H.V., Anna Knapinska, Joe W Ramos, *Phosphorylation of PEA-15 switches its binding specificity from ERK/MAPK to FADD*. Biochemical Journal, 2005. **390**(3): p. 729-735.
236. Alessandra Trencia, A.P., Angela Cassese, Giovanni Vigliotta, Claudia Miele, Francesco Oriente, Stefania Santopietro, Ferdinando Giacco, Gerolama Condorelli, Pietro Formisano, Francesco Beguinot, *Protein Kinase B/Akt Binds and Phosphorylates PED/PEA-15, Stabilizing Its Antiapoptotic Action*. Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(13): p. 4511-4521.
237. Van Trung Chu, T.W., Robin Graf, Thomas Sommermann, Kerstin Petsch, Ulrike Sack, Pavel Volchkov, Klaus Rajewsky & Ralf Kühn, *Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes*. BMC Biotechnology, 2016. **16**(4): p. 4.
238. B Sauer, N.H., *Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. **85**(14): p. 5166-5170.
239. Hyeonhui Kim, M.K., Sun-Kyoung Im, Sungsoon Fang, *Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes*. Laboratory Animal Research, 2018. **34**(4): p. 147-159.
240. Nastaran Fazel Modares, R.P., Fereshteh Haghighi, Larissa Lamertz, Kristina Behnke, Yuan Zhuang, Claus Kordes, Dieter Häussinger, Ursula R. Sorg, Klaus Pfeffer, Doreen M. Floss, Jens M. Moll, Roland P. Piekorz, M. Reza Ahmadian, Philipp A. Lang, Jürgen Scheller, *IL-6 Trans-signaling Controls Liver Regeneration After Partial Hepatectomy*. Hepatology, 2019. **70**(6): p. 2075-2091.
241. Sophie Steeland, R.E.V., Claude Libert, *Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies*. Drug Discovery Today, 2016. **21**(7): p. 1076-1113.
242. M M Harmsen, H.J.D.H., *Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007. **77**(1): p. 13-22.

243. Marcela V Maus, A.K.T., Debra G B Leonard, David Allman, Kathakali Addya, Katia Schlienger, James L Riley, Carl H June, *Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB*. Nature Biotechnology, 2002. **20**(2): p. 143-148.
244. Adrienne H Long, W.M.H., Jack F Shern, Kelsey M Wanhainen, Meera Murgai, Maria Ingaramo, Jillian P Smith, Alec J Walker, M Eric Kohler, Vikas R Venkateshwara, Rosandra N Kaplan, George H Patterson, Terry J Fry, Rimas J Orentas & Crystal L Mackall *4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors*. Nature Medicine, 2015. **21**(6): p. 581-590.

6. Anhang

Die Sequenzen der während dieser Arbeit generierten, synthetischen Liganden und Rezeptoren sind im Folgenden gezeigt.

GFP-Fc sequence	MSSSSCGLSRVLAVALVATALVSASSDYDDDDKGSFPVATMVSKEEELFTGV	50	IL-11R signal peptide
	VPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTTLKFICTTGKLPVPWPPTLV	100	FLAG-Tag
	TTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAE	150	GFP sequence
	VKFEQDGLVNRVIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGI	200	TEV cleavage side
	KVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDP	250	Fc sequence
	NEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKLSGQLE ENLYFQS AAAEFRSCDKT	300	
	HTCPCPAPAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV	350	
	KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV	400	
	SNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY	450	
	PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV	500	
	SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*		
3xGFP-Fc sequence	MSSSSCGLSRVLAVALVATALVSASSDYDDDDKGSFPVATMVSKEEELFTGV	50	
	VPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTTLKFICTTGKLPVPWPPTLV	100	
	TTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAE	150	
	VKFEQDGLVNRVIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGI	200	
	KVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDP	250	
	NEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKGPVATMVSKEEELFTGVVPIILVE	300	
	LDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTTLKFICTTGKLPVPWPPTLVTTLYG	350	
	VQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVVKFEGD	400	
	TLVNRVIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKI	450	
	RHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDH	500	
	MVLEFVTAAGITLGMDELYKGPVATMVSKEEELFTGVVPIILVELDGDVN	550	
	GHKFSVSGEGEGDATYGKLTTLKFICTTGKLPVPWPPTLVTTLYGVQCFSR	600	
	YPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVVKFEGDGLVNRV	650	
	ELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIED	700	
	GSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMLLEF	750	
	VTAAGITLGMDELYKLSGQLE ENLYFQS AAAEFRSCDKTHTCPCPAPAE	800	
	GAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH	850	
	NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT	900	
	ISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG	950	
	QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNH	1000	
	YTQKSLSLSPGK*		

Abbildung 64: Sequenz der GFP-basierten synthetischen Liganden. Vom N- zum C-Terminus: IL-11R Signalpeptid (blau), FLAG-Tag (rot), GFP (grün), TEV Proteaseschnittstelle (dick gedruckt), Fc-Domäne (braun).

mCherry-Fc sequence **MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDK**GSSPVATMAIIKEFMRFKV 50 IL-11R signal peptide
HMEGsvnghefeIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTkGGPLPFAWDILSPQFM 100
YGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDG 150 FLAG-Tag
EFIIYKVKLRGTFNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLK 200 mCherry sequence
LKDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIIVEQYER 250
AEGRHSTGGMDELYKIGGK**LENLYFQSAAAE****F**RSCDKTHTCPPCPAPEAE 300 TEV cleavage side
GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH 350
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 400 Fc sequence
ISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG 450
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNH 500
YTQKSLSLSPGK*

3xmCherry-Fc sequence **MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDK**GSSPVATMAIIKEFMRFKV 50
HMEGsvnghefeIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTkGGPLPFAWDILSPQFM 100
YGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDG 150
EFIIYKVKLRGTFNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLK 200
LKDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIIVEQYER 250
AEGRHSTGGMDELYKIGSSPVATMAIIKEFMRFKVHMEGsvnghefeIEGE 300
GEGRPYEGTQTAKLKVTkGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY 350
LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTFNFPD 400
GPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYK 450
AKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK 500
SSPVATMAIIKEFMRFKVHMEGsvnghefeIEGEGEGRPYEGTQTAKLV 550
TKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMN 600
FEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTFNFPDGPVMQKKTMGWEASSE 650
RMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIK 700
LDITSHNEDYTIIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKIGGQ**LENLYFQSAAAE****F** 750
RSCDKTHTCPPCPAPEAE**G**APSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDV 800
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK 850
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLT 900
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW 950
QQGNVFCSCVMHEALHNNHY**T**QKSLSLSPGK*

Abbildung 65: Sequenz der mCherry-basierten synthetischen Liganden. Vom N- zum C-Terminus: IL-11R Signalpeptid (blau), FLAG-Tag (rot), mCherry (lila), TEV Proteaseschnittstelle (dick gedruckt), Fc-Domäne (braun).

GFP-mCherry-Fc sequence	MSSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDKGS SPVATMVSKGEELFTGV 50 VPILVELDGDVNGHKFSVSGEGGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPPTLV 100 TTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAE 150 VKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVIYIMADKQKNGI 200 KVNFKIRHNIEDGSQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDP 250 NEKRDHMLVLEFVTAAGITLGMDELYKGFVATMAI I KEFMRFKVHMEGSV 300 NGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAY 350 VKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKV 400 KLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGH 450 YDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDY TIVEQYERAEGRHS 500 TGGMDELYKLAARE ENLYFQ SAAAEFRSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFL 550 FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR 600 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQ 650 PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK 700 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHREALHNHYTQKSLS 750 LSPGK*	IL-11R signal peptide FLAG-Tag GFP sequence mCherry sequence TEV cleavage side Fc sequence
2xGFP-mCherry-Fc sequence	MSSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDKGS SPVATMVSKGEELFTGV 50 VPILVELDGDVNGHKFSVSGEGGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPPTLV 100 TTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAE 150 VKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVIYIMADKQKNGI 200 KVNFKIRHNIEDGSQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDP 250 NEKRDHMLVLEFVTAAGITLGMDELYKGFVATMVSKGEELFTGVVPILVE 300 LDGDVNGHKFSVSGEGGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPPTLVTTLYG 350 VQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGD 400 TLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVIYIMADKQKNGIKVNFKI 450 RHNIEDGSQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDH 500 MVLEFVTAAGITLGMDELYKGFVATMAI I KEFMRFKVHMEGSVNGHEFE 550 IEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPAD 600 IPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTN 650 FPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVK 700 TTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDY TIVEQYERAEGRHSTGGMDE 750 LYKLAARE ENLYFQ SAAAEFRSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPK 800 DTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS 850 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQV 900 YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV 950 LSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK*	

Abbildung 66: Sequenz der GFP und mCherry-basierten synthetischen Liganden. Vom N- zum C-Terminus: IL-11R Signalpeptid (blau), FLAG-Tag (rot), GFP (grün), mCherry (lila), TEV Proteaseschnittstelle (dick gedruckt), Fc-Domäne (braun).

GFP _{VHH} gp130 SyCyR	MSSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSEQKLISEEDLGSQVQLVESGGALVQP 50 GGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWRQAPGKEREWVAGMSSAGDRSSYEDSV 100 KGRFTISRDDARNTVYLQMNLSLKPEDTAVYCNVNVGFEYWGQGTQVTVS 150 SEFTTTPKFAQGEIEAIVVPVCLAFLLTLLGLVLCFNKRDLIKHIWIP 200 NVPDPSKSHIAQWSPHTFPRHNFNSKDQMYSDGNFTDVSVEIEANDKKP 250 FPEDLKSIDLFFKKEKINTEGHSSGIGSSCMSSSRPSISSDENESSQNT 300 SSTVQYSTVHSGYRHRQVPSVQVFSRSEATQPLLDSEERPEDLQLVDHVD 350 GGDGLPRQYFKQNCQSQHESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQIS 400 DHISQSCGSGQMKMFQEVSAADAFGPGTEGQVERFETVGMEEAATDEGM 450 SYLPQTVRQGGYMPQAAARV*	IL-11R signal peptide myc-Tag GFP _{VHH} gp130
mCherry _{VHH} gp130 SyCyR	MSSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDKGSYPYDVPDYAGSQVQLVE 50 SGGGLVQAGGSLRLSCATSGFTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGH 100 VTDYADSVKGRFTISRDNVKNVTYVLQMNLSLKPEDTAVYSCAAAKSGTWWY 150 QRSENDFGSWGQGTQVTVSKEAIEF TFTP KFAQGEIEAIVVPVCLAFLL 200 TLLGLVLCFNKRDLIKHIWIPNVPDPSKSHIAQWSPHTFPRHNFNSKDQ 250 MYSDGNFTDVSVEIEANDKKPFPEDLKSIDLFFKKEKINTEGHSSGIGGS 300 SCMSSSRPSISSDENESSQNTSSTVQYSTVHSGYRHRQVPSVQVFSRSE 350 ATQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGGDGLPRQYFKQNCQSQHESSPDISHF 400 ERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMKMFQEVSAADAFGPGT 450 EQQVERFETVGMEEAATDEGMFKSYLPQTVRQGGYMPQAAASRGPV*	IL-11R signal peptide FLAG-Tag HA-Tag mCherry _{VHH} gp130

Abbildung 67: gp130-SyCyR Sequenz. Vom N- zum C-Terminus GFP_{VHH}gp130: IL-11R Signalpeptid (blau), myc-Tag (braun), GFP_{VHH} (grün), gp130 (dick gedruckt). Vom N- zum C-Terminus mCherry_{VHH}gp130: IL-11R Signalpeptid (blau), FLAG-Tag (grün), HA-Tag (lila), mCherry_{VHH} (rot), gp130 (dick gedruckt).

GFP _{VHH} IL-22Rα1 SyCyR	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSEQKLISEEDLGSQVQLVESGGALVQP	50	IL-11R signal peptide
	GGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQAPGKEREWVAGMSSAGDRSSYEDSV	100	myc-Tag
	KGRFTISRDDARNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNVNVGFEYWGQGTQVTVS	150	GFP _{VHH}
	SEFTLPDRTWAYSFSGAVLFSMGFLVGLLCYLGYKYITKPPVFPNSLNVQ	200	IL-22Rα1
	RVLTFQPLRFIQEHVLIPLVLDLSGSSSLPQPIQYSQVIVSGPREPPGAVV	250	
	RQSLSDLTYVGGQSDVSILOPTNVPAQQTLSPPSYAPKAVPEVQPPSYAPQ	300	
	VASDAKALFYSFQQGMKTRPATYDFQDILDSCFASYAVCVEDSGKSTPG	350	
	ILSTPKYLKTKGQLQEDTLVRSCLPGDLSLQKVTSLGEGEQTQRPKSLPSP	400	
	LGFTDRGFDLHTRSEEPETFRYLKGLSLLSSVQIEGHFVSLPLHVHS	450	
	VSCSPSDEGSPFWGLLDSLVCFKDEGPAVETEAMCPSAAASELEQSTELD	500	
SLFKGLALTVQWES*			
mCherry _{VHH} IL-10R2 SyCyR	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDKGSYPYDVPDYAGSQVQLVE	50	IL-11R signal peptide
	SGGGLVQAGGSLRLSCATSGFTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGH	100	FLAG-Tag
	VTDYADSVKGRFTISRDNVKNVTYVYLQMNLSLKPEDTAVYSCAAAKSGTWWY	150	HA-Tag
	QRSEDFGSWGQGTQVTVSKEAIEFRITGNDEITPSWIVAIILIVSVLVVF	200	mCherry _{VHH}
	LFLLGCFVVLWLIYKTKHTFRSGTSLPQHLKEFLGHPHSTFLLFSFPP	250	IL-10R2
	PEEAEVFDKLSIISESESGSKQSPEDNCASEPPSDPGPRELESKDEAPSP	300	
	PHDDPKLLTSTSEV*		

Abbildung 68: IL-22Rα1 und IL-10R2-SyCyR Sequenz. Vom N- zum C-Terminus GFP_{VHH}IL-22Rα1: IL-11R Signalpeptid (blau), myc-Tag (braun), GFP_{VHH} (grün), IL-22Rα1 (dick gedruckt). Vom N- zum C-Terminus mCherry_{VHH}IL-10R2: IL-11R Signalpeptid (blau), FLAG-Tag (grün), HA-Tag (lila), mCherry_{VHH} (rot), IL-10R2 (dick gedruckt).

mCherry _{VHH} IL-10R2 SyCyR(Δ330)	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDKGSYPYDVPDYAGSQVQLVE	50	IL-11R signal peptide
	SGGGLVQAGGSLRLSCATSGFTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGH	100	FLAG-Tag
	VTDYADSVKGRFTISRDNVKNVTYVYLQMNLSLKPEDTAVYSCAAAKSGTWWY	150	HA-Tag
	QRSEDFGSWGQGTQVTVSKEAIEFRITGNDEITPSWIVAIILIVSVLVVF	200	mCherry _{VHH}
	LFLLGCFVVLWLIYKTKHTFRSGTSLPQHLKEFLGHPHSTFLLFSFPP	250	IL-10R2(Δ330)
	PEEAEVFDKLSIISESESGSKQSPEDNCASEPPSDPGPRELES		
mCherry _{VHH} IL-10R2 SyCyR(Δ310)	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDKGSYPYDVPDYAGSQVQLVE	50	IL-11R signal peptide
	SGGGLVQAGGSLRLSCATSGFTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGH	100	FLAG-Tag
	VTDYADSVKGRFTISRDNVKNVTYVYLQMNLSLKPEDTAVYSCAAAKSGTWWY	150	HA-Tag
	QRSEDFGSWGQGTQVTVSKEAIEFRITGNDEITPSWIVAIILIVSVLVVF	200	mCherry _{VHH}
	LFLLGCFVVLWLIYKTKHTFRSGTSLPQHLKEFLGHPHSTFLLFSFPP	250	IL-10R2(Δ310)
	PEEAEVFDKLSIISESESGSKQSPEDNCASEPPSDPGPRELES		
mCherry _{VHH} IL-10R2 SyCyR(Δ280)	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDKGSYPYDVPDYAGSQVQLVE	50	IL-11R signal peptide
	SGGGLVQAGGSLRLSCATSGFTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGH	100	FLAG-Tag
	VTDYADSVKGRFTISRDNVKNVTYVYLQMNLSLKPEDTAVYSCAAAKSGTWWY	150	HA-Tag
	QRSEDFGSWGQGTQVTVSKEAIEFRITGNDEITPSWIVAIILIVSVLVVF	200	mCherry _{VHH}
	LFLLGCFVVLWLIYKTKHTFRSGTSLPQHLKEFLGHPHSTF		IL-10R2(Δ280)
mCherry _{VHH} IL-10R2 SyCyR(Δ255)	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDKGSYPYDVPDYAGSQVQLVE	50	IL-11R signal peptide
	SGGGLVQAGGSLRLSCATSGFTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGH	100	FLAG-Tag
	VTDYADSVKGRFTISRDNVKNVTYVYLQMNLSLKPEDTAVYSCAAAKSGTWWY	150	HA-Tag
	QRSEDFGSWGQGTQVTVSKEAIEFRITGNDEITPSWIVAIILIVSVLVVF	200	mCherry _{VHH}
	LFLLGCFVVLWLIYKTKHTFRSGTSLPQHLKEFLGHPHSTF		IL-10R2(Δ255)

Abbildung 69: Sequenzen der mCherry_{VHH}IL-10R2 Deletionsvarianten. Vom N- zum C-Terminus: IL-11R Signalpeptid (blau), FLAG-Tag (grün), HA-Tag (lila), mCherry_{VHH} (rot), IL-10R2 Deletionsvariante (dick gedruckt).

mCherry _{V_{HH}} IL-10R2(P320A, P323A) SyCyR	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDKGSYPYDVPDYAGSQVQLVE 50	IL-11R signal peptide
	SGGGLVQAGGSLRLSCATSGFTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGH	100
	VTDYADSVKGRFTISRDNVKNVTYVLMNSLKPEDTAVYSCAAAKSGTWWY	150
	QRSEDFGSGWGQGTQVTVSKEAIEFRTGNDEITPSWIVAILLIVSVLVVF	200
	LFLGCFVVLWLIYKTKHTFRSGTSLPQHLKEFLGHPHHSTFLLFSFPP	250
	PEEAEVFDKLSIIIEESESGSKQSPEDNCASEPPSPDPGPRELESKDEAFSP	300
	PHDDPKLLTSTSEV*	
		mCherry _{V_{HH}}
		IL-10R2 (P320A, P323A)
mCherry _{V_{HH}} IL-10R2(P320A, P323A, Δ330) SyCyR	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDKGSYPYDVPDYAGSQVQLVE 50	IL-11R signal peptide
	SGGGLVQAGGSLRLSCATSGFTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGH	100
	VTDYADSVKGRFTISRDNVKNVTYVLMNSLKPEDTAVYSCAAAKSGTWWY	150
	QRSEDFGSGWGQGTQVTVSKEAIEFRTGNDEITPSWIVAILLIVSVLVVF	200
	LFLGCFVVLWLIYKTKHTFRSGTSLPQHLKEFLGHPHHSTFLLFSFPP	250
	PEEAEVFDKLSIIIEESESGSKQSPEDNCASEPPSPDPGPRELES	
		mCherry _{V_{HH}}
		IL-10R2 (P320A, P323A, Δ330)

Abbildung 70: Sequenzen der mCherry_{V_{HH}}IL-10R2 Mutationsvarianten. Vom N- zum C-Terminus: IL-11R Signalpeptid (blau), FLAG-Tag (grün), HA-Tag (lila), mCherry_{V_{HH}} (rot), IL-10R2 Mutationsvariante (dick gedruckt).

GFP _{V_{HH}} TNFR1 SyCyR	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSEQKLI SEEDLGSQVQLVESGGALVQP 50	IL-11R signal peptide
	GGSLRLSCAASGFPPVNRYSMRWYRQAPGKEREWVAGMSSAGDRSSYEDSV	100
	KGRFTISRDDARNTVYVLMNSLKPEDTAVYYCNVNVGFEYWGQGTQVTVS	150
	SEFKGTEDSGTTVLLPLVIFFLGCLLSLLFGLMYRYQRWKSPLYIVCG	200
	KSTPEKEGELEGTTTKPLAPNPSFSPTPGFTPTLGFSPVPSSTFTSSSTY	250
	TPGDCFNFAAPRREVAPPYQGADPILATALASDPIPNPLQKWEDSAHKPQ	300
	SLDTRDPATLYAVVENVPLRWKEFVRLGLSDHEIDRLELQNGRCLREA	350
	QYSMLATWRRRTPPREATLELLGRVLRDMDLLGCLEDIEEALCGPAALPP	400
	APSLRAAA*	
		myc-Tag
		GFP _{V_{HH}}
		TNFR1
mCherry _{V_{HH}} TNFR2 SyCyR	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDKGSQVQLVESGGGLVQAGGS 50	IL-11R signal peptide
	LRLSCATSGFTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGHVTDYADSVKGR	100
	FTISRDNVKNVTYVLMNSLKPEDTAVYSCAAAKSGTWWYQRSEDFGSGWG	150
	QGTQVTVSKEAIEFPFAEGSTGDFALPVGLIVGVTALGLLIIGVVNCVIM	200
	TQVKKKPLCLQREAKVPHLPADKARGTQGFQEQHLLITAPSSSSSSLESS	250
	ASALDRRAPTRNQAPGVEASGAGEARASTGSSDSSPGHGTQVNVTCI	300
	VNVCSDDHSSQCSQASSTMGDTDSSPSES PKDEQVFFSKECAFRSQL	350
	ETPETLLGSTEEKPLPLGVFDAGMKPS*	
		mCherry _{V_{HH}}
		TNFR2

Abbildung 71: Sequenz der TNFR-SyCyRs. Vom N- zum C-Terminus GFP_{V_{HH}}TNFR1: IL-11R Signalpeptid (blau), myc-Tag (braun), GFP_{V_{HH}} (grün), TNFR1 (dick gedruckt). Vom N- zum C-Terminus mCherry_{V_{HH}}TNFR2: IL-11R Signalpeptid (blau), FLAG-Tag (grün), mCherry_{V_{HH}} (rot), TNFR2 (dick gedruckt).

GFP _{V_{HH}} FasR SyCyR	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSEQKLI SEEDLGSQVQLVESGGALVQP 50	IL-11R signal peptide
	GGSLRLSCAASGFPPVNRYSMRWYRQAPGKEREWVAGMSSAGDRSSYEDSV	100
	KGRFTISRDDARNTVYVLMNSLKPEDTAVYYCNVNVGFEYWGQGTQVTVS	150
	SEFMCKEEGSRNLGWLCLLLLPIPLIVVVKRKEVQKTCRKHHRKENQGS	200
	ESPTLNPETVAINLSDVDLSKYITTIAGVMTLSQVKGFVRKNGVNEAKID	250
	EIKNDNVQDTAEQKVQLLRNWHQLHGKKEAYDTLIKDLKKNLCTLAEKI	300
	QTIILKIDITSDSENSFRNEIQSLV*	
		myc-Tag
		GFP _{V_{HH}}
		FasR
mCherry _{V_{HH}} FasR SyCyR	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDKGSYPYDVPDYAGSQVQLVE 50	IL-11R signal peptide
	SGGGLVQAGGSLRLSCATSGFTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGH	100
	VTDYADSVKGRFTISRDNVKNVTYVLMNSLKPEDTAVYSCAAAKSGTWWY	150
	QRSEDFGSGWGQGTQVTVSKEAIEFMCKEEGSRNLGWLCLLLLPIPLIV	200
	VVKRKEVQKTCRKHHRKENQGSHEPTLNPETVAINLSDVDLSKYITTIAG	250
	VMTLSQVKGFVRKNGVNEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQLLRNWHQLHGK	300
	EAYDTLIKDLKKNLCTLAEKIQTIILKIDITSDSENSFRNEIQSLV*	
		mCherry _{V_{HH}}
		FasR
mCherry _{V_{HH}} FasR E256G SyCyR	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDKGSYPYDVPDYAGSQVQLVE 50	IL-11R signal peptide
	SGGGLVQAGGSLRLSCATSGFTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGH	100
	VTDYADSVKGRFTISRDNVKNVTYVLMNSLKPEDTAVYSCAAAKSGTWWY	150
	QRSEDFGSGWGQGTQVTVSKEAIEFMCKEEGSRNLGWLCLLLLPIPLIV	200
	VVKRKEVQKTCRKHHRKENQGSHEPTLNPETVAINLSDVDLSKYITTIAG	250
	VMTLSQVKGFVRKNGVNEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQLLRNWHQLHGK	300
	EAYDTLIKDLKKNLCTLAEKIQTIILKIDITSDSENSFRNEIQSLV*	
		mCherry _{V_{HH}}
		FasR E256G

Abbildung 72: Sequenzen der FasR-SyCyR Varianten. Vom N- zum C-Terminus GFP_{V_{HH}}FasR: IL-11R Signalpeptid (blau), myc-Tag (braun), GFP_{V_{HH}} (grün), FasR (dick gedruckt). Vom N- zum C-Terminus mCherry_{V_{HH}}FasR: IL-11R Signalpeptid (blau), FLAG-Tag (grün), HA-Tag (lila), mCherry_{V_{HH}} (rot), FasR (dick gedruckt).

gedruckt). Vom N- zum C-Terminus mCherry_{VHH}FasR-E256G: IL-11R Signalpeptid (blau), FLAG-Tag (grün), HA-Tag (lila), mCherry_{VHH} (rot), FasR (dick gedruckt).

PD-L1-Fc **MSSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSFTTVVFKDLVYVEYGSNMTECKFPV** 50 IL-11R signal peptide
EKQLDLAALIVYWEDEKNI IQFVHGEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSL 100 PD-L1
GNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAFYNKINQRILVV 150
DPVTSEHLETCQAEQYKAEVIWTSDDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVT 200 Fc
STLRINTTNEI FYCTFRRLDPEENHTAELVI PELPLAHPNPERAARENL 250
YFQSAAAEFRSCDKTHTCPPEAPEAEGAPSVFLFPPKPKDITLMISRTPE 300
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV 350
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM 400
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYS 450
KLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNYTQKSLSLSPGK*

PD-1-gp130 **MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDYPYDVPDYARPWNPTFSPAL** 50 PD-1 signal peptide
LVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVNLNWRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQ 100 HA-Tag
DCRFERVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSTYLCGAIISLAPKAQIKESLRAE 150
LRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVAIVVFVCLAFLLTLLGLVFC 200 PD-1
FNKRDLIKKHIWPNVDPSPKSHIAQWSPHTPPRHFNNSKDMYSDGNFTD 250 gp130
VSVVIEANDKKFPEDLKSLLDFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPS 300
ISSDENESSQNTSSTVQYSTVHSGYRHQVPSVQVFSRSEATQPLLDSE 350
ERPEDLQLVDHVDGGDILPRQYFKQNCQHESSPDI SHFERSKQVSSV 400
NEEDFVRLKQOISDHISQSCGSGQMKMFQEVSAADAFPGTEGQVERFET 450
VGMEAATDEGMFKSYLPQTIVRQGGYMPQAAAEQKLI SEEDLNGAVE*

Abbildung 73: Sequenzen des PD-1 basierten SyCyR-Systems. Vom N- zum C-Terminus: IL-11R Signalpeptid (blau) PD-L1 (dick gedruckt), Fc-Domäne (braun). Vom N- zum C-Terminus: PD-1 Signalpeptid (blau), HA-Tag (lila), PD-1 (grün), gp130 (dick gedruckt).

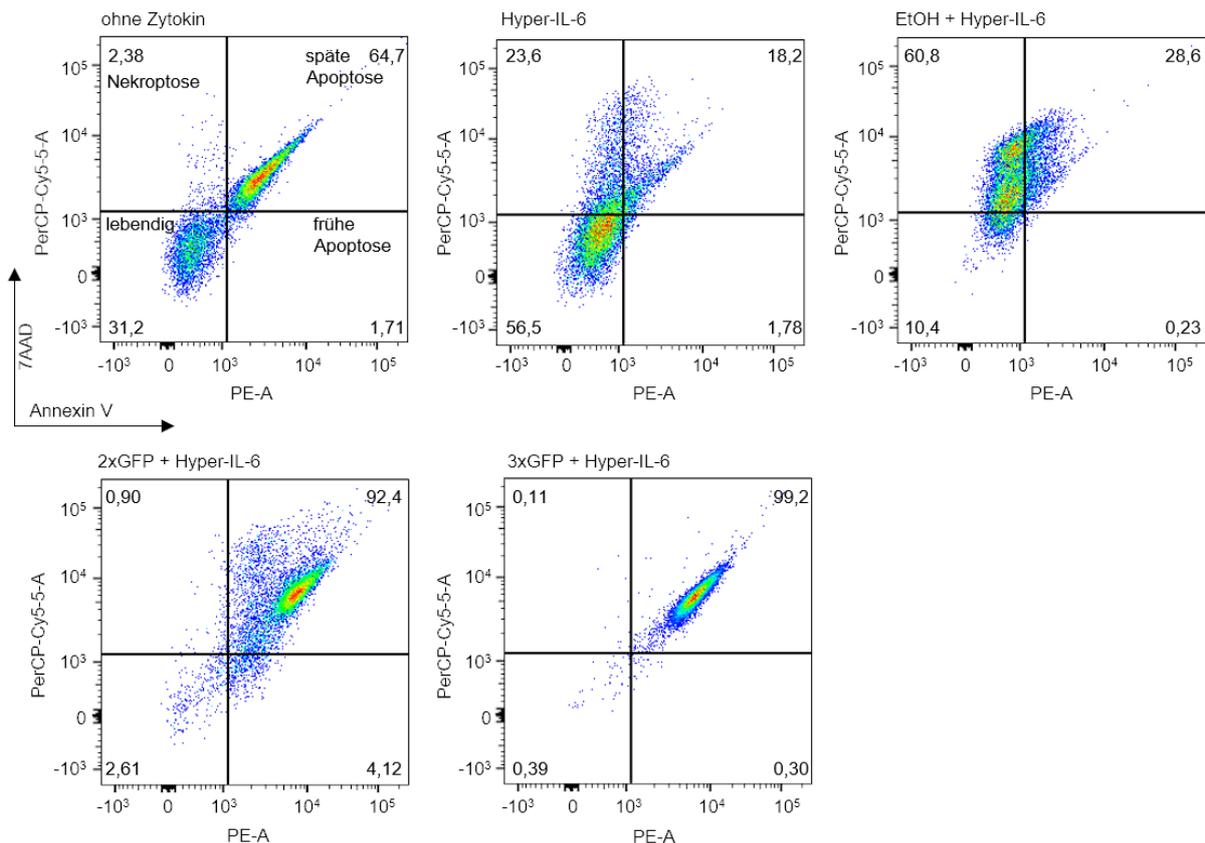


Abbildung 74: Zelltodanalyse mittels Annexin V und 7-AAD. Ba/F3/gp130/GFP_{VHH}FasR Zellen wurden für 72 h ohne Zytokin oder mit je 10 ng/mL Hyper-IL-6 inkubiert. Bei manchen Bedingungen wurden die Zellen zusätzlich mit 100 ng/mL 2xGFP oder 3xGFP inkubiert. Als Positivkontrolle für Zelltod wurden Zellen, welche für 72 h nur mit Hyper-IL-6 inkubiert wurden vor der Messung zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Die Zellen wurden gleichzeitig mit Annexin V und mit 7-AAD für 15 min inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist ein Experiment aus n=3 unabhängigen Experimenten.

Die während dieser Arbeit generierten Plasmide sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 13: Während dieser Arbeit generierte Plasmide.

Plasmid	Referenz	Resistenz
pMOWS-puro-myc-GFP _{VHH} TNFR1	AG Scheller	Ampicillin
pMOWS-hygro-FLAG-mCherry _{VHH} TNFR1	AG Scheller	Ampicillin
pMOWS-puro-myc-GFP _{VHH} TNFR2	AG Scheller	Ampicillin
pMOWS-hygro-FLAG-mCherry _{VHH} TNFR2	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-myc-GFP _{VHH} FasR	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-HA-mCherry _{VHH} FasR	AG Scheller	Ampicillin
pMOWS-puro-myc-GFP _{VHH} FasR	AG Scheller	Ampicillin
pMOWS-hygro-HA-mCherry _{VHH} FasR	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-mCherry-TEV-Fc	[169]	Ampicillin
pcDNA3.1-GFP-TEV-Fc	[169]	Ampicillin
pcDNA3.1-3xmCherry-TEV-Fc	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-3xGFP-TEV-Fc	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-PD-1	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-HA-PD-1-gp130	AG Scheller	Ampicillin
pMOWS-puro-HA-PD-1-gp130	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-HA-mCherry _{VHH} gp130	[169]	Ampicillin
pMOWS-hygro-HA-mCherry _{VHH} gp130	[169]	Ampicillin
pcDNA3.1-PDL-1-TEV-Fc	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-GFP-mCherry-TEV-Fc	[169]	Ampicillin
pcDNA3.1-2xGFP-mCherry-TEV-Fc	[169]	Ampicillin
pcrScript-ICD IL-10R2Δ330	[168]	Ampicillin
pcrScript-ICD IL-10R2Δ310	[168]	Ampicillin
pcrScript-ICD IL-10R2Δ280	[168]	Ampicillin
pcrScript-ICD IL-10R2Δ255	[168]	Ampicillin
pcDNA3.1-HA-mCherry _{VHH} IL-10R2Δ330	[168]	Ampicillin
pcDNA3.1-HA-mCherry _{VHH} IL-10R2Δ310	[168]	Ampicillin
pcDNA3.1-HA-mCherry _{VHH} IL-10R2Δ280	[168]	Ampicillin
pcDNA3.1-HA-mCherry _{VHH} IL-10R2Δ255	[168]	Ampicillin
pMOWS-hygro-HA-mCherry _{VHH} IL-10R2Δ330	[168]	Ampicillin
pMOWS-hygro-HA-mCherry _{VHH} IL-10R2Δ310	[168]	Ampicillin
pMOWS-hygro-HA-mCherry _{VHH} IL-10R2Δ280	[168]	Ampicillin
pMOWS-hygro-HA-mCherry _{VHH} IL-10R2Δ255	[168]	Ampicillin
pcDNA3.1-HA-mCherry _{VHH} FasR mut Death Domäne	AG Scheller	Ampicillin
pMOWS-hygro-HA-mCherry _{VHH} FasR mut Death Domäne	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-HA-mCherry _{VHH} IL-10R2 P320A P323A	[168]	Ampicillin
pcDNA3.1-HA-mCherry _{VHH} IL-10R2Δ330 P320A P323A	[168]	Ampicillin
pMOWS-hygro-HA-mCherry _{VHH} IL-10R2 P320A P323A	[168]	Ampicillin
pMOWS-hygro-HA-mCherry _{VHH} IL-10R2Δ330 P320A P323A	[168]	Ampicillin

In Tabelle 14 sind, die während dieser Arbeit generierten, stabilen Zelllinien gezeigt.

Tabelle 14: In dieser Arbeit generierte, stabile Zelllinien

Ba/F3/gp130 Zelllinien	Zytokin	Resistenz
GFP _{VHH} TNFR1	HIL-6	Puromycin
mCherry _{VHH} TNFR2	HIL-6	Hygromycin
GFP _{VHH} TNFR1/mCherry _{VHH} TNFR2	HIL-6	Hygromycin, Puromycin
GFP _{VHH} gp130	HIL-6	Puromycin
mCherry _{VHH} gp130	HIL-6	Hygromycin
GFP _{VHH} gp130/mCherry _{VHH} gp130	HIL-6	Hygromycin, Puromycin
mCherry _{VHH} FasR	HIL-6	Hygromycin
GFP _{VHH} FasR	HIL-6	Puromycin
mCherry _{VHH} IL-10R2	HIL-6	Hygromycin
GFP _{VHH} IL-22R α 1	HIL-6	Puromycin
mCherry _{VHH} IL-10R2/GFP _{VHH} IL-22R α 1	HIL-6	Hygromycin, Puromycin
GFP _{VHH} IL-10R2/mCherry _{VHH} gp130	HIL-6	Hygromycin, Puromycin
GFP _{VHH} gp130/mCherry _{VHH} IL-10R2 Δ 310	HIL-6	Hygromycin, Puromycin
GFP _{VHH} gp130/mCherry _{VHH} IL-10R2 Δ 280	HIL-6	Hygromycin, Puromycin
GFP _{VHH} gp130/mCherry _{VHH} FasR	HIL-6	Hygromycin, Puromycin
mCherry _{VHH} IL-10R2 Δ 330	HIL-6	Hygromycin
mCherry _{VHH} IL-10R2 Δ 310	HIL-6	Hygromycin
mCherry _{VHH} IL-10R2 Δ 280	HIL-6	Hygromycin
mCherry _{VHH} IL-10R2 Δ 255	HIL-6	Hygromycin
GFP _{VHH} IL-22R α 1/ mCherry _{VHH} IL-10R2 Δ 330	HIL-6	Hygromycin, Puromycin
GFP _{VHH} IL-22R α 1/ mCherry _{VHH} IL-10R2 Δ 310	HIL-6	Hygromycin, Puromycin
GFP _{VHH} IL-22R α 1/ mCherry _{VHH} IL-10R2 Δ 280	HIL-6	Hygromycin, Puromycin
GFP _{VHH} IL-22R α 1/ mCherry _{VHH} IL-10R2 Δ 255	HIL-6	Hygromycin, Puromycin
IL-10R2/IL-22R α 1	HIL-6	Hygromycin, Puromycin
IL-10R2	HIL-6	Puromycin
mCherry _{VHH} FasR mut Death Domäne	HIL-6	Hygromycin
mCherry _{VHH} IL-10R2 P320A P323A	HIL-6	Hygromycin
mCherry _{VHH} IL-10R2 Δ 330 P320A P323A	HIL-6	Hygromycin
GFP _{VHH} IL-22R α 1/mCherry _{VHH} IL-10R2 P320A P323A	HIL-6	Hygromycin, Puromycin
GFP _{VHH} IL-22R α 1/mCherry _{VHH} IL-10R2 Δ 330 P320A P323A	HIL-6	Hygromycin, Puromycin
PD-1-gp130	HIL-6	Puromycin
CHO K1 Zelllinien		Resistenz
GFP-Fc		G418
3xGFP-Fc		G418
mCherry-Fc		G418
3xmCherry-Fc		G418
GFP-mCherry-Fc		G418
2xGFP-mCherry-Fc		G418
PD-L1-Fc		G418

Des Weiteren wurden die folgenden synthetischen Zytokine während dieser Arbeit generiert.

Tabelle 15: Synthetische Zytokine, welche in dieser Arbeit generiert und verwendet wurden.

Synthetische Zytokine	Stammkonzentration [$\mu\text{g/mL}$]
GFP	2,3
GFP-Fc	400
3xGFP-Fc	46
mCherry	3
mCherry-Fc	410
3xmCherry-Fc	450
GFP-mCherry-Fc	680
2xGFP-mCherry-Fc	870

7. Danksagung

Als erstes geht mein herzlicher Dank an Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller, der mir die Möglichkeit gegeben hat meine Dissertation am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II durchzuführen. Mein Dank gilt der hervorragenden Betreuung, den konstruktiven Gesprächen, der Unterstützung und des Vertrauens in meine Arbeit. Vielen Dank, dass deine Tür immer offen war!

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Björn Stork für die Übernahme des Zweitgutachtens und seinen Einsatz bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht an Dr. Doreen M. Floss, die mir zu allen Tages- und Nachtzeiten geholfen hat und in jeglichen Situationen zur Seite stand. Durch deine Unterstützung und deinen unermüdlichen Einsatz hast du einen erheblichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

Darüber hinaus möchte ich mich bei dem gesamten Institut für Biochemie und Molekularbiologie II für ihre Unterstützung und die schöne Arbeitsatmosphäre bedanken. Mein Dank gilt zunächst PhD Jens Moll für seine Hilfe bei etlichen Proteinreinigungen und den stetigen Austausch. Ein großes Dankeschön geht zudem an Dr. Erika Engelowski, Dr. Nastaran Fazel Modares, Marcus Kuchner, Dr. Robin Polz, Alessandra Esch, Dr. Paul Baran, Dr. Manuel Franke und Dr. Larissa Lamertz. Es hat immer sehr viel Spaß gemacht mit euch zusammen im Labor zu stehen. Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr für mich hattet. Zudem möchte ich mich besonders bei Petra Opreé-Jeremic für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft und ihren Einsatz bedanken!

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie für ihre einzigartige Unterstützung während dieser Zeit bedanken. Vielen Dank für euer Vertrauen!

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel und Quellen unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlichen Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 03.07.2020

Sofie Moßner