Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller

Konstruktion synthetischer Zytokinrezeptoren zur Vermittlung einer IL-23artigen Signaltransduktion

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Artur Schneider 2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Björn Stork Krebs beginnt und endet mit dem Menschen. Diese eine elementare Tatsache wird bei aller wissenschaftlichen Abstraktion zuweilen vergessen. Ärzte behandeln Krankheiten, aber sie behandeln auch Menschen, und diese Grundgegebenheit ihrer beruflichen Existenz zieht sie manchmal gleichzeitig in entgegengesetzte Richtungen.

June Goodfield

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Engelowski, E.*, Schneider, A.*, Franke, M.*, Xu, H., Clemen, R., Lang, A., Baran, P., Binsch, C., Knebel, B., Al-Hasani, H., Moll, J.M., Floss, D.M., Lang, P.A., Scheller, J., (2018), Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands. *Nature Communications*, (9) 2034

**These authors contributed equally.*

Zusammenfassung

Zytokine sind parakrin und autokrin wirkende Proteine, die wichtige immunmodulatorische Prozesse steuern. Das Zytokin Interleukin- (IL) 23 ist ein Mitglied der heterodimeren IL-12-Zytokinfamilie und spielt eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl von Autoimmun- und Krebserkrankungen. Trotz der zunehmenden klinischen Relevanz synthetischer Rezeptoren ist ein hintergrundfreies und schaltbares synthetisches Zytokinrezeptorsystem mit vollständiger Kontrolle über die Rezeptorzusammensetzung bisher noch nicht beschrieben worden. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass synthetische Zytokinrezeptoren unter Verwendung nicht-physiologischer Liganden in der Lage sind, Signaltransduktionen spezifisch und hintergrundfrei zu phänokopieren. Hierfür diente der IL-23 Rezeptorkomplex als Beispiel. Der IL-23 Rezeptorkomplex, der sich aus dem Interleukin-23 Rezeptor (IL-23R) und dem Interleukin-12 Rezeptor beta 1 (IL-12RB1) zusammensetzt, löst durch Heterodimerisierung eine Signaltransduktion via JAK/STAT-, MAPK/ERK1/2-, PI3K/AKT- und NF-kB-Signalwege aus. Im Rahmen dieser Arbeit wurden synthetische Zytokinrezeptoren (SyCyRs) designt, wobei Einzeldomänen-Antikörper (nanobodies, VHH), die gegen die fluoreszierenden Proteine GFP (G_{VHH}) und mCherry (C_{VHH}) gerichtet sind, die extrazellulären, ligandenbindenden Domänen des IL-23 Rezeptorkomplexes ersetzten. Die intrazellulären und transmembranären Domänen des IL-12RB1 wurden mit einem GVHH und die des IL-23R mit einem CVHH fusioniert. Folglich konnte die Bindung von heterodimeren GFP:mCherry-Fusionsproteinen als synthetische Liganden eine Rezeptordimerisierung initialisieren. Die artifizielle Stimulation von IL-23-SyCyRs exprimierenden Ba/F3-gp130-Zellen induzierte die Proliferation der Zellen und die Aktivierung von STAT3, ERK1/2 und AKT. Überdies wurde die biologische Aktivität von IL-23R-Homodimeren mittels SyCyRs nachgewiesen. Die Fusion von GVHH an den IL-23R und artifizielle Stimulation mit homodimeren GFP-Fusionsproteinen induzierte eine IL-23ähnliche Signaltransduktion. Die SyCyR-Technologie ermöglicht die biochemische Analyse von Rezeptorstöchiometrie und Signaltransduktionen in vitro und in vivo, die zelltypspezifische Rezeptoraktivierung in transgenen Mäusen und bietet daher ein großes Potential für neue Therapiestrategien in der Immuntherapie.

Summary

Cytokines are paracrine and autocrine acting proteins that control pivotal immunomodulating processes. The cytokine Interleukin- (IL) 23 is a member of the heterodimeric IL-12 cytokine family and plays a crucial role in a plethora of autoimmune diseases and cancer. Despite the increasing clinical impact of synthetic receptors, a background-free and switchable synthetic cytokine receptor system with entire control of receptor assembly has not been described yet. In this study, it is demonstrated that synthetic cytokine receptors are capable of specific and background-free phenocopying signal transductions using non-physiological ligands. For this purpose, the IL-23 receptor complex served as an example. The IL-23 receptor complex, which is composed of Interleukin-23 receptor (IL-23R) and Interleukin-12 receptor beta 1 (IL-12R\beta1), elicits signal transduction JAK/STAT, MAPK/ERK1/2, PI3K/AKT via and NF-*k*B pathways through heterodimerization. Within the framework of this study, synthetic cytokine receptors (SyCyRs) were designed, with single-domain antibodies (nanobodies, VHH) directed against the fluorescent proteins GFP (G_{VHH}) and mCherry (C_{VHH}) replacing the extracellular, ligand-binding domains of the IL-23 receptor complex. Intracellular and transmembrane domains of IL-12RB1 were fused to G_{VHH} and those of IL-23R to C_{VHH}. Thus, binding of heterodimeric GFP:mCherry fusion proteins as synthetic ligands was able to initialize receptor dimerization. Artificial stimulation of Ba/F3-gp130-cells expressing IL-23-SyCyRs induced cell proliferation and activation of STAT3, ERK1/2 and AKT. Moreover, biological activity of IL-23R-homodimers was verified by use of SyCyRs. Fusion of G_{VHH} to IL-23R and artificial stimulation with homodimeric GFP fusion proteins induced an IL-23-like signal transduction. The SyCyR technology allows biochemical analysis of receptor stoichiometry and signal transduction in vitro and in vivo, cell-specific activation in transgene mice and therefore provides major potential for new therapeutic regimes in immunotherapy.

Abkürzungsverzeichnis

Die Bezeichnungen und Abkürzungen von Elementen, chemischen Verbindungen und Enzymen erfolgen nach den von der IUPAC und IUBMB erarbeiteten Nomenklaturen. Für die Aminosäuresequenz von Peptiden und Proteinen wird der vom IUPAC-IUBMB Nomenklaturkomitee empfohlene Drei- bzw. Einbuchstabencode verwendet. Für physikalische Größen wird das internationale Einheitensystem (SI-Einheiten) genutzt. Abkürzungen von Ländern und Orten (z.B. USA) sind nicht aufgelistet.

AK	Antikörper	dsDNA	doppelsträngige DNA
Abb.	Abbildung	DSMZ	Deutsche Sammlung für
AG	Arbeitsgruppe		Mikroorganismen und Zellkulturen
AKT	Proteinkinase B	DSS	dextrane sodium sulfate
ALL	akute lymphatische Leukämie	EAE	experimentelle
Атр	Ampicillin		Autoimmunenzephalitis
APC	antigenpräsentierende Zelle	EBI3	Epstein-Barr virus induced
APS	Ammoniumpersulfat	ECD	gene 3
AS	Aminosäure	ECD	extrazelluläre Domäne
АТР	Adenosintriphosphat	E.coli	Escherichia coli
bp (kb)	Basenpaare (Kilobasen)	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
BCA	Bicinchoninsäure	EGFP	enhanced GFP
BSA	bovines Serumalbumin	EGFR	epidermal growth factor receptor
CAR	chimeric antigen receptor	ELISA	enzyme-linked immunosorbent
CD	cluster of differentiation		assay
cDNA	complementary DNA	ELP	elastin-like polypeptide
CED	chronisch-entzündliche	EPO	Erythropoetin
	Darmerkrankungen	EpoR	Erythropoetin Rezeptor
СН СНО	constant domain of heavy chain chinese hamster ovary	ERK1/2	extracellular signal-regulated kinases 1 and 2
CRISPR/Cas9	clustered regularly interspaced	et al.	et alii
	short palindromic repeats/ CRISPR-associated 9	Fab- Fragment	fragment antigen binding
CRS	cytokine release syndrome	FACS	fluorescence activated cell
Сунн	mCherry-nanobody		sorting
DLBCL	diffus-großzelliges B-Zell-	FasL	Fas-Ligand
	Lymphom	FasR	Fas-Rezeptor
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium	Fc-Fragment	fragment crystallizable
DMSO	Dimethylsulfoxid	FCS	fötales Kälberserum
DNA	Desoxyribonukleinsäure	FDA	U.S. Food and Drug
dNTP	Desoxyribonukleotide	FK506	Taerolimus
		1 15.00	1 4010111145

FKBP	FK506 binding protein	MS	multiple Sklerose
α-Flag	Flag Antikörper	Neomycin	Neo
FNIII	Fibronektin Typ III	NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
FP	fwd-Primer	ns	nicht signifikant
fwd	forward	NSCLC	nicht-kleinzelliges
FZD	Wnt-Rezeptor frizzled	ODE	Lungenkarzinom
GFP	green fluorescent protein	ORF	offenes Leseraster
α-GFP	GFP Antikörper	USM DA CE	Oncostatin M
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor	PAGE	gelelektrophorese
gp130	Glykoprotein 130	рАКТ	phospho-AKT
Gvнн	GFP-nanobody	PBS	phosphate buffered saline
HER2	human epidermal growth factor	PCR	Polymerasekettenreaktion
	receptor 2	PD-1	programmed cell death
HF	high fidelity	סחס	protein 1
Hyper-IL-23	Hyper-Interleukin-23		protein database
Hyper-IL-6	Hyper-Interleukin-6	PDGF Don	Damiaillin
HRP	horseradish peroxidase	ren vEDV1/2	remembra EDK1/2
hygro	Hygromycin B	рекк1/2 DI2V	Phosphoinesitid 2 Vinese
iCAR	inhibitorischer CAR	PIJK	Phosphoinosiud-3-Kinase
ICD	intrazelluläre Domäne		serine/threonine-protein kinase
Ig	Immunglobulin	POD	Peroxidase
IL	Interleukin	pSTAT3	phospho-STAT3
IL-12Rβ1	Interleukin-12 Rezeptor beta 1	puro	Puromycin
IL-23R	Interleukin-23 Rezeptor	PVDF	Polyvinylidenfluorid
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor	rev	reverse
ILC	innate lymphoid cell	rGFP	rekombinantes GFP
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular	RNA	Ribonukleinsäure
	Biology	RORyt	retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t
IUPAC	and Applied Chemistry	RP	rev-Primer
JAK	Januskinase	r/r	refraktär/rezidiviert
Kan	Kanamycin	RSPO	R-Spondin-Liganden
kDa	Kilodalton	RT	Raumtemperatur
KL	Kaltlichtquelle	SAA1	Serumamyloid A1
LB	Luria-Bertani	SD	Standardabweichung
МАРК	mitogen-activated protein	SDS	sodium dodecyl sulfate
	kinases	SNP	single nucleotide polymorphism
МНС	major histocompatibility complex	SOCS	suppressor of cytokine signaling
α-myc	myc Antikörper	SP	Signalpeptid
mRNA	messenger RNA		

ssDNA	einzelsträngige DNA	TMD	transmembranäre Domäne
STAT	signal transducers and	TNF-α	Tumor Nekrose Faktor alpha
	activators of transcription	TNF-R	TNF-Rezeptor
Strep	Streptomycin	Tregs	regulatorische T-Zellen
SyCyR	synthetic cytokine receptor	ТҮК	Tvrosinkinasen
TBS	Tris buffered saline	UV	ultraviolett
T _H -Zelle	T-Helferzelle	унн	nanohody Finzeldomänen-
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3	, 1111	Antikörper

Inhaltsverzeichnis

1	Einlei	itung	1
1.1	Die B	iologie und Physiologie des Zytokins Interleukin-23	1
	1.1.1	Die IL-12-Zytokinfamilie	1
	1.1.2	Struktur, Signaltransduktion und Funktion von IL-23	2
1.2	Die B	edeutung von IL-23 in Krankheit und Therapie	4
	1.2.1	IL-23 spielt eine entscheidende Rolle in diversen Autoimmunerkrankungen	4
	1.2.2	Die ambivalente Rolle von IL-23 in Krebserkrankungen	5
1.3	Synth	etische Zytokinbiologie	6
	1.3.1	Nanobodies und fluoreszierende Proteine in der Biotechnologie	7
	1.3.2	Synthetische Rezeptoren in Forschung und Klinik	8
1.4	Ziele	der Arbeit	.11
2	Mater	rial und Methoden	. 13
2.1	Mater	ial	. 13
	2.1.1	Chemikalien, Kits, Geräte und Verbrauchsmaterialien	. 13
	2.1.2	Lösungen, Puffer und Medien	. 16
	2.1.3	Antibiotika	. 17
	2.1.4	Plasmide und Oligonukleotide	. 18
	2.1.5	Zelllinien und Bakterienstämme	. 19
	2.1.6	Zytokine und rekombinante Proteine	. 19
	2.1.7	Antikörper	. 20
2.2	Molek	cularbiologische Methoden	20
	2.2.1	Transformation von Bakterien	. 20
	2.2.2	Präparation der Plasmid-DNA und Bestimmung der DNA-Konzentration.	. 21
	2.2.3	Restriktive Spaltung der Plasmid-DNA	. 22
	2.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
	2.2.5	Ligation von Plasmid-DNA	. 24
	2.2.6	Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion	. 25
	2.2.7	DNA-Sequenzierung	. 25
2.3	Zellbi	ologische Methoden	
	2.3.1	Kultivierung von Zellen	
	2.3.2	Transfektion, retrovirale Transduktion und Selektion von Zellen	. 26
	2.3.3	Durchflusszytometrie	27
	2.3.4	Zellviabilitätsassay	
	2.3.5	Stimulationsassay	. 29
2.4	Protei	nbiochemische Methoden	. 29
	2.4.1	Herstellung von Zelllysaten und Bestimmung des Proteingehalts	. 29
	2.4.2	Western Blot	30

	2.4.3	Quantifizierung von fluoreszierenden Proteinen in Zellkulturüberständen	. 31
3	Ergeb	nisse	.33
3.1	Konstr	ruktion und Expression der SyCyRs	. 33
	3.1.1	Konstruktion des G _{VHH} -IL-12Rβ1	. 34
	3.1.2	Konstruktion des C _{VHH} -IL-23R	. 35
	3.1.3	Konstruktion von SyCyR(IL-23/2A)	. 36
	3.1.4	Subklonierung der SyCyR-cDNAs in pMOWS-Vektoren	. 38
	3.1.5	Retroviral transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen exprimieren SyCyRs auf ihrer Zelloberfläche	. 39
32	Konstr	uktion und Expression synthetischer Liganden	43
5.2	3.2.1	Konstruktion des monomeren GFP	. 43
	3.2.2	Stabil transfizierte CHO-K1-Zellen exprimieren GFP:mCherry- Fusionsproteine	. 44
33	Analys	se der II -23-SvCvR-Aktivität	47
5.5	3.3.1	GFP:mCherry-Fusionsproteine führen zur Proliferation der Ba/F3- SyCyR(IL-23)- und Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen	. 47
	3.3.2	SyCyR(IL-23) und SyCyR(IL-23/2A) aktivieren die JAK/STAT-, MAPK/ERK1/2- und PI3K/AKT-Signalwege	. 49
3.4	Analys	se der IL-23R-SyCyR-Homodimere	. 51
	3.4.1	Homodimere GFP-Fusionsproteine führen zur Proliferation von Ba/F3- SyCyR(IL-23R)-Zellen	. 52
	3.4.2	SyCyR(IL-23R)-Homodimerisierung aktiviert die JAK/STAT-, MAPK/ERK1/2- und PI3K/AKT-Signalwege	. 54
4	Disku	ssion	. 56
4.1	Svnthe	etische Zytokinrezeptoren sind biologisch aktiv	. 56
	4.1.1	SyCyRs phänokopieren spezifisch, hintergrundfrei und schaltbar die IL- 23 Signaltransduktion	. 56
	4.1.2	Aktivität von IL-6-SyCyRs in vivo	. 60
4.2	Die Ū Rezept	Übertragung des SyCyR-Systems auf unkonventionelle, multimere torkomplexe	. 61
	4.2.1	IL-23R-SyCyR-Homodimere induzieren eine IL-23-ähnliche Signaltransduktion	. 62
	4.2.2	SyCyRs weisen Transphosphorylierung von Zytokinrezeptoren nach	. 64
4.3	Neue Limitie	therapeutische Ansätze zur Optimierung der Immuntherapie und erungen der SyCyRs	. 65
4.4	Schlus	sfolgerungen	. 68
5	Litera	tur- und Quellenverzeichnis	. 70
6	Anhar	1g	. 86
6.1	Vektor	- ·karten	. 86

1 Einleitung

1.1 Die Biologie und Physiologie des Zytokins Interleukin-23

Zytokine sind autokrin, parakrin, juxtakrin und endokrin wirkende Proteine, die Zelldifferenzierung, wachstumsfördernde und immunmodulatorische Prozesse als Mediatoren der Zell-Zell-Kommunikation steuern. Sie werden sowohl von Zellen des Immunsystems als auch von primär nicht-immunkompetenten Zellen sezerniert (1). Physiologisch zirkulieren Zytokine in piko- bis nanomolaren Konzentrationen im Körper, wobei sich in pathologischen Situationen, wie z.B. der Sepsis, die Konzentration stark erhöhen kann (2). Zu den Zytokinen gehören unter anderem die Interleukine (IL), die durch Bindung an Zytokinrezeptoren eine Signaltransduktion mit konsekutiver Phosphorylierung von Signalproteinen und Genaktivierung in der Zelle auslösen. Aufgrund ihrer pleiotropen und redundanten Eigenschaften werden sie anhand ihrer Funktion und dreidimensionalen Proteinstruktur klassifiziert (3).

1.1.1 Die IL-12-Zytokinfamilie

Die IL-12-Zytokinfamilie zeichnet sich durch die heterodimere vorrangig Zusammensetzung ihrer Zytokinuntereinheiten und Rezeptorketten aus. Zu ihr werden IL-12, IL-23, IL-27, IL-35 und IL-39 gezählt, die allesamt aus jeweils einer α - (IL-12p35, IL-23p19, IL-27p28) und β- (IL-12/IL-23p40, Epstein-Barr virus induced gene 3 [EBI3]) Untereinheit bestehen (4, 5). Die Rezeptoren der IL-12-Familie umfassen den Interleukin-12 Rezeptor beta 1 (IL-12R\beta1), Interleukin-12 Rezeptor beta 2 (IL-12R\beta2), Interleukin-23 Rezeptor (IL-23R), WSX-1 und Glykoprotein 130 (gp130) (4). Sie gehören zu den Klasse-I-Zytokinrezeptoren (Hämatopoetin-Familie) und induzieren durch Dimerisierung Signaltransduktionen via Rezeptor-assoziierter Januskinasen (JAK) und signal transducers and activators of transcription- (STAT) Signalwege (4, 6). Die IL-12-Familie ist eng verwandt mit der IL-6-Familie, da zwischen den Zytokinen und Rezeptoren beider Familien strukturelle Homologien bestehen (7). Sie werden daher oft als IL-6/IL-12-Zytokinfamilie zusammengefasst (8).

Nichtsdestotrotz unterscheiden sich die Zytokine der IL-12-Familie in ihrer Funktion erheblich voneinander. IL-12 und IL-23 wirken überwiegend entzündungsfördernd, wobei IL-12 die Differenzierung von CD4⁺ T-Helfer (T_H-) Zellen vom Typ 1 vermittelt (9, 10), während IL-23 die Entwicklung der T_H17-Zellen begünstigt (11). IL-27 hat eine ausgeglichene Funktion, indem es sowohl T_H1-Zellen als auch regulatorische T-Zellen (T_{regs}) fördert (12, 13) und T_H17-Zellen antagonisiert (14). IL-35 hingegen wirkt in erster Linie entzündungshemmend, indem es T_{regs} induziert und zu ihrer suppressiven Funktion beiträgt (15, 16). Zu guter Letzt ist IL-39 das jüngste Mitglied der IL-12-Familie und scheint eine Rolle in der Entstehung des systemischen Lupus erythematodes und der Wundheilung zu spielen (5, 17).

1.1.2 Struktur, Signaltransduktion und Funktion von IL-23

IL-23 setzt sich aus den beiden Untereinheiten p19 und p40 zusammen, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (18). Dabei ist die Koexpression beider Untereinheiten notwendig, um das biologisch aktive IL-23 zu sezernieren (19). Demgegenüber wird der IL-23 Rezeptorkomplex von IL-12Rβ1 und IL-23R gebildet (20). Dabei vermittelt p40 die Bindung an IL-12Rβ1, während p19 mit dem IL-23R interagiert, sodass die Rezeptor-Heterodimerisierung ausschließlich durch die Bindung beider Liganden realisiert wird (19). Infolgedessen kommt es zur reziproken Phosphorylierung der mit den Rezeptoren konstitutiv assoziierten, aber nicht kovalent gebundenen Januskinasen, die konsekutiv Tyrosinreste innerhalb der zytoplasmatischen Signaldomänen der Rezeptoren phosphorylieren (21). Überraschenderweise ist die mit dem IL-12RB1 assoziierte Tyrosinkinase 2 (TYK2) für das IL-23 Signal entbehrlich, wohingegen die mit dem IL-23R assoziierte Januskinase 2 (JAK2) obligat ist (19, 22). Dies lässt eine biologische Aktivität von IL-23R-Homodimeren vermuten (23). Anschließend docken STAT-Signalproteine an die phosphorylierten Tyrosinreste des IL-23R an, um selbst phosphoryliert und somit aktiviert zu werden (24). Phosphorylierte STAT-Proteine dimerisieren und translozieren in den Zellkern, um als Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Sequenzen zu binden (25). Die IL-23 Signaltransduktion ist hierbei vorwiegend durch die Phosphorylierung von STAT3 und in geringem Maße von STAT1/4/5 gekennzeichnet (20). Anders als bei IL-6 inhibiert die Expression von suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) nicht das STAT3abhängige IL-23-Signal (24). Interessanterweise aktiviert IL-23 auch die mitogen-activated protein kinases (MAPKs) und Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die wiederum die extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) bzw. Proteinkinase B (AKT) phosphorylieren und somit aktivieren (24, 26). Die MAPK/ERK1/2- und PI3K/AKT-Signalwege zeigen sogar eine IL-23-induzierte STAT3-unabhängige Proliferation von Zellen (24). In einer weiteren Studie konnte zudem die IL-23-abhängige Aktivierung des

NF-κB-Signalwegs in CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (26). Eine ausführliche Beschreibung des IL-23 Rezeptorkomplexes ist in Abb. 1 dargestellt.



Abb. 1: Schematische Darstellung des IL-23 Rezeptorkomplexes. IL-23 setzt sich aus p19 und p40 zusammen, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind (18). Die Rezeptorketten IL-12R β 1 und IL-23R bestehen jeweils aus einer extrazellulären (ECD), transmembranären (TMD) und intrazellulären (ICD) Domäne. Die ECD des IL-23R schließt eine N-terminale Immunglobulin- (Ig) ähnliche, zwei zytokinbindende Fibronektin Typ III- (FNIII) Domänen und eine *stalk*-Region ein, über die sie mit der TMD verknüpft ist. Die ICD des IL-23R ist mit der Januskinase JAK2 assoziiert und weist sieben signalgebende Tyrosinreste (Y) auf, die teilweise als Andockstelle für unter anderem STAT3 dienen (20, 24). Die ECD des IL-12R β 1 schließt 5 FNIII-Domänen ein, von denen die ersten beiden für die Zytokinbindung verantwortlich sind und die letzte mit der TMD verknüpft ist. Die ICD des IL-12R β 1 ist über Box1/2-Motive (schwarze Markierungen) mit der Tyrosinkinase TYK2 assoziiert und weist nur im murinen IL-12R β 1 ein Tyrosinrest (Y) auf, welches jedoch keine signalgebende Funktion hat (22, 27, 28). Modifiziert nach Floss *et al.* 2013 und Floss *et al.* 2015 (24, 29).

Die physiologische Funktion von IL-23 beinhaltet unter anderem die antibakterielle und antimykotische Immunabwehr (30, 31). In vielerlei Hinsicht verkörpert IL-23 dabei die Verbindung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem. Antigenpräsentierende Zellen (APCs) sezernieren IL-23 als Reaktion auf pathogene Erreger (32). Seine Wirkung entfaltet IL-23 auf Typ-17-Immunzellen, die sich unter anderem durch die Expression des Transkriptionsfaktors retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t (RORyt), des IL-23R und die Sekretion des namensgebenden IL-17 auszeichnen (33). Erstaunlicherweise wird die Differenzierung von $\alpha\beta$ -T-Zellen zu T_H17-Zellen nicht von IL-23 selbst, sondern von IL-6 und indirekt von IL-21 induziert (34, 35). IL-23 hingegen ist ausschlaggebend für die Aufrechterhaltung eines pathogenen $T_{\rm H}17$ -Phänotyps (36), der zusätzlich über IL-22 und den Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) autoimmunentzündlich wirkt (37, 38). Eine weitere IL-17-produzierende Population sind $\gamma\delta$ -T-Zellen und *innate lymphoid cells* (ILCs), die von Natur aus den IL-12R β 1 und den IL-23R tragen und eine IL-23-abhängige Entzündungsreaktion in peripheren Geweben hervorrufen (39, 40). Die Mechanismen der IL-23-IL-17-Immunachse führten zu einem Paradigmenwechsel hinsichtlich des Verständnisses autoimmuner und maligner Pathologien (41).

1.2 Die Bedeutung von IL-23 in Krankheit und Therapie

Gerät das Immunsystem aufgrund des Überwiegens entweder entzündungsfördernder oder entzündungshemmender Reize in Imbalance, kommt es zur Dysregulation der Immunantwort. Überschießende Immunreaktionen können bei Chronifizierung in Autoimmunerkrankungen und Neoplasien münden, während insuffiziente Immunreaktionen die Immunevasion von Tumorzellen begünstigen können (42).

1.2.1 IL-23 spielt eine entscheidende Rolle in diversen Autoimmunerkrankungen

Der erste kausale Zusammenhang zwischen IL-23 und Autoimmunerkrankungen wurde in der experimentellen Autoimmunenzephalitis (EAE) nachgewiesen, dem murinen Krankheitsmodell für multiple Sklerose (MS), da in p40- und p19-defizienten Mäusen keine EAE induziert werden konnte (43). Bedauerlicherweise führte die Behandlung mit Ustekinumab, einem seit Januar 2009 zugelassenen IL-12/IL-23p40-neutralisierenden Antikörper, zu keinem signifikanten Benefit für MS-Patienten (44). Die Ursachen dafür könnten sein, dass der IL-23-induzierte Krankheitsprozess zum Diagnosezeitpunkt schon irreversibel voranschreitet oder der Antikörper wegen der Blut-Hirn-Schranke die IL-23produzierenden Zellen im zentralen Nervensystem nicht erreicht (45). Überraschenderweise konnten auch keine genetischen Polymorphismen im IL-23R mit einem erhöhten Risiko für MS in Verbindung gebracht werden (41). Genetische Polymorphismen sind Sequenzvarianten im menschlichen Genom, die meistens in Form eines einzelnen ausgetauschten Basenpaares (single nucleotide polymorphisms, SNPs) vorkommen (46). Genomweite Assoziationsstudien konnten allerdings SNPs des IL-23R in Patienten mit Rheumatoider Arthritis, Psoriasis und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) finden (29).

Den frühesten therapeutischen Erfolg erzielten p40-neutralisierende Antikörper in der Behandlung von Psoriasis, auch wenn beispielsweise Briakinumab aufgrund gehäuften

Auftretens kardiovaskulärer Ereignisse nicht zugelassen wurde (47, 48, 49). Auch in der Psoriasis trägt die IL-23/IL-17-Immunachse zur Pathogenese bei, da die intradermale Injektion von IL-23 eine Psoriasis-ähnliche Hautentzündung in Mäusen hervorrief und erhöhte p19/p40-mRNA-Expressionen in Psoriasis-Läsionen von Patienten detektiert wurden (50, 51). Umso wichtiger war die Entwicklung spezifischer IL-23p19-inhibierender Antikörper wie Guselkumab und Risankizumab, die in klinischen Studien zu Psoriasis, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa getestet wurden (52, 53).

Trotz der zweifellos entzündungsfördernden Komponente von IL-23 in CED häufen sich Hinweise auf eine differenzierte Funktion je nach Zelltyp (54). Einerseits schien die direkte Wirkung von IL-23 auf ILCs in Mäusen mit *dextran sulfate sodium* (DSS-) Colitis, dem murinen Krankheitsmodell für CED, zu einer STAT3- und IL-22-abhängigen intestinalen Rekonvaleszenz zu führen (55). Andererseits wurde erst kürzlich gezeigt, dass die IL-23-vermittelte IL-22-Produktion von Makrophagen in IL-10R-defizienten Mäusen eine Darmentzündung verursachte (56). Abschließend dürfen auch negative Effekte einer IL-23-Blockade, wie beispielsweise Infektionsanfälligkeit oder erhöhte Inzidenz maligner Erkrankungen, nicht unterschätzt werden (57).

1.2.2 Die ambivalente Rolle von IL-23 in Krebserkrankungen

Obwohl die Akkumulation proinflammatorischer Mediatoren unweigerlich mit Tumorentstehung, -wachstum und Metastasierung verbunden ist (58), weisen einige Zytokine wie beispielsweise IL-12 eine Antitumoraktivität auf (59). Ungeachtet der genauen Mechanismen von IL-23 in der Karzinogenese wurde eine erhöhte IL-23-Expression in Geweben humaner Karzinome gefunden, die in den meisten malignen Entitäten mit einer schlechten Prognose assoziiert war (60). Lediglich bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom korrelierte eine erhöhte IL-23-Expression positiv mit dem Gesamtüberleben, wobei hier auch die p35-mRNA-Expression erhöht war (61).

Viele Studien stützen die Ansicht einer IL-23-induzierten Tumorprogression. IL-23 induzierte in murinen Krankheitsmodellen des kolorektalen Karzinoms die Tumorprogression (62) und eine rapide *de novo* Entstehung von intestinalen Adenomen (63). Außerdem waren IL-23p19-defiziente Mäuse vor chemisch-induzierten Hauttumoren und Fibrosarkomen geschützt (64, 65). Ursächlich für die tumorsupprimierende Wirkung bei Abwesenheit von IL-23 waren hierbei unter anderem zytotoxische CD8⁺ T-Zellen, die vermehrt das Tumormikromilieu infiltrierten (64), und natürliche Killer (NK-) Zellen, die antimetastatisch wirkten (65). Passend dazu belegte eine neulich veröffentlichte Studie eine

Tumorzellimmunevasion IL-23-vermittelte in Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom, von denen jene mit höherer IL-23-Expression eine geringere Überlebensrate hatten (66). Speziell in der Metastasierung scheint IL-23 eine große Rolle zu spielen, da IL-23 in humanen Ösophaguskarzinomen die epithelial-mesenchymale Transition über wahrscheinlich STAT3-abhängiger Angiogenese ermöglichte (67, 68). Zudem konnte mittels prophylaktischer Gabe eines IL-23-inhibierenden Antikörpers die Ausbildung von Lungenmetastasen in Mäusen verhindert werden (69). Des Weiteren wurde in mit Gemcitabin vorbehandelten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) eine erhöhte IL-23-Expression detektiert (70), während die Kombination eines IL-12agonistischen CD40 Antikörpers mit einem IL-23 Antikörper zur Suppression von Tumorwachstum und Metastasierung führte (71). Demnach könnte die Blockade von IL-23 in Zukunft eine Optimierung der Chemo- und Immuntherapie von Krebserkrankungen darstellen.

Allerdings existieren einige Studien, die eine Antitumoraktivität von IL-23 propagieren. In verschiedenen Tumorzelllinien wurde ein geringeres Tumorwachstum infolge erhöhter IL-23-Expression beobachtet (72, 73, 74). Überdies wurde erst kürzlich gezeigt, dass die intratumorale Applikation von IL-23-mRNA eine immunvermittelte Antitumoraktivität bewirkte, wobei simultan noch die mRNA eines weiteren Zytokins und des T-Zell-kostimulatorischen Faktors OX40L appliziert wurden (75). Diese mRNA-Mixtur wird derzeit in einer klinischen Phase I Studie evaluiert (NCT03739931). Eine Erklärung für die ambivalente Rolle von IL-23 in Krebserkrankungen könnte sein, dass IL-23 dosisabhängig unterschiedliche Wirkungen entfaltet. In humanen, IL-23R-exprimierenden Lungenkarzinom-Zellen wurde das Tumorwachstum durch eine geringe Dosis von IL-23 induziert, durch eine hohe Dosis von IL-23 jedoch reduziert (76).

Die beachtliche Evidenz, dass IL-23 den verheerenden Prozess autoimmuner und maligner Pathologien beeinflusst, macht die weitere Erforschung seiner Struktur und Signalwege unverzichtbar.

1.3 Synthetische Zytokinbiologie

Die synthetische Biologie befasst sich mit der De- und Rekonstruktion biologischer Systeme, um Biosensoren, molekulare Schalter und medizinische Applikationen zu verbessern (77). Neben bewährten biologischen Werkzeugen wie den *nanobodies* oder fluoreszierenden Proteinen eröffnen derweil auch Zytokine und Zytokinrezeptoren der Biotechnologie neue Perspektiven (78).

1.3.1 *Nanobodies* und fluoreszierende Proteine in der Biotechnologie

Im Gegensatz zur konventionellen Struktur von Antikörpern, die in Menschen vorkommen und aus zwei schweren und zwei leichten Ketten bestehen, besitzen Kamele und Knorpelfische zusätzlich Antikörper, die nur schwere Ketten enthalten (79, 80). Eine einzelne variable Domäne solcher Schwere-Ketten-Antikörper bezeichnet man als Einzeldomänen-Antikörper, nanobody oder VHH (Kamele) bzw. VNAR (Knorpelfische) (Abb. 2) (81). Nanobodies besitzen eine lange antigenbindende complementarity determining region 3 (CDR3), wodurch sie in der Lage sind, selbst Enzyme in ihrem katalytischen Zentrum zu binden (82). Dank ihrer hohen Löslichkeit und geringen Molekülmasse von ~ 15 kDa weisen sie eine hohe Gewebepenetration, hohe Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau und eine kurze Plasmahalbwertszeit infolge renaler Ausscheidung auf (83). Daher werden sie auch für die Klinik immer relevanter. Ein Beispiel hierfür sind nanobodies gegen human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), die die Diagnostik und Therapie von Brustkrebs verbessern sollen (84, 85, 86). Der bivalente von-Willebrand-Faktor-bindende nanobody Caplacizumab wurde bereits im Februar 2019 von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung der thrombotischthrombozytopenischen Purpura zugelassen (87).

Fluoreszierende Proteine sind heutzutage ebenso unentbehrliche Biosensoren, mit denen die örtliche und zeitliche Distribution von Proteinen und Genen verfolgt werden kann (88). Das green fluorescent protein (GFP) ist ein grün fluoreszierendes Protein, welches aus der Qualle Aequorea victoria extrahiert wurde (89). Durch den Austausch bestimmter Aminosäuren in der Proteinsequenz sind mittlerweile verschiedene GFP-Derivate erzeugt worden. Das enhanced GFP und homotrimere GFP-Fusionsproteine (3xGFP) sollen deutlich stärker als das herkömmliche GFP fluoreszieren (90, 91), während der Austausch eines Alanins gegen Lysin an Position 206 (A206K) die spontane Di- oder Oligomerisierung von GFP verhindert (92). In dieser Arbeit wurde die A206K-Variante vom enhanced GFP verwendet, die zur Vereinfachung im Weiteren als GFP bezeichnet wird. Zahlreiche weitere fluoreszierende Proteine sind inzwischen entdeckt worden, darunter das rot fluoreszierende Protein mCherry, welches ebenfalls als Monomer vorliegt (93). Mittlerweile existieren auch nanobodies, die spezifisch die fluoreszierenden Proteine GFP und mCherry binden (94, 95) (Abb. 2). Speziell GFP-nanobodies werden in der Biotechnologie zur Lokalisation von Proteinakkumulation und -interaktionen in lebenden Zellen zunehmend eingesetzt (96, 97).



Abb. 2: Aufbau des Schwere-Ketten-Antikörpers des Kamels (A) und die Proteinkristallstruktur der GFP-nanobody: GFP-Interaktion (B). A Einzeldomänen-Antikörper (nanobody) bestehen aus einer einzigen variablen Domäne (VHH) und können aus Schwere-Ketten-Antikörper von Kamelen isoliert werden (Fab: fragment antigen binding, Fc: fragment crystallizable, CH2/3 = constant domains of heavy chain). Modifiziert nach Hamers-Casterman et al. 1993 (79). B Der GFP-nanobody (blau) ist gegen GFP (grün) gerichtet und interagiert über seine lange CDR3-Region mit Seitenketten von GFP (rot). Die Proteinkristallstrukturen stammen von der Protein Database PDB (3K1K) und wurden selbstständig mit der Molekül-Visualisierungssoftware PyMOL (Version 2.0, Schrödinger, LLC) bearbeitet. Modifiziert nach Rothbauer et al. 2008 und Kubala et al. 2010 (94, 98).

1.3.2 Synthetische Rezeptoren in Forschung und Klinik

In der Natur vorkommende Zytokinrezeptoren befinden sich nicht immer in ein- und derselben starren Konfiguration, sondern unterliegen ständigen Veränderungen. Prinzipiell können als Antwort auf extrinsische und intrinsische Einflüsse Zytokinrezeptoren vermehrt oder vermindert auf der Zelloberfläche exprimiert, an- oder ausgeschaltet, variabel kombiniert und strukturell modifiziert werden, sodass sich der Zellzustand fortlaufend ändert (3). Die synthetische Biologie macht sich diese in der Natur vorkommenden Phänomene zunutze, indem durch gezielte Modifikationen konstitutiv-aktive Zytokinrezeptoren entstehen, neue Rezeptorkombinationen entdeckt und Zytokin-Signalwege phänokopiert werden (78, 86).

Konstitutiv-aktive Zytokinrezeptoren werden sowohl in der Natur als auch in der synthetischen Biologie vielfach beschrieben (86). Eine Vielzahl von aktivierenden Mutationen im *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und HER2 wurden in NSCLC bzw. Mammakarzinomen entdeckt (99), sodass synthetisch hergestellte konstitutiv-aktive Zytokinrezeptoren in Tumormodellen zur Entwicklung neuer Therapeutika dienen könnten (100, 101). In der Natur vorkommende Mutationen von Rezeptoren der IL-12-Familie, die zur konstitutiven Aktivität führen, sind bisher noch nicht beschrieben worden (86). Allerdings konnte mittels modifizierter Zytokinrezeptoren eine spontane Homodimerisierung des IL-23R ausgelöst werden, indem die membranproximale stalk-Region vom IL-23R entfernt wurde (23). Der offensichtliche Nachteil konstitutiv-aktiver synthetischer Zytokinrezeptoren ist ihre fehlende Steuerbarkeit, da sie nicht schaltbar sind. Eine interessante Strategie zur Generierung schaltbarer Zytokinrezeptoren ist die Fusion von elastin-like polypeptides (ELPs) an den C-Terminus des EGFR (102). Die chimären EGFR:ELPs-Fusionsproteine können temperaturabhängig in einen Aktivitätszustand versetzt werden, in dem EGFR durch Homooligomerisierung phosphoryliert werden, und durch Abkühlung wieder ausgeschaltet werden (102, 103). Aufgrund der nicht kontrollierbaren Rezeptoroligomerisierung erlauben die ELPs-basierten Fusionsproteine trotz ihrer Schaltbarkeit jedoch leider keine Aussage über die Rezeptorstöchiometrie. Floss und Mitarbeiter entwickelten chimäre Rezeptorvarianten durch den Austausch extra- und intrazellulärer Domänen von Zytokinrezeptoren der IL-6/IL-12-Zytokinfamilie, die durch die physiologischen Zytokine IL-12 oder IL-23 aktiviert werden konnten (6). Die Signaltransduktionen der Zytokine IL-35, IL-39 und des synthetischen Zytokins IL-Y wurden auf diese Weise phänokopiert (6). Interessanterweise konnte mit dieser Methode eine neue, biologisch aktive Rezeptorkombination identifiziert werden, die durch das möglicherweise noch unentdeckte Zytokin IL-Z1 ein Signal übermittelt (Abb. 3).

Darüber hinaus wurden aktivierbare synthetische Zytokinrezeptoren beschrieben, die auf der Fusion der ligandenbindenden Domäne des Erythropoetin- (EPO) Rezeptors (EpoR) mit der zytoplasmatischen Domäne von gp130 basieren (EpoR-gp130) (104, 105). Die Stimulation mit EPO induzierte die EpoR-gp130-Homodimeriserung und phänokopierte somit die gp130-Signaltransduktion (Abb. 3). Das wesentliche Problem dieses Systems ist die Kreuzreaktivität von physiologischen Liganden mit ihren natürlich vorkommenden Rezeptoren. Wird Patienten EPO appliziert, führt dies häufig zur arteriellen Hypertonie und zu thromboembolischen Ereignissen (106). Zudem scheitert dieses System an der Zusammenstellung höhergeordneter Multi-Rezeptorkomplexe, da mit EPO maximal eine Homodimerisierung induziert werden kann (104, 105). Eine andere Arbeitsgruppe entwickelte einen synthetischen T-Zell-Rezeptor, dessen zytoplasmatische Domäne mit dem FK506 binding protein 12 (FKBP12) fusioniert wurde (107). Die Zugabe des zellpermeablen Tacrolimus (FK506) aktivierte via Homodimerisierung und Homooligomerisierung eine direkte intrazelluläre Signaltransduktion (107). Hierbei wurde Tacrolimus verändert, um seine immunsuppressive Wirkung aufzuheben und die Kreuzreaktivität zu minimieren. Allerdings ist bei diesem System das Ausmaß der Oligomerisierung nicht bestimmbar, sodass hier ebenso keine vollständige Kontrolle über die Rezeptorzusammensetzung vorliegt. Diese Nachteile machen den Einsatz der in diesem Abschnitt beschriebenen synthetischen Zytokinrezeptorvarianten *in vitro* und *in vivo* weitestgehend impraktikabel.



Abb. 3: Phänokopie von Zytokin-Signaltransduktionen durch chimäre Zytokinrezeptor-Varianten: IL-12R β 1_{ECD}-IL-23R_{ICD}:IL-12R β 2-Heterodimere (A) und EpoR-gp130-Homodimere (B). A Floss und Mitarbeiter fusionierten die ligandenbindende, extrazelluläre Domäne des IL-12R β 1 (IL-12R β 1_{ECD}) an die intrazelluläre Domäne des IL-23R (IL-23R_{ICD}), während der IL-12R β 2 unverändert blieb. Die Stimulation mit IL-12 induzierte via IL-12R β 1_{ECD}-IL-23R_{ICD}:IL-12R β 2-Heterodimerisierung eine Signaltransduktion, die möglicherweise von dem noch unentdeckten Zytokin IL-Z1 ausgelöst wird. Modifiziert nach Floss *et al.* 2017 (6). **B** Hemmann und Mitarbeiter fusionierten die ligandenbindende Domäne des EpoR (EpoR_{ECD}) an die zytoplasmatische Domäne von gp130 (gp130_{ICD}). Die Stimulation mit EPO induzierte via EpoR-gp130-Homodimerisierung die gp130-Signaltransduktion. Modifiziert nach Hemmann *et al.* 1996 (104). Beide hier dargestellten chimären Zytokinrezeptor-Varianten haben den Nachteil der Kreuzreaktivität, da sie physiologische Liganden wie IL-12 und EPO zur Phänokopie von Signaltransduktionen nutzen. Zudem ist das Ausmaß der Rezeptorkombinationen auf Hetero- bzw. Homodimerisierung limitiert.

Die Immuntherapie mit *chimeric antigen receptor* (CAR-) T-Zellen verkörpert die erste Verbindung zwischen Klinik, Gentechnologie und synthetischen Rezeptoren zur Bekämpfung von Krebserkrankungen (108). Bei der CAR-T-Zell-Therapie werden patienteneigene T-Zellen *ex vivo* mittels retroviralem Gentransfer mit einem CAR ausgerüstet und vervielfältigt (109). CARs bestehen aus einem extrazellulären *single chain variable fragment* (scFv) eines monoklonalen Antikörpers zur Bindung eines spezifischen Oberflächenantigens der Tumorzelle, einer flexiblen Gelenkregion, einer verknüpfenden transmembranären Domäne und einer intrazellulären T-Zell-Rezeptor-(TCR) Signaldomäne, welche meist CD3 ζ und kostimulatorische Moleküle wie CD28 und 4-1BB enthält (110). Nach lymphodepletierender Konditionierung mit Fludarabin oder Cyclophosphamid werden dem Patienten die CAR-T-Zellen im Sinne eines adoptiven T-Zell-Transfers reinfundiert (111). Daraufhin zerstören die CAR-T-Zellen den Tumor MHCunabhängig mittels Exozytose von Perforin, Granzymen und teilweise via Fas-Ligand (FasL):Fas-Rezeptor (FasR) und Tumor Nekrose Faktor (TNF):TNF-Rezeptor (TNF-R) (112). Dank ihrer Persistenz und durch *in vivo* Expansion sollen CAR-T-Zellen für eine langfristige Remission sorgen (113).

Die CAR-T-Zell-Therapie erreichte bislang erstaunliche Remissionen in fortgeschrittenen hämatologischen Malignomen (114). Die gegen CD19 gerichteten CAR-T-Zell-Therapien Tisagenlecleucel und Axicabtagen Ciloleucel sind seit 2017 für die refraktäre/rezidivierte (r/r) akute lymphoblastische B-Zell-Leukämie (B-ALL) und das r/r diffus-großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) zugelassen (115, 116, 117). Derzeit werden CAR-T-Zellen noch im multiplen Myelom, lokal im Glioblastom und in weiteren soliden Tumoren getestet (118, 119, 120). Nichtsdestotrotz kommt es auch bei der CAR-T-Zell-Therapie zu Turmorresistenzen und zu Nebenwirkungen wie Myelosuppression, neurologische Störungen oder dem *cytokine release syndrome* mit intensivpflichtigen und teilweise letal endenden Verläufen (121, 122).

1.4 Ziele der Arbeit

Synthetische Rezeptoren nehmen einen immer höheren Stellenwert in der Wissenschaft und klinischen Therapie ein. Trotz der dargelegten Fortschritte in der synthetischen Zytokin-Biologie haben viele synthetische Zytokinrezeptoren den Nachteil der Kreuzreaktivität und geringen Steuerbarkeit von Rezeptoraktivierung und -kombination. Die Entwicklung eines hintergrundfreien und schaltbaren synthetischen Zytokinrezeptorsystems mit vollständiger Kontrolle über die Zusammensetzung von beispielsweise hetero/homodimeren, -trimeren oder -multimeren Rezeptorkomplexen ist bisher noch nicht beschrieben worden. Solch ein spezifisches System wäre ein wertvolles Hilfsmittel, um die Aktivierung, Kinetik, Stöchiometrie und biochemischen Eigenschaften von Rezeptoren zu analysieren. Darüber hinaus würde die hintergrundfreie Aktivierung von synthetischen Zytokinrezeptoren mittels nicht-physiologischer Liganden ein großes Potential zur Optimierung der Immuntherapie bieten. Mit diesem Ziel sollten neuartige synthetische Zytokinrezeptoren (Synthetic Cytokine Receptors, SyCyRs) entwickelt werden, die auf nicht-physiologischen nanobodies und fluoreszierenden Proteinen basieren. Nanobodies, die spezifisch GFP und mCherry binden, sollten die ligandenbindenden, extrazellulären Domänen von Zytokinrezeptoren ersetzen, dass die Bindung von homo- und heteromeren GFP:mCherry-Fusionsproteinen eine

Rezeptordi- und -multimerisierung initialisieren kann. Aufgrund der unveränderten intrazellulären Signaldomänen könnte so die Signaltransduktion von Zytokinen artifiziell phänokopiert werden. Angesichts der zunehmend größer werdenden Bedeutung, die IL-23 in der Entstehung und Therapie von Autoimmun- und Krebserkrankungen zugeschrieben wird, soll der IL-23 Rezeptorkomplex als Modell für diese Arbeit dienen. Zu diesem Zweck sollen GFP- und mCherry-bindende nanobodies an IL-12RB1 bzw. IL-23R fusioniert werden, um mittels GFP:mCherry-induzierter Rezeptor-Heterodimerisierung die IL-23 Signaltransduktion spezifisch und hintergrundfrei zu phänokopieren. Eine weitere Fragestellung betrachtet die Übertragbarkeit des neuartigen synthetischen Zytokinrezeptor-Systems auf andere, unkonventionelle Rezeptorkombinationen. Dahingehend sollen IL-23R-Homodimere mittels SyCyRs hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität und einer möglicherweise IL-23-ähnlichen Signaltransduktion untersucht werden. Mit Hilfe der SyCyRs wäre man somit in der Lage, die biologische Aktivität multimerer Rezeptorkomplexe zu untersuchen, die zelltypspezifische Aktivierung in transgenen Mäusen zu analysieren und möglicherweise die Immuntherapie bei Krebserkrankungen zu verbessern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Kits, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (Tabelle 1), Kits (Tabelle 2), Geräte (Tabelle 3) und Verbrauchsmaterialien (Tabelle 4) aufgelistet.

Chemikalie	Hersteller	
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
cOmplete [™] , EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland	
6x DNA Loading Dye Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
dNTP Mix (25 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
Ethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
GeneRuler [™] Express DNA <i>Ladder</i> 100-5000 bp	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
GeneRuler [™] 1 kb DNA <i>Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
GIBCO [®] Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high-glucose culture medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
GIBCO® Fötales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
Immobilon [™] Western HRP Substrat	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland	
Isopropanol (2-Propanol)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	
Kaliumacetat	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland	
Kaliumchlorid (KCl)	VWR International, Radnor, PA, USA	
Kaliumdihydrogenphosphat (KH2PO4)	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland	
LB-Medium	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
LE Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland	
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
Methanol	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland	

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Tergitol TM -type NP-40 Detergens	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Orange G	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PageRuler [™] Prestained Protein Ladder 10-180 kDa	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Polybrene	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
T4-DNA-Ligase mit 10x Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton [™] X-100	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypan Blue Dye 0,4%	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
TurboFect TM Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tween [®] 20 (Polysorbat 20)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Tabelle 2: Kits

Kit	Hersteller
BCA Protein Assay	Pierce [™] , Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega, Mannheim, Deutschland
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin [®] Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Hersteller
BD FACSCanto II Durchflusszytometer	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
ChemoCam Imager	INTAS Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland
CO ₂ -Inkubator 150 (E2) Brutschrank	BINDER, Tuttlingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	KEYENCE, Neu-Isenburg, Deutschland
Forma™ Ultratiefkühlschränke 900	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gel iX Imager	INTAS Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland
Infinite [®] 200 PRO plate reader	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Rostock, Deutschland
Lichtmikroskop mit KL 1500 LCD	Leica, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer mit Heizfunktion	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Messpipetten	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Mikropipetten Research [®] plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Gerät	Hersteller
Mini-PROTEAN [®] Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini-Sub® Cell GT Horizontal Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Minizentrifuge	Axon Labortechnik, Kaiserslautern, Deutschland
Multitron [®] Inkubationsschüttler	Infors HT, Bottmingen, Deutschland
NanoDrop [®] ND-1000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
peqSTAR 2x Thermocycler	PEQLAB, VWR International, Radnor, PA, USA
pH-Meter	Sartorius, Ratingen, Deutschland
pipetus® akku-betriebene Pipettierhelfer	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
PowerPac TM Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Präzisionswaage 100M-300C	Precisa Gravimetrics, Aldingen, Deutschland
Stuart [®] Rollenmischer SRT9	Cole-Parmer, Staffordshire, UK
ScanLaf Sicherheitswerkbank Mars	LaboGene, Lillerød, Dänemark
TC10 TM Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Thermomixer [®] comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot [®] Turbo [™] Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies, Krefeld, Deutschland
Vortex Schüttler	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad sw21	Julabo, Seelbach, Deutschland
Zentrifugen 5417 R und 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
CELLSTAR [®] Polypropylen Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
CELLSTAR® Zellkulturschalen 58 cm ²	Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
CytoOne® Zellkulturplatten 6-, 96-well	STARLAB International, Hamburg, Deutschland
Kryoröhrchen	VWR International, Radnor, PA, USA
MICRO-TOUCH [®] sterile Nitril-Handschuhe	Ansell, Brüssel, Belgien
PCR-Gefäße 0,2 ml und -Kappen	STARLAB International, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Roti [®] PVDF-Membranen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TipOne [®] Pipettenspitzen	STARLAB International, Hamburg, Deutschland
Whatman [®] Filter-Papier	VWR International, Radnor, PA, USA
Zellkulturflaschen 75 cm ² , 150 cm ² (adhärent)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten 6-, 12-, 24-, 96-well (adhärent)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen 60,1 cm ² , 147,8 cm ² (adhärent)	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Lösungen, Puffer und Medien aufgelistet. Alle Lösungen und Puffer wurden, falls nicht anders angegeben, in destilliertem Wasser (H_2O_{dd}) angesetzt und bei Bedarf autoklaviert ($120^{\circ}C$, 2 bar, 20 min). Die Medien wurden zur Kultivierung prokaryotischer und eukaryotischer Zellen verwendet.

Lösung/Puffer/Medium	Zusammensetzung
APS-Lösung	10% APS
Blockierlösung	5% Magermilchpulver in TBS-T
BSA-Lösung	5% BSA in TBS-T
DMEM ^{-/-}	DMEM ohne Zusatz
DMEM ^{+/+}	DMEM 10% FCS jeweils 1% Pen/Strep
DNA-Ladepuffer (6x)	30% Glycerin 50 mM EDTA 0,25% Orange G
FACS-Puffer	1% BSA in PBS
Lämmli-Puffer (5x)	0,4 M Tris-HCl pH 6,8 40% Glycerin 8% SDS 65 mM β-Mercaptoethanol 4,2 ml H ₂ O 0,02% Bromphenolblau
phosphate buffered saline (PBS)	1,5 M KH ₂ PO ₄ 2,7 M KCl 8,1 M Na ₂ HPO ₄ 137 mM NaCl pH 7,4
phospho-STAT3-Lyse-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1% NP-40 1% Triton [™] X-100 1x cOmplete [™] -Tablette (auf 50 ml) 1 mM NaF 1 mM Na ₃ VO ₄
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% SDS
SDS-PAGE Lauf-Puffer	0,4 M Tris-HCl pH 8,25 0,1 M Glycin 0,1% SDS

Tabelle 5: Lösungen, Puffer und Medien

Lösung/Puffer/Medium	Zusammensetzung
solution 1 (S1-Puffer)	1 M Tris-HCl
	0,5 M EDTA
	4 M NaOH
	10% SDS
	1:1000 RNase A
solution 2 (S2-Puffer)	4 M NaOH
	10% SDS
solution 3 (S3-Puffer)	3 M Kaliumacetat
	11,5% Essigsäure (99,9%)
stripping-Puffer	62,5 M 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
tris buffered saline (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
Trypsin-EDTA-Lösung	1:10 Trypsin-EDTA (1x) in PBS

2.1.3 Antibiotika

In Tabelle 6 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika aufgelistet.

Antibiotikum	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml	Agarplatten: 200 µg/ml Flüssigmedium: 100 µg/ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Geneticin (G418)	50 mg/ml	1,125 mg/ml	Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland
Hygromycin B (hygro)	100 mg/ml	2 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml	50 µg/ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin G (Pen)	10000 U/ml	60 mg/l	Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland
Puromycin (puro)	1 mg/ml	1,5 μg/ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Antibiotikum	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration	Hersteller	
Streptomycin (Strep)	10 mg/ml	100 mg/l	Genaxxon Ulm, Deutse	Bioscience, chland

2.1.4 Plasmide und Oligonukleotide

Im Folgenden sind die verwendeten Plasmide (Tabelle 7) und Oligonukleotide (Tabelle 8) aufgelistet. Die Oligonukleotide (Primer) stammten von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland).

Plasmid	Resistenz	Herkunft
p409	Amp	(123)
p409-mIL-12Rβ1	Amp	(24)
pcDNA3.1	Amp, Neomycin (Neo)	Invitrogen [®] , Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pcDNA3.1-GvHH-IL-23R	Amp, Neo	(94, 124)
pcDNA3.1-C _{VHH} -IL-23R-TM	Amp, Neo	(95, 125)
pcDNA3.1-GFP-mCherry	Amp, Neo	(124)
pcDNA3.1-2xGFP-mCherry	Amp, Neo	(124)
pcDNA3.1-3xGFP	Amp, Neo	(124)
pcDNA3.1-mCherry	Amp, Neo	(124)
pCR-Script	Amp	AG Scheller
pmEGFP-13	Amp	Addgene, Watertown, MA, USA (91)
pMK-hIL-15-WSX-1/sushi-gp130 (pMK-Fusio)	Kan	(126)
pMOWS-hygro	Amp, hygro	(126)
pMOWS-puro	Amp, puro	(127)

Tabelle 7: Plasmide

Tabelle 8: Oligonukleotide

Oligonukleotid	$5' \rightarrow 3'$ Sequenz	Verwendung
IL-12Rβ1-EcoRI-FP	TCTGAATTCGCCTGGAGTCATCCC CAGCGCTTTAGCT	forward- (fwd) Primer für IL-12Rβ1
IL-12Rβ1-NotI-RP	CGAGCGGCCGCTCAGGCCTCTTGC CCCAAAGTG	<i>reverse-</i> (rev) Primer für IL-12R β 1
C _{VHH} -IL-23R-XbaI-FP	GACTCTAGAGCCACCATGAGCAGC AGCTGCTCAGGGC	fwd-Primer für C_{VHH} -IL-23R
C _{VHH} -IL-23R-HindIII-RP	GACAAGCTTCTTTTGGAAGAGTGA AATTCTACTGAAATGGC	rev-Primer für C _{VHH} -IL-23R
G_{VHH} -IL-12R β 1-NheI-FP	GACGCTAGCATGAGCAGCAGCTGC TCAGGGCTG	fwd-Primer für G_{VHH} -IL-12R β 1
Gvhh-IL-12R _β 1-XhoI-RP	GACCTCGAGTCATCAGGCCTCTTG CCCCAAAGTGGGCGGT	rev-Primer für G_{VHH} -IL-12R β 1

Oligonukleotid	$5' \rightarrow 3'$ Sequenz	Verwendung
GFP-BamHI-FP	CAGGGATCCTCACCGGTCGCCACC ATGGTGAG	fwd-Primer für GFP
GFP-NotI-RP	CGAGCGGCCGCCTACTTGTACAGC TCGTCCATGCCG	rev-Primer für GFP

2.1.5 Zelllinien und Bakterienstämme

In Tabelle 9 sind die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und Bakterienstämme aufgelistet. Die adhärenten Zellen (CHO-K1 und Phoenix-Eco) wurden unter DMEM^{+/+}, die Suspensionszellen (Ba/F3-gp130-Zelllinien) unter DMEM^{+/+} mit zusätzlichem Hyper-Interleukin-6 (Hyper-IL-6) kultiviert. Für die Klonierung und Amplifikation der Plasmid-DNA wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E.coli*) XL1-Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F['] proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]) in dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 9: Zelllinien und Bakterienstämme

Zelllinie/Bakterienstamm	Ursprung, Merkmal
Ba/F3-gp130	murine IL-3-abhängige Pro-B-Zelllinie (Immunex, Seattle, WA, USA) (128), Suspensionszellen mit Oberflächenexpression von gp130
Ba/F3-mIL-12R β 1-mIL-23	murine IL-3-abhängige Pro-B-Zelllinie (24), Suspensionszellen mit Oberflächenexpression von gp130 und murinen IL-12R β 1 und IL-23R
Ba/F3-SyCyR(IL-23R)	murine IL-3-abhängige Pro-B-Zelllinie (124), Suspensionszellen mit Oberflächenexpression von gp130 und SyCyR(IL-23R) (vgl. Abschnitt 3.4)
CHO-K1 (ACC-110)	Ovarienzellen des chinesischen Zwerghamsters (Leibniz-Institut DSMZ, Braunschweig, Deutschland) (129, 130), immortalisierte adhärente Zellen
Phoenix-Eco	humane embryonale Nierenzellen (127) (Ursula Klingmüller, DKFZ, Heidelberg, Deutschland), Retroviren-produzierende adhärente Zellen

2.1.6 Zytokine und rekombinante Proteine

In Tabelle 10 sind die verwendeten Zytokine und rekombinanten Proteine aufgelistet.

Zytokin/rekombinantes Protein	Stammkonzentration	Konzentration im Zellkulturmedium
konditionierter Zellkulturüberstand einer CHO-K1-Zelllinie mit Hyper-IL-6- Sekretion	ca. 5 µg/ml	0,2% bzw. 10 ng/ml, Bestimmung mittels ELISA (124)
konditionierter Zellkulturüberstand einer CHO-K1-Zelllinie mit Hyper-IL-23- Sekretion	ca. 5 µg/ml	0,2% bzw. 10 ng/ml, Bestimmung mittels ELISA (124)
rekombinantes Hyper-IL-6	100 µg/ml	10 ng/ml
rekombinantes GFP (rGFP)	5 mg/ml	-

Tabelle 10: Zytokine und rekombinante Proteine

2.1.7 Antikörper

In Tabelle 11 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper (AK) aufgelistet. Wenn keine Stammkonzentration angegeben ist, hat der Hersteller keine Angabe zur Stammkonzentration des erworbenen Antikörpers gemacht.

Antikörper, Ursprung	Arbeitskonzentration	Hersteller
Alexa Fluor 488 konjugierter Kaninchen AK, Ziege (#A11070)	1:100 in 100 µl FACS-Puffer (Stammkonzentration: 2 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
α-Flag (DYKDDDDK), Kaninchen (#F7425)	1:1000 in 1% BSA in TBS-T 1:100 in 100 μl FACS-Puffer (Stammkonzentration: ~0,8 mg/ml)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
α-GFP, Maus (#11814460001)	1:1000 in 5% Milch in TBS-T (Stammkonzentration: 0,4 mg/ml)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
α-myc (71D10), Kaninchen (#2278)	1:1000 in 5% BSA in TBS-T 1:100 in 100 μl FACS-Puffer (1,2 μg)	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP [®] AK, Kaninchen (#9145)	1:1000 in 5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
STAT3 (124H6) AK, Maus (#9139)	1:1000 in 5% Milch in TBS-T	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP [®] AK, Kaninchen (#4370)	1:1000 in 5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
p44/42 MAPK (ERK1/2) AK, Kaninchen (#9102)	1:1000 in 5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
phospho-AKT (Ser473) (D9E) XP® AK, Kaninchen (#4060)	1:1000 in 5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
AKT AK, Kaninchen (#9272)	1:1000 in 5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
POD-konjugierte Maus AK, Kaninchen (#31451) und Kaninchen AK, Ziege (#31462)	1:2500 in 5% Milch in TBS-T	Pierce [™] , Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation von Bakterien

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurde die Transformation von Bakterien durchgeführt. Dazu mussten chemisch-kompetente *E.coli* generiert werden, die bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,6 angezogen wurden. In Gegenwart hoher Ca²⁺-Konzentration und bei gleichzeitigem Temperaturanstieg auf 42°C sind Prokaryoten in der Lage, DNA aufzunehmen und in ihr Genom zu integrieren. Der Temperaturanstieg erhöht

die Durchlässigkeit der Bakterienmembran zur DNA-Aufnahme, während das Ca²⁺ die Abstoßung von Bakterienmembran und DNA verringert. Zuerst wurde ein Aliquot von 30 µl chemisch-kompetenter *E.coli* XL-1-Blue auf Eis für 5 min aufgetaut. Anschließend wurden 1 µl Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz hinzugegeben und auf Eis für 5 min inkubiert. Dann erfolgte die Hitzeschock-Transformation, bei der das Gemisch aus Bakterien, Plasmid-DNA oder Ligationsansatz bei 42°C für 1 min erhitzt wurde. Erneut wurden die Zellen auf Eis für 5 min inkubiert, bis schließlich 500 µl vorgewärmtes LB-Medium hinzugegeben wurde. Nach Inkubation bei 37°C und 1400 *revolutions per minute* (rpm) für 1 h wurden 100 µl dieses Gemisches auf eine LB-Agar-Platte mit passendem Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Präparation der Plasmid-DNA und Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Mini-Präparation wurde durchgeführt, um Plasmid-DNA aus putativen E.coli-Klonen nach Transformation zu isolieren. Dazu wurden 2 ml LB-Medium, versetzt mit passendem Selektionsantibiotikum, mit einer E.coli-Kolonie beimpft und bei 37°C und 1400 rpm über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 6000 rpm und Raumtemperatur (RT) für 5 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in 100 µl eiskaltem S1-Puffer resuspendiert. Im S1-Puffer befindet sich RNase A, sodass die Plasmid-DNA zum Schluss frei von RNA ist. Dann wurden 200 µl S2-Puffer hinzugegeben, um die Zellen alkalisch zu lysieren. Nach mehrfachem Invertieren für 5 min mussten 150 µl des neutralisierenden S3-Puffers, welcher Kaliumacetat zur Denaturierung zellulärer Proteine enthält, hinzugegeben werden. Nach Inkubation auf Eis für 10 min wurden durch Zentrifugation (13000 rpm, 4°C, 10 min) die zellulären denaturierten Proteine von der sich nun im Überstand befindenden DNA getrennt. Zur Präzipitation der DNA wurde der Überstand mit 900 µl eiskaltem 100%igem Ethanol versetzt und zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 15 min). Der Überstand wurde entfernt und das DNA-Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol und Zentrifugation (13000 rpm, 4°C, 5 min) gewaschen. Das gewonnene DNA-Pellet wurde in 30 µl H₂O_{dd} gelöst.

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA (1-10 μ g/ μ l) wurde die Midi-Präparation durchgeführt. Nach Restriktionsanalyse der mittels Mini-Präparation isolierten Plasmid-DNA (vgl. Abschnitt 2.2.3) wurden 100 ml LB-Medium, versetzt mit passendem Selektionsantibiotikum, mit der positiven *E.coli*-Kolonie beimpft und bei 37°C und 120 rpm über Nacht inkubiert. Die sich vermehrten Bakterien wurden zentrifugiert (4000 rpm, 4°C, 15 min), der Überstand verworfen und die DNA-Präparation mit Hilfe des NucleoBond[®] Xtra Midi Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Der im Kit enthaltene Filter hält die lysierten Zellfragmente fest, sodass nur die Plasmid-DNA diesen passieren kann, während die im Kit enthaltene Säule mit Silikatgranulat als positiver Anionenaustauscher die negativgeladene Plasmid-DNA bindet. Zur Präzipitation der DNA wurden die Proben mit 3,5 ml Isopropanol versetzt und zentrifugiert (14000 rpm, 4°C, 30 min). Der Überstand wurde entfernt und das DNA-Pellet mit 700 μl 70%igem Ethanol und Zentrifugation (14000 rpm, 4°C, 5 min) gewaschen. Das gewonnene DNA-Pellet wurde in 100 μl H₂O_{dd} gelöst.

Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA konnte mittels UV-Spektroskopie am NanoDrop[®] bestimmt werden. Je nach DNA-Konzentration wird UV-Licht unterschiedlich stark absorbiert. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz besteht ein Zusammenhang zwischen DNA-Konzentration und Intensität des UV-Lichtstrahls, das die DNA-Probe passiert. So konnte durch Messung der Absorption bei 260 nm die DNA-Konzentration bestimmt werden. Eine Extinktion von 1 entsprach einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA bzw. 33 µg/ml ssDNA.

2.2.3 Restriktive Spaltung der Plasmid-DNA

Die weitergehende Analyse und Klonierung der durch Mini- und Midi-Präparation isolierten Plasmid-DNA erfolgte durch restriktive Spaltung mit Restriktionsenzymen. Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die DNA im Bereich spezifischer palindromischer Sequenzen an der Phosphodiesterbindung schneiden. Es entstehen Enden ohne (blunt ends) oder mit (sticky ends) Überhängen. Zur Restriktionsanalyse und Ligation (vgl. Abschnitt 2.2.5) wurden 1 µg Plasmid-DNA auf ein Gesamtvolumen von 20 µl für 2 h bzw. 10 µg Plasmid-DNA auf ein Gesamtvolumen von 40 µl über Nacht bei 37°C mit Restriktionsenzymen versetzt. Die Reaktion wurde durch Hinzugabe von DNA-Ladepuffer oder durch Deaktivierung des Restriktionsenzyms bei 65°C für 20 min beendet. Die resultierenden DNA-Banden konnten mittels Agarosegelelektrophorese getrennt und falls gewünscht mittels Gelextraktion isoliert werden (vgl. Abschnitt 2.2.6). Alle Restriktionsenzyme mit dazugehörigen Standard-Puffern stammten von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Für die Planung und Gestaltung der Plasmid-Klonierung wurde die DNA-Analyse Software pDRAW32 von AcaClone (https://www.acaclone.com) benutzt.

2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz und entspricht somit einer in vitro-DNA-Replikation. Zur Durchführung werden DNA-Matrize, entsprechende Puffer, zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (fwd und rev Primer), Desoxyribonukleotide (dNTP), eine thermostabile DNA-Polymerase und ein Thermocycler benötigt. Nach Ansetzen des PCR-Gemisches folgt die initiale Denaturierung durch Erhitzen. Dann laufen mehrere Zyklen bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation ab. Denaturierung bezeichnet die Auftrennung der Einzelstränge, Annealing die Hybridisierung der Primer an die DNA-Matrize und Elongation die Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnitts mittels thermostabiler DNA-Polymerase unter Verbrauch von dNTP als Substrate. Nach diesen Zyklen folgt eine finale Elongation. PCR-Reaktionen, bei denen das PCR-Produkt als insert in einen linearisierten Vektor integriert werden sollte, wurden mit der Pfu oder Phusion® DNA-Polymerase durchgeführt, da diese eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität als Korrekturlesefunktion besitzen. Die Colony-PCR, die zur Analyse putativer *E.coli*-Klone nach erfolgreicher Transformation diente, wurde mit der DreamTaq DNA-Polymerase durchgeführt. Dazu wurden 20 µl H2Odd mit einer Bakterienkolonie in einem PCR-Reaktionsgefäß angeimpft. Im Folgenden sind die PCR-Ansätze für die verschiedenen DNA-Polymerasen (Tabelle 12) und die dazugehörigen PCR-Programme (Tabelle 13) aufgelistet. Alle DNA-Polymerasen und die dazugehörigen Puffer stammten von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und falls gewünscht mittels Gelextraktion isoliert (vgl. Abschnitt 2.2.6).

Tabelle 12: PCR-Ansätze unter Verwendung verschiedener Polymerasen

Pfu	Phusion®	DreamTaq
1 µl DNA-Matrize (ca. 50 ng)	1 μl DNA-Matrize (ca. 50 ng)	5 μl DreamTaq-Puffer
5 µl Pfu Puffer	10 µl HF-Puffer	4 µl MgCl2 (25 mM)
3 μ l fwd Primer (10 μ M)	2,5 µl fwd Primer (10 µM)	2,5 µl fwd Primer (10 µM)
3 µl rev Primer (10 µM)	2,5 µl rev Primer (10 µM)	2,5 µl rev Primer (10 µM)
1 µl dNTP (10 mM)	1 μl dNTP (10 mM)	1 µl dNTP (10 mM)
0,5 µl Pfu Polymerase (2,5 U/µl)	1 μl Phusion [®] Polymerase (2,5 U/μl)	0,2 μl DreamTaq (1 U/μl)
H_2O_{dd} ad 50 µl	H_2O_{dd} ad 50 µl	H_2O_{dd} ad 30 µl

Fabelle 13: PCR-Programme unter	Verwendung verschiedener	Polymerasen
---------------------------------	--------------------------	-------------

Phase	Pfu	Phusion [®]	DreamTaq
Initiale Denaturierung	95°C, 5 min	98°C, 4 min	95°C, 5 min

Phase		Pfu	Phusion [®]	DreamTaq
30x				
	Denaturierung	95°C, 1 min	98°C, 15 s	95°C, 1 min
	Annealing	60°C, 1 min	60°C, 30 s	60°C, 1 min
	Elongation	72°C, 2 min	72°C, 45 s	72°C, 2 min
Finale	Elongation	72°C, 5 min	72°C, 10 min	72°C, 5 min
Kühlur	ng	4°C, ∞	4°C, ∞	4°C, ∞

2.2.5 Ligation von Plasmid-DNA

Um ein DNA-Fragment als insert in ein als Vektor fungierendes Plasmid einzufügen, musste eine Ligation erfolgen. Bei der Ligation werden insert und Vektor an ihren 3'-OH- und 5'-Phosphat-Enden via ATP-Hydrolyse und Phosphodiesterbindung verknüpft. Hierzu wurden mittels restriktiver Spaltung die pCR-Script- (HincII), p409- (PmeI), pMOWS- (EcoNI und BamHI) und pcDNA3.1- (vgl. Abschnitte 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4, 3.2) Vektoren linearisiert. Bei den pMOWS-Vektoren mussten daraufhin die aus sticky ends bestehenden 5'-Enden zu blunt ends aufgefüllt werden. Dies geschah durch Inkubation mit dem Klenow-Fragment von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) bei 37°C für 10 min und anschließend 95°C für 10 min. Die linearisierten Vektoren pCR-Script, p409 und pMOWS-puro bzw. pMOWS-hygro mussten zudem dephosphoryliert werden. Die Dephosphorylierung verhindert eine Re-Ligation von 5'- und 3'-Enden, wie sie bei blunt ends vorkommt. Nach Deaktivierung des Restriktionsenzym durch kurzzeitige Erhitzung wurde die alkalische Phosphatase FastAPTM mit dazugehörigem Puffer von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) zu 40 µl gespaltener Plasmid-DNA hinzugegeben und bei 37°C für 2 h inkubiert. entweder mittels PCR oder restriktiver Die inserts wurden Spaltung aus Expressionsvektoren hergestellt. Die PCR-Produkte (vgl. Abschnitte 3.1.1, 3.1.3, 3.2) wurden im Sinne eines Zwischenschritts in den pCR-Script- oder p409-Vektor kloniert, bevor sie nach restriktiver Spaltung mit dem endgültigen Vektor ligiert wurden. Dazu wurde das PCR-Produkt an den 5'-Enden phosphoryliert, indem es mit der T4-Polynukleotidkinase von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) versetzt wurde. Anschließend erfolgte die Reinigung der Vektoren und des inserts mittels Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion (vgl. Abschnitt 2.2.6). Die für die Ligation benötigte Menge insert wurde mittels folgender Formel bestimmt:

$$insert [ng] = \frac{5 \times Vektor [ng] \times insert Länge [bp]}{Vektor Länge [bp]}$$

Der Ligationsansatz bestand aus 75-100 ng Vektor, der bestimmten Menge *insert*, 2 μ l T4-DNA-Ligase, 2 μ l T4-Ligase-Puffer, 2 μ l PEG4000 (bei *blunt end*-Ligation) und H₂O *ad* 20 μ l und wurde bei Raumtemperatur für 2 h (*sticky end*) bzw. bei 4°C über Nacht (*blunt end*) inkubiert. Anschließend wurden 10 μ l zur Transformation chemisch-kompetenter *E.coli* eingesetzt (vgl. Abschnitt 2.2.1). Die T4-DNA-Ligase, der dazugehörige Puffer und PEG4000 stammten von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Das Ligationsprodukt wurde schließlich in *E.coli* transformiert (vgl. Abschnitt 2.2.1).

2.2.6 Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion

Zur Trennung der DNA-Fragmente wurde die Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Nach Anlage eines elektrischen Feldes wandern DNA-Fragmente unterschiedlich je nach Anzahl ihrer Basenpaare (bp) durch die Poren eines Agarosegels. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, welches zwischen die Basen der DNA interkaliert, fluoresziert die DNA unter UV-Licht. In dieser Arbeit wurden 1%ige Agarosegele in TAE-Puffer mit 0,001% Ethidiumbromid und eine Spannung von 100 V benutzt. Die GeneRuler[™] Express DNA *Ladder* 100-5000 bp und GeneRuler[™] 1 kb DNA *Ladder* wurden als Größenstandards mitaufgetragen. Zur Visualisierung wurde das Gel iX *Imager* Geldokumentationssystem verwendet.

Anschließend konnten die gewünschten DNA-Banden aus dem Gel extrahiert werden. Unter UV-Licht wurde das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten. Dann erfolgte die Reinigung mit dem NucleoSpin[®] *Gel and PCR Clean-up* Kit nach Herstellerangaben. Dieses Kit wurde ebenfalls zur Reinigung von PCR- und Restriktionsprodukten eingesetzt.

2.2.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der in dieser Arbeit klonierten Plasmide erfolgte durch Microsynth Seqlab (Göttingen, Deutschland). Dabei wurden entweder eigene oder Oligonukleotide der Firma genutzt. Die Auswertung der Nukleotidsequenzen wurde mit den Programmen ClustalW2 von EMBL-EBI (Cambridge, UK) und Chromas Lite von Technelysium (South Brisbane, Australien) durchgeführt.
2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zelllinie CHO-K1 zur Erzeugung konditionierter Zellkulturüberstände mit den fluoreszierenden Proteinen, die Verpackungszelllinie Phoenix-Eco zur retroviralen Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen und die Zelllinie Ba/F3-gp130 zur Analyse der Aktivität synthetischer Zytokinrezeptoren verwendet. CHO-K1-Zellen sind adhärente, immortalisierte Ovarienzellen des Zwerghamsters (129, 130). Phoenix-Eco-Zellen sind adhärente, humane embryonale Nierenzellen, deren Genom unter anderem die drei Gene *gag*, *pol* und *env* zur Produktion von Retroviren besitzt (127). Ba/F3-Zellen sind murine Pro-B-Lymphozyten, die IL-3-abhängig proliferieren (131, 132). Ba/F3-gp130-Zellen sind genetisch modifizierte Ba/F3-Zellen, die mit der cDNA vom humanen gp130 stabil transduziert wurden und aufgrund der gp130-Expression in Gegenwart von Hyper-IL-6 kultiviert werden können (128).

Die adhärenten Zellen der Linie CHO-K1 und Phoenix-Eco wurden wöchentlich zweimal im Verhältnis 1:20 bzw. wöchentlich einmal im Verhältnis 1:50 passagiert. Für die Subkultivierung wurden die CHO-K1- und Phoenix-Eco-Zellen mit sterilem PBS gewaschen und mittels 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung bzw. PBS abgelöst, um im selben Verhältnis auf eine neue Zellkulturschale oder -platte überführt zu werden. Die verschiedenen Ba/F3-gp130-Zelllinien wurden wöchentlich im Verhältnis 1:40000 passagiert und durch Zugabe von Hyper-IL-6 kultiviert. Ba/F3-gp130-Zellen, die den murinen IL-23 Rezeptorkomplex exprimieren (Ba/F3-mIL-12Rβ1-mIL-23), konnten zusätzlich durch Gabe von Hyper-Interleukin-23 (Hyper-IL-23) wachsen. Alle Zelllinien wurden in DMEM^{+/+} bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.3.2 Transfektion, retrovirale Transduktion und Selektion von Zellen

Damit eukaryotische Zellen aus der cDNA die gewünschten Proteinketten exprimieren, müssen CHO-K1- und Phoenix-Eco-Zellen transfiziert und Ba/F3-gp130-Zellen retroviral transduziert werden. Anschließend müssen die Zellen, die die cDNA erfolgreich in ihr integriert haben, selektiert werden. Zur Transfektion wurde Genom das Transfektionsreagenz TurboFectTM benutzt, welches einen positiv geladenen Komplex mit der einzuschleusenden Plasmid-DNA bildet und diese so vor enzymatischem Abbau schützt. CHO-K1-Zellen wurden zu 1,5 x 10⁶ Zellen pro 10cm-Zellkulturschale mit 10 ml DMEM^{+/+} ausgesät und für die Expression der fluoreszierenden Proteine stabil transfiziert, während Phoenix-Eco-Zellen zu 8 x 10⁵ Zellen pro 6-*well* Zellkulturplatte mit je 2 ml DMEM^{+/+} ausgesät und zum Zweck der retroviralen Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen genutzt wurden. Die Zellzählung erfolgte mit dem TC10TM Zellzähler in einer 1:1-Verdünnung mit Trypan-Blau. Die CHO-K1- und Phoenix-Eco-Zellen wurden einen Tag nach dem Aussäen mit einem Gemisch aus 1 ml DMEM^{-/-}, 5 µg Plasmid-DNA und 10 µl TurboFectTM bzw. 200 µl DMEM^{-/-}, 1 µg Plasmid-DNA und 2 µl TurboFectTM versetzt. Dazu musste das Gemisch vorher für 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach behutsam auf die Zellen getropft werden. Nach 6 h erfolgte ein Wechsel des Mediums, wobei das neue Medium von den Phoenix-Eco-Zellen 30% statt 10% fötales Kälberserum enthielt.

Phoenix-Eco-Zellen transkribieren die aufgenommene Plasmid-DNA in mRNA, welche in Virushüllproteine verpackt wird. Die Viruspartikel infizieren Ba/F3-gp130-Zellen, die wiederum die mRNA mittels Reverser Transkriptase in cDNA umwandeln und die cDNA in ihr Genom integrieren. Für die retrovirale Transduktion wurden die retroviralen Vektoren pMOWS-hygro und pMOWS-puro benutzt, die zwei *long tandem repeats* (LTRs) und ein Verpackungssignal besitzen. Einen Tag nach Transfektion der Phoenix-Eco-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden wurde der Überstand der Phoenix-Eco-Zellen, der die benötigten Viruspartikel enthält, durch Zentrifugation (4000 rpm, RT, 5 min) von Zelltrümmern befreit. Dann wurden 250 μ l des Überstandes und 3 μ l (2,4 μ g) Polybrene zur Erhöhung der Transduktions-Effizienz zu 1 x 10⁵ Ba/F3-gp130-Zellen gegeben. Die retroviral transduzierten Zellen wurden zentrifugiert (1800 rpm, RT, 2,5 h), der Überstand verworfen und die Zellen in 5 ml DMEM^{+/+} resuspendiert. Als Wachstumsstimulus wurde den frisch transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen rekombinantes Hyper-IL-6 gegeben.

Nach 48 h wurden die retroviral transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen je nach Ausgangs-Vektor mit Hygromycin-B oder Puromycin für mindestens 2 Wochen selektiert (vgl. Abschnitt 3.1.5). Die Expression der SyCyRs wurde mittels Durchflusszytometrie (vgl. Abschnitt 2.3.3) und Western Blot (vgl. Abschnitt 2.4.2) nachgewiesen. Die stabil transfizierten CHO-K1-Zellen, die die fluoreszierenden Proteine sezernierten, wurden mit G418 selektiert und kultiviert. Die Expression der fluoreszierenden Proteine wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie mit dem Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 und mittels Western Blot (vgl. Abschnitt 2.4.2) nachgewiesen.

2.3.3 Durchflusszytometrie

Nach erfolgreicher Selektion der retroviral transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen konnte die Analyse der Oberflächenexpression von SyCyRs mittels Durchflusszytometrie durchgeführt

werden. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass Zellen nach Passieren eines Lichtstrahls angeregt werden und optische Signale abgeben, die registriert werden können. Zu diesem Zweck müssen spezifische, mit Fluorophoren gekoppelte Antikörper die Zytokinrezeptoren auf der Zelloberfläche binden. Zuerst wurden die zu analysierenden Ba/F3-gp130-Zellen mit sterilem PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Dann wurden 5 x 10⁵ Zellen in ein neues Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (2000 rpm, 4°C, 5 min) und in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (2000 rpm, 4°C, 5 min) wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer mit dem Primärantikörper auf Eis für 2 h lichtgeschützt inkubiert. Als Primärantikörper wurden für G_{VHH}-IL-12Rβ1 und SyCyR(IL-23R) der myc (71D10) und für C_{VHH}-IL-23R der Flag (DYKDDDDK) Antikörper eingesetzt. Die Zellen wurden erneut mit FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (2000 rpm, 4°C, 5 min), um nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer mit dem Sekundärantikörper bei 4°C für 1 h lichtgeschützt inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde der fluoreszierende Antikörper Alexa Fluor 488 verwendet. Die Zellen wurden erneut mit FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (2000 rpm, 4°C, 5 min), um nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Zum Schluss wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer gelöst und am FACS Canto II analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der FCS Express 4 Flow Cytometry Software von De Novo Software (Los Angeles, CA, USA).

2.3.4 Zellviabilitätsassay

Das Proliferationsverhalten der transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen wurde mit dem CellTiter-Blue[®] *Cell Viability Assay* untersucht. Das Prinzip des Zellviabilitätsassays basiert darauf, dass der Redoxfarbstoff Resazurin von metabolisch aktiven Zellen zum fluoreszierenden Resorufin umgesetzt wird. Durch Fluoreszenzmessung kann die Menge des umgesetzten Resorufin, welche proportional zur Anzahl der lebenden Zellen ist, bestimmt werden. Zunächst wurden Ba/F3-gp130-Zellen dreimalig mit sterilem PBS gewaschen (1500 rpm, RT, 5 min), um restliche Zytokine, die zu einer Verzerrung der Ergebnisse geführt hätten, zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in DMEM^{+/+} resuspendiert, auf eine Zellzahl von 1 x 10⁵ Zellen/ml gebracht und die fluoreszierenden Proteine hinzugegeben. Für jede Untersuchung wurden jeweils 100 µl der Zellen in je drei Vertiefungen einer 96-*well* Zellkulturplatte (Triplikate) bei 37°C und 5% CO₂ für mindestens 48 h inkubiert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach Zugabe von 20 µl CellTiter-Blue-Lösung direkt zum Zeitpunkt 0 und alle weitere 20 Minuten. Die Messung

der Exzitation bei 560 nm und Emission bei 590 nm erfolgte mit dem Infinite 200 PRO *plate reader*. Die Messwerte wurden durch Subtraktion der Messwerte zum Zeitpunkt 0 normiert. Für mehrfache Vergleiche wurde die einfache Varianzanalyse (*one-way ANOVA*), gefolgt von der Bonferroni-Korrektur, eingesetzt und mit der Statistiksoftware GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von $p \le 0.05$ festgelegt (* $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$, *** $p \le 0.001$).

2.3.5 Stimulationsassay

Der Stimulationsassay wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob der JAK/STAT-, der MAPK/ERK1/2- oder der PI3K/AKT-Signalweg in retroviral transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen nach Stimulation mit synthetischen Liganden aktiviert werden. Die verschiedenen Ba/F3-gp130-Zellen wurden dreimalig mit sterilem PBS und Zentrifugation (1500 rpm, RT, 5 min) gewaschen. Die Zellen wurden in DMEM^{-/-} resuspendiert, zu je 2 ml aufgeteilt und bei 37°C und 5% CO₂ für 5-6 h inkubiert (*starving*). Anschließend erfolgte die Stimulation mit fluoreszierenden Proteinen für 30 min. Die Zellen wurden nach Zentrifugation (1500 rpm, RT, 5 min) geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Herstellung der Zelllysate und Bestimmung des Proteingehalts (vgl. Abschnitt 2.4.1) konnte die Phosphorylierung der Signalproteine STAT3, ERK1/2 und AKT mittels Western Blot analysiert werden (vgl. Abschnitt 2.4.2). Zur Detektion der Signalproteine wurden für STAT3 der phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) und STAT3 (124H6), für ERK 1/2 der phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) und p44/42 MAPK (ERK1/2) und für AKT der phospho-AKT (Ser473) (D9E) und AKT Antikörper eingesetzt (vgl. Abschnitt 2.1.7).

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Zelllysaten und Bestimmung des Proteingehalts

Zelllysate von Ba/F3-gp130-Zellen wurden zur Analyse der aktivierten Signalproteine und der Expression von SyCyRs hergestellt. Zunächst wurden die Suspensionszellen direkt in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden sie mittels 200 µl phospho-STAT3-Lyse-Puffer bei 4°C für 2 h lysiert. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 4°C, 15 min) wurde der Überstand mit dem darin enthaltenen Zelllysat bei -20°C gelagert.

Der Proteingehalt der Ba/F3-gp130-Zelllysate wurde mit Hilfe des Bicinchoninsäure (BCA) *Protein Assay* Kits nach Herstellerangaben bestimmt. In Anwesenheit von Proteinen wird Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert und der Komplex aus BCA und einwertigem Kupfer ergibt einen violetten Farbstoff. So kann der Proteingehalt durch Messung der Absorption bei 562 nm bestimmt werden. Steigende Konzentrationen von BSA wurden zur Erstellung einer Standardgeraden benutzt. Für jede Untersuchung wurden die Zelllysate 1:20 in H₂O_{dd} verdünnt und in je zwei Vertiefungen einer 96-*well* Zellkulturplatte (Duplikate) gemessen.

2.4.2 Western Blot

Der Western Blot bezeichnet die Trennung, Übertragung und Immundetektion von Proteinen. Die *sodium dodecyl sulfate* (SDS-) Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) diente zur Auftrennung von Proteinen der Zelllysate oder Zellkulturüberstände anhand ihrer molekularen Masse. Nach Anlage eines elektrischen Feldes wandern Proteine je nach Molekulargewicht unterschiedlich schnell durch die Poren des Polyacrylamidgels. Dabei ist der isoelektrische Punkt der Proteine vernachlässigbar, weil durch das Anlagern des negativ geladenen SDS an die Proteine eine einheitliche Ladungsdichte entsteht. Das Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammelgel für das Auftragen der Proben und einem Trenngel zur Trennung der Proteine (Tabelle 14). Die Proteine wurden vor der SDS-PAGE mit β-Mercaptoethanol-haltigem Lämmli-Puffer versetzt und bei 95°C für 10 min inkubiert, um Disulfidbrücken aufzuspalten und die Proteine zu linearisieren. Anschließend wurden 20 μl bzw. 50 μg Protein aufgetragen und die SDS-PAGE bei 90 V durchgeführt. Der PageRulerTM *Prestained Protein Ladder* wurde als Größenstandard aufgetragen.

	Sammelgel	Trenngel
H ₂ O	2,28 ml	3,3 ml
30%ige Acrylamid-Lösung	0,67 ml	4 ml
Sammel-/Trenngelpuffer	1 ml	2,6 ml
10%iges APS	40 µl	100 µl
TEMED	4 µl	4 µl

Tabelle 14: Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel

Anschließend erfolgte der Transfer von Proteinen vom SDS-Elektrophoresegel auf eine PVDF-Membran und der Nachweis mittels Immundetektion. Bei der Immundetektion bindet der Primärantikörper spezifisch das zu analysierende Protein, während der Sekundärantikörper wiederum den Primärantikörper erkennt. Am Sekundärantikörper ist eine Peroxidase gekoppelt, deren Aktivität nach Hinzugabe eines geeigneten Substrats nachweisbar ist. Zunächst wurde die PVDF-Membran für 2 min in Methanol aktiviert und in Transferpuffer äquilibriert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Trans-Blot[®] Turbo[™]

Transfer System genutzt. Das Transferpaket setzte sich, von unten nach oben, aus 4 Lagen Filter-Papier, PVDF-Membran, SDS-Polyacrylamid-Gel und weiteren 4 Lagen Filter-Papier zusammen. Das Filter-Papier wurde in Transferpuffer getränkt. Der Transfer auf die Membran erfolgte mit einem senkrecht zum Elektrophoresegel angelegten elektrischen Feld (1 A, 20 V, 60 min). Die Membran wurde für 2-3 h in 5% iger Magermilchlösung bei Raumtemperatur inkubiert, um freie Proteinbindestellen zu blockieren. Anschließend wurde der Primärantikörper hinzugegeben und die Membran bei 4°C über Nacht inkubiert. Als Primärantikörper wurden die beim Stimulationsassay angegebenen Antikörper für die Signalproteine (vgl. Abschnitt 2.3.5), für G_{VHH}-IL-12Rβ1 und SyCyR(IL-23R) der myc (71D10), für C_{VHH}-IL-23R der Flag (DYKDDDDK) und für die fluoreszierenden Proteine der GFP und der Flag (DYKDDDDK) Antikörper eingesetzt (vgl. Abschnitte 3.1, 3.2, 3.3, 3.4). Die Membran wurde anschließend dreimalig mit TBS-T gewaschen und für 2 h bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden die POD-konjugierte Maus und Kaninchen Antikörper verwendet. Die Detektion der Proteine wurde mit dem Immobilon™ Western HRP Substrat nach Herstellerangaben durchgeführt. Mit dem ChemoCam Imager und der ChemoStar Professional Software wurde die Immundetektion ausgewertet. Für eine weitere Beprobung konnte die Membran bei 60°C in stripping-Puffer für 30 min inkubiert und danach erneut geblockt werden. Die Software ImageJ des NIH (Bethesda, MD, USA) wurde als Bildbearbeitungsprogramm der in dieser Arbeit gezeigten Western Blots genutzt. Zur Berechnung der Molekulargewichte der Proteine wurde das Portal ExPASy vom Schweizer Institut für Bioinformatik (https://www.expasy.org) genutzt.

2.4.3 Quantifizierung von fluoreszierenden Proteinen in Zellkulturüberständen

Die fluoreszierenden Proteine aus den konditionierten Zellkulturüberstände der stabil transfizierten CHO-K1-Zellen konnten mittels Fluoreszenzmessung anhand einer Standardkurve vom rekombinanten GFP quantifiziert werden. Dafür wurde eine lichtgeschützte 96-*well* Zellkulturplatte genutzt, in deren Vertiefungen 100 µl des jeweiligen konditionierten Zellüberstandes bzw. einer bestimmten Konzentration von rGFP pipettiert wurde. Das rGFP wurde in Konzentrationen von 10 bis 0,3 µg/ml in Zellkulturüberstand gleich behandelter, untransfizierter CHO-K1-Zellen verdünnt. Alle Fluoreszenzwerte wurden in Duplikaten gemessen und durch Subtraktion der Werte der Zellkulturüberstände untransfizierter CHO-K1-Zellen normiert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mit einer

Exzitation bei 483 nm und einer Emission bei 535 nm mit dem Infinite 200 PRO plate reader.

3 Ergebnisse

3.1 Konstruktion und Expression der SyCyRs

Um den Signalweg von IL-23 mittels synthetischer Rezeptoren zu phänokopieren, wurde der Rezeptorkomplex aus IL-12Rβ1 und IL-23R molekularbiologisch verändert. Da der Signalweg der synthetischen Zytokinrezeptoren derselbe sein sollte wie der von IL-23, mussten die intrazellulären Domänen der Rezeptoren unverändert bleiben, damit dieselben zytoplasmatischen Signalproteine an die Rezeptoren binden und aktiviert werden konnten. Die ligandenbindenden, extrazellulären Domänen der Rezeptoren mussten allerdings ersetzt werden, um eine Dimerisierung der Rezeptoren mit nicht-physiologischen Liganden zu initialisieren. Dafür boten sich die fluoreszierenden Proteine GFP und mCherry als Ersatz für p40 und p19 an. Die ligandenbindenden Domänen der Rezeptoren mussten folglich durch spezifische GFP- und mCherry-bindende *nanobodies* (GvHH, CvHH) ausgetauscht werden. Ein heterodimeres GFP:mCherry-Fusionsprotein, bei dem GFP und mCherry an IL-12Rβ1 bzw. IL-23R binden, könnte somit eine Rezeptordimerisierung und darauffolgend eine Signaltransduktion auslösen, die normalerweise durch IL-23 entsteht.

Dementsprechend wurde der IL-12Rß1 mit einem extrazellulär liegenden GvHH fusioniert (G_{VHH} -IL-12R β 1), während der IL-23R mit einem extrazellulär liegenden C_{VHH} verknüpft wurde (C_{VHH}-IL-23R). So entstand ein Komplex aus synthetischen Zytokinrezeptoren (synthetic cytokine receptors, SyCyRs), der die Signaltransduktion von IL-23 phänokopieren sollte (SyCyR[IL-23]) (Abb. 4). Außerdem wurden die für den GVHH-IL-12Rβ1 und den C_{VHH}-IL-23R kodierenden cDNAs in einem offenen Leseraster (ORF) mittels der 2A-Technologie kombiniert (SyCyR[IL-23/2A])(126).Die Oberflächenexpression der SyCyRs erfolgte in Ba/F3-gp130-Zellen, während CHO-K1-Zellen für die Produktion der fluoreszierenden Proteine genutzt wurden. Um die Phänokopie des IL-23 Rezeptorkomplexes nachzuweisen, wurden SyCyRs exprimierende Ba/F3-gp130-Zellen mit GFP:mCherry-Fusionsproteinen artifiziell stimuliert. Zum einen wurde daraufhin das STAT3/ERK1/2-abhängige Proliferationsverhalten und zum anderen die Aktivierung von STAT3, ERK1/2 und AKT als wichtige Signalproteine der IL-23 Signaltransduktion analysiert. Abschließend wurde parallel zur Phänokopie der IL-23 Signaltransduktion untersucht, inwiefern die Homodimerisierung des IL-23R in Ba/F3-gp130-Zellen eine IL-23-charakteristische Signaltransduktion auslöst. Dazu wurde der IL-23R mit einem extrazellulär liegenden G_{VHH} fusioniert (G_{VHH}-IL-23R) und die Homodimerisierung dieser IL-23R-SyCyRs (SyCyR[IL-23R]) durch Stimulation mit homomeren GFP-Fusionsproteine induziert (vgl. Abschnitt 3.4).



Abb. 4: Schematische Darstellung der IL-23-SyCyRs. Der größte Teil der ligandenbindenden, extrazellulären Domänen (ECD) des IL-23 Rezeptorkomplexes wurde entfernt und durch GFP- und mCherrybindende *nanobodies* (G_{VHH} , C_{VHH}) ersetzt. Dazu wurde der G_{VHH} an 15 Aminosäuren (AS) der ECD, die transmembranäre (TMD) und intrazelluläre (ICD) Domänen des IL-12R β 1 fusioniert (G_{VHH} -IL-12R β 1). Der C_{VHH} wurde an 17 AS der ECD, die TMD und ICD des IL-23R fusioniert (C_{VHH} -IL-23R). Durch Bindung eines heterodimeren GFP:mCherry-Fusionsproteins (GFP-mCherry) wird eine Rezeptor-Heterodimerisierung und konsekutive Signaltransduktion via TYK2 und JAK2 ausgelöst. Auf diese Weise kann der Signalweg von IL-23 mittels SyCyRs phänokopiert werden. Modifiziert nach Engelowski *et al.* 2018 (124).

3.1.1 Konstruktion des GvHH-IL-12Rβ1

Für die Konstruktion des G_{VHH} -IL-12Rβ1 wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1- G_{VHH} -IL-23R, welcher die kodierende cDNA für den SyCyR(IL-23R) enthielt und zu Beginn dieser Arbeit in der AG Scheller bereits vorhanden war, als Vorlage genutzt (vgl. Abschnitt 3.4) (124). Die für den G_{VHH} -IL-12Rβ1 kodierende cDNA wurde durch Fusion der Sequenzen für das humane IL-11R-Signalpeptid (Q14626, AS 1-24), gefolgt von den Sequenzen für den myc-*tag* (EQKLISEEDL), den GFP-*nanobody* (G_{VHH}) (94) und den murinen IL-12Rβ1 (Q60837), bestehend aus den Aminosäuren A551 bis A738 mit 15 AS der extrazellulären und den gesamten transmembranären und intrazellulären Domänen des Rezeptors, generiert (Abb. 5). Die für den murinen IL-12Rβ1 kodierende cDNA wurde via PCR aus dem Expressionsvektor p409-mIL-12Rβ1 amplifiziert und in pcDNA3.1-G_{VHH}-IL-23R, aus dem die für den IL-23R kodierende cDNA entfernt wurde, eingefügt (Abb. 5). So

entstand der Expressionsvektor pcDNA3.1- G_{VHH} -IL-12R β 1, der die für den G_{VHH} -IL-12R β 1 kodierende cDNA enthielt (vgl. Abschnitt 6, Ergänzende Abb. 1).



Abb. 5: Expressionskassette des GvHH-IL-12R β 1 (A) und Klonierungsschema für pcDNA3.1-GvHH-IL-12R β 1 (B). A Die Expressionskassette des GvHH-IL-12R β 1 besteht aus den Sequenzen für das IL-11R-Signalpeptid (SP), den myc-*tag*, den GFP-*nanobody* (GvHH) und den murinen IL-12R β 1, bestehend aus den Aminosäuren A551 bis A738 mit 15 AS der extrazellulären und den gesamten transmembranären und intrazellulären Domänen des Rezeptors. Modifiziert nach Engelowski *et al.* 2018 (124). **B** Für die Amplifikation der für den IL-12R β 1 kodierenden cDNA wurden die Oligonukleotide IL-12R β 1-EcoRI-FP als fwd-Primer und IL-12R β 1-NotI-RP als rev-Primer genutzt, um EcoRI- und NotI-Schnittstellen in das *insert* einzufügen. Durch restriktive Spaltung mit EcoRI und NotI konnte die für den IL-12R β 1 kodierende cDNA mit pcDNA3.1-GvHH-IL-23R, aus dem die für den IL-23R kodierende cDNA durch restriktive Spaltung mit EcoRI und NotI entfernt wurde, ligiert werden. Die gekrümmten Pfeile zeigen die Richtung des ORF von 5' nach 3' an.

3.1.2 Konstruktion des CVHH-IL-23R

Für die Konstruktion des C_{VHH} -IL-23R wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1- C_{VHH} -IL-23R-TM, welcher nicht die gesamte Sequenz des IL-23R enthielt und zu Beginn dieser Arbeit in der AG Scheller bereits vorhanden war, als Vorlage genutzt (125). Die für den C_{VHH} -IL-23R kodierende cDNA wurde durch Fusion der Sequenzen für das humane IL-11R-Signalpeptid (Q14626, AS 1-24), gefolgt von den Sequenzen für den Flag*-tag* (DYKDDDDK), den mCherry*-nanobody* (C_{VHH}) (95) und den murinen IL-23R (Q8K4B4),

bestehend aus den Aminosäuren A358 bis K644 mit 17 AS der extrazellulären und den gesamten transmembranären und intrazellulären Domänen des Rezeptors, generiert (Abb. 6). Die für den IL-23R kodierende cDNA wurde aus pcDNA3.1- G_{VHH} -IL-23R entnommen und in pcDNA3.1- C_{VHH} -IL-23R-TM, aus dem die für den IL-23R-TM kodierende cDNA entfernt wurde, eingefügt (Abb. 6). So entstand der Expressionsvektor pcDNA3.1- C_{VHH} -IL-23R, der die für den C_{VHH}-IL-23R kodierende cDNA enthielt (vgl. Abschnitt 6, Ergänzende Abb. 2).



Abb. 6: Expressionskassette des C_{VHH}-IL-23R (A) und Klonierungsschema für pcDNA3.1-C_{VHH}-IL-23R (B). A Die Expressionskassette des C_{VHH}-IL-23R besteht aus den Sequenzen für das IL-11R-Signalpeptid (SP), den Flag-*tag*, den mCherry-*nanobody* (C_{VHH}) und den murinen IL-23R, bestehend aus den Aminosäuren A358 bis K644 mit 17 AS der extrazellulären und den gesamten transmembranären und intrazellulären Domänen des Rezeptors. Modifiziert nach Engelowski *et al.* 2018 (124). B Durch restriktive Spaltung mit EcoRI und NotI wurde die für den IL-23R kodierende cDNA aus pcDNA3.1-G_{VHH}-IL-23R entnommen und mit pcDNA3.1-C_{VHH}-IL-23R-TM, aus dem die für den IL-23R-TM kodierende cDNA durch restriktive Spaltung mit EcoRI und NotI entfernt wurde, ligiert. Die gekrümmten Pfeile zeigen die Richtung des ORF von 5' nach 3' an.

3.1.3 Konstruktion von SyCyR(IL-23/2A)

Um die für den G_{VHH}-IL-12Rβ1 und den C_{VHH}-IL-23R kodierenden cDNAs in einem offenen Leseraster zu kombinieren (SyCyR[IL-23/2A]), wurde der Expressionsvektor pMK-Fusio, der die Sequenzen für eine Furin-Schnittstelle und das 2A-Peptid enthält und zu Beginn dieser Arbeit in der AG Scheller bereits vorhanden war, als Vorlage genutzt (126). Durch die Furin-Schnittstelle und die Selbstprozessierung des 2A-Peptids erfolgt eine posttranslationale Trennung der aus einem einzelnen offenen Leseraster exprimierten Rezeptoren (133) (Abb. 7). Die Rezeptoren werden somit a priori in äquivalenten Mengen auf der Zelloberfläche exprimiert und sind biologisch aktiv (126).



Abb. 7: Expressionskassette von SyCyR(IL-23/2A). Die Expressionskassette von SyCyR(IL-23/2A) besteht aus den Sequenzen für das IL-11R-Signalpeptid (SP), den Flag-*tag*, den mCherry-*nanobody* (C_{VHH}), den murinen IL-23R, bestehend aus den Aminosäuren A358 bis K644 mit 17 AS der extrazellulären und den gesamten transmembranären und intrazellulären Domänen des Rezeptors, die Furin-Schnittstelle, das 2A-Peptid, ein weiteres IL-11R-Signalpeptid (SP), den myc-*tag*, den GFP-*nanobody* (G_{VHH}) und den murinen IL-12R β 1, bestehend aus den Aminosäuren A551 bis A738 mit 15 AS der extrazellulären und den gesamten transmembranären und intrazellulären Domänen des Rezeptors. Durch die posttranslationale Selbstprozessierung des 2A-Peptids erfolgt die Expression der beiden Rezeptoren aus einem einzelnen offenen Leseraster. Nach der Sekretion werden die 2A-Reste und die Signalpeptide im Zytoplasma entfernt. Modifiziert nach Engelowski 2015 und Suthaus *et al.* 2010 (125, 126).

Die für G_{VHH}-IL-12Rβ1 und C_{VHH}-IL-23R kodierenden cDNAs wurden via PCR aus den jeweiligen pcDNA3.1-Expressionsvektoren amplifiziert und schrittweise in pMK-Fusio eingefügt (Abb. 8). So entstand der Expressionsvektor pMK-C_{VHH}-IL-23R-2A-G_{VHH}-IL-12Rβ1 (pMK-SyCyR[IL-23/2A]), der die für beide SyCyRs kodierende cDNA in einem Leseraster enthält (vgl. Abschnitt 6, Ergänzende Abb. 3).



Abb. 8: Klonierungsschema für pMK-SyCyR(IL-23/2A). Für die Amplifikation der für den C_{VHH} -IL-23R kodierenden cDNA wurden die Oligonukleotide C_{VHH} -IL-23R-XbaI-FP als fwd-Primer und C_{VHH} -IL-23R-HindIII-RP als rev-Primer genutzt, um XbaI- und HindIII-Schnittstellen in das eine *insert* einzufügen. Für die Amplifikation der für den G_{VHH} -IL-12R β 1 kodierenden cDNA wurden die Oligonukleotide G_{VHH} -IL-12R β 1 kodierenden cDNA wurden die Oligonukleotide G_{VHH} -IL-12R β 1-NheI-FP als fwd-Primer und G_{VHH} -IL-12R β 1-XhoI-RP als rev-Primer eingesetzt, um NheI- und XhoI-Schnittstellen in das andere *insert* einzufügen. Durch restriktive Spaltung mit XbaI und HindIII konnte zuerst die für den C_{VHH} -IL-23R kodierende cDNA mit pMK-Fusio ligiert werden (pMK- C_{VHH} -IL-23R-2A), um anschließend die für den G_{VHH} -IL-12R β 1 kodierende cDNA durch restriktive Spaltung mit NheI und XhoI in pMK- C_{VHH} -IL-23R-2A zu integrieren. Die gekrümmten Pfeile zeigen die Richtung des ORF von 5' nach 3' an.

3.1.4 Subklonierung der SyCyR-cDNAs in pMOWS-Vektoren

Zur Expression der SyCyRs auf der Oberfläche von Ba/F3-gp130-Zellen erfolgte die Subklonierung der für die SyCyRs kodierenden cDNAs in die Expressionsvektoren pMOWS-puro und pMOWS-hygro. Dazu wurden die für den G_{VHH}-IL-12Rβ1 und den C_{VHH}-IL-23R kodierenden cDNAs aus den jeweiligen pcDNA3.1-Expressionsvektoren entnommen, während die für SyCyR(IL-23/2A) kodierende cDNA aus pMK-SyCyR-(IL-23/2A) isoliert wurde. Die für den C_{VHH}-IL-23R und SyCyR(IL-23/2A) kodierenden cDNAs wurden in pMOWS-puro eingefügt, wohingegen die für den G_{VHH}-IL-12Rβ1 kodierende cDNA in pMOWS-hygro integriert wurde (Abb. 9). Alle in dieser Arbeit hergestellten Plasmide in pcDNA3.1 und pMK wurden mittels Sequenzierung verifiziert.



Abb. 9: Klonierungsschema für die Subklonierung der SyCyR-cDNAs in pMOWS-Vektoren. Durch restriktive Spaltung mit PmeI konnten die für den C_{VHH} -IL-23R und G_{VHH} -IL-12R β 1 kodierenden cDNAs aus pcDNA3.1- C_{VHH} -IL-23R bzw. pcDNA3.1- G_{VHH} -IL-12R β 1 entnommen werden, während die für SyCyR(IL-23/2A) kodierende cDNA aus pMK-SyCyR(IL-23/2A) durch restriktive Spaltung mit EcoRV isoliert wurde. Die Expressionsvektoren pMOWS-puro und pMOWS-hygro wurden durch restriktive Spaltung mit EcoNI und BamHI und anschließender Auffüllung mit Klenow und Dephosphorylierung passend präpariert. Über *blunt end*-Ligation konnten die für die SyCyRs kodierenden cDNAs in die jeweiligen pMOWS-Vektoren integriert werden. Die gekrümmten Pfeile zeigen die Richtung des ORF von 5' nach 3' an.

3.1.5 Retroviral transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen exprimieren SyCyRs auf ihrer Zelloberfläche

Zur Expression der SyCyRs auf der Zelloberfläche eukaryotischer Zellen wurde die Zelllinie Ba/F3-gp130 ausgewählt, da diese ein besonders gut geeignetes Zellmodell für die Analyse der IL-23 Signaltransduktion darstellt (24). Die in dieser Arbeit verwendeten Ba/F3-gp130-Zellen wurden mit den für die entsprechenden SyCyRs kodierenden pMOWS-Expressionsvektoren retroviral transduziert (vgl. Abschnitt 3.1.4). So entstanden Ba/F3gp130-Zelllinien, die nur den GvHH-IL-12Rβ1 (Ba/F3-GvHH-IL-12Rβ1), nur den CvHH-IL-23R (Ba/F3-CvHH-IL-23R) oder beide für die IL-23 Signaltransduktion entscheidenden SyCyRs (Ba/F3-SyCyR[IL-23], Ba/F3-SyCyR[IL-23/2A]) exprimierten (Abb. 10). Danach wurden die retroviral transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen mittels Kultivierung unter Puromycin bzw. Hygromycin B selektiert, da nur bei Integration der entsprechenden cDNA ins Genom die Zellen bei Antibiotikagabe überleben konnten. Die Ba/F3-gp130-Zelllinie, die den G_{VHH}-IL-23R exprimierten (Ba/F3-SyCyR[IL-23R]), waren zu Beginn dieser Arbeit im Besitz der AG Scheller und wurden für weitergehende Untersuchungen genutzt (vgl. Abschnitt 3.4).



Abb. 10: Generierung der SyCyRs exprimierenden Ba/F3-gp130-Zelllinien. Ba/F3-gp130-Zellen wurden als Ausgangszellen verwendet und mit den angegebenen pMOWS-Expressionsvektoren, die die Sequenzen für die entsprechenden SyCyRs enthielten, retroviral transduziert, sodass die abgebildeten Ba/F3-gp130-Zelllinien entstanden. Die Zelllinien Ba/F3-G_{VHH}-IL-12R β 1 exprimieren nur den G_{VHH}-IL-12R β 1, Ba/F3-C_{VHH}-IL-23R nur den C_{VHH}-IL-23R und Ba/F3-SyCyR(IL-23) bzw. Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A) sowohl G_{VHH}-IL-12R β 1 als auch C_{VHH}-IL-23R. Dabei mussten Ba/F3-SyCyR(IL-23)-Zellen in zwei aufeinanderfolgenden retroviralen Transduktionen hergestellt werden, während Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen aufgrund des einzelnen offenen Leserasters der cDNA mittels einer einzigen retroviralen Transduktion erzeugt werden konnten.

Zunächst wurde die Expression der SyCyRs in den retroviral transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen mittels SDS-PAGE und Western Blot bestätigt (Abb. 11). Der G_{VHH} -IL-12R β 1 und G_{VHH} -IL-23R (vgl. Abschnitt 3.4) konnten anhand ihrer myc-*tags* detektiert werden, während der C_{VHH}-IL-23R anhand seines Flag-*tags* erkannt wurde. Ba/F3-gp130-Zellen ohne SyCyR-Expression wurden in allen Untersuchungen als Negativkontrolle hinzugezogen. Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse zeigen, dass die in dieser Arbeit hergestellten SyCyR-cDNAs in den verschiedenen Ba/F3-gp130-Zelllinien in die entsprechenden Proteinketten umgesetzt wurden. Da der Proteingehalt der Zelllysate nicht quantifiziert wurde, lässt sich allerdings keine Aussage über das Ausmaß der Rezeptorexpression in den jeweiligen Zellen machen.

Ba/F3-gp130-Zellinien



Abb. 11: Analyse der SyCyR-Expression in retroviral transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen mittels SDS-PAGE und Western Blot. Zelllysate von Ba/F3-G_{VHH}-IL-12R β 1, Ba/F3-SyCyR(IL-23R) und Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A) wurden hergestellt und mittels Western Blot analysiert. Gleiche Volumina der Zelllysate (40 µl/Spur) wurden aufgetragen und die SyCyRs mittels α -myc bzw. α -Flag detektiert. Die Molekulargewichte betragen nach Abspaltung des Signalpeptids 35 kDa für G_{VHH}-IL-12R β , 46 kDa für G_{VHH}-IL-23R und 47 kDa für C_{VHH}-IL-23R. Zelllysate von Ba/F3-gp130-Zellen, die keine SyCyRs exprimierten, wurden ebenfalls mit den Antikörpern inkubiert und als Negativkontrolle mitaufgetragen. Die Durchführung dieses Experiments erfolgte in Zusammenarbeit mit Erika Engelowski.

Zur Analyse der Expression von SyCyRs auf der Zelloberfläche wurden die verschiedenen Ba/F3-gp130-Zelllinien unter Verwendung der Durchflusszytometrie untersucht. Dazu wurden Ba/F3-GvHH-IL-12R β 1-, Ba/F3-CvHH-IL-23R-, Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-, Ba/F3-SyCyR(IL-23)- und Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen mit dem myc Antikörper zum Nachweis von GvHH-IL-12R β 1 und GvHH-IL-23R oder dem Flag Antikörper zum Nachweis von CvHH-IL-23R inkubiert und sekundär mit einem Fluorophor markiert. Analog zur Western Blot-Analyse wurden Ba/F3-gp130-Zellen ohne SyCyR-Expression in allen Untersuchungen als Negativkontrolle hinzugezogen. Die deutliche Verschiebung der Histogramme der SyCyRs exprimierenden Ba/F3-gp130-Zelllinien gegenüber denen der unveränderten Ba/F3-gp130-Zellen zeigte, dass die retroviral transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen die entsprechenden SyCyRs auf ihrer Zelloberfläche tragen (Abb. 12). In Kombination mit den Daten der Western Blot-Analyse wurde die SyCyR-Expression somit erfolgreich nachgewiesen. Die geringere Verschiebung der Histogramme von CvHH-IL-23R und GvHH-IL-23R exprimierenden Zellen im Vergleich zu denen der GvHH-IL-12R β 1-Expression ist möglicherweise einer schwächeren Rezeptorexpression zuzuschreiben.



Abb. 12: Analyse der Oberflächenexpression von SyCyRs in retroviral transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Die angegebenen Ba/F3-gp130-Zelllinien (Ba/F3-GvHH-IL-12Rβ1, Ba/F3-CVHH-IL-23R, Ba/F3-SyCyR[IL-23/2A], Ba/F3-SyCyR[IL-23] und Ba/F3-SyCyR[IL-23R]) wurden im Hinblick auf die Oberflächenexpression der SyCyRs durchflusszytometrisch analysiert. Auf der Abszissenachse ist die Intensität der Fluoreszenz als Indikator für die Oberflächenexpression der SyCyRs dargestellt. Auf der Ordinatenachse ist die Anzahl der Zellen dargestellt. Die schwarzen Linien stellen Histogramme der SyCyRs exprimierenden Ba/F3-gp130-Zellen dar, die mit α-myc bzw. α-Flag inkubiert und sekundär mit einem Fluorophor markiert wurden. Die grauen Histogramme stellen Ba/F3-gp130-Zellen ohne SyCyR-Expression dar, die als Negativkontrolle ebenfalls mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert wurden. Wiedergabe der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature (124),http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

3.2 Konstruktion und Expression synthetischer Liganden

Fluoreszierende Proteine und verschiedene Kombinationen dieser dienten als synthetischer Ersatz für IL-23, die an SyCyRs binden und diese aktivieren. Als synthetische zytokinähnliche Liganden wurden monomeres GFP, monomeres mCherry und GFP:mCherry-Fusionsproteine designt (Abb. 13). Zu den GFP:mCherry-Fusionsproteinen gehören das heterodimere GFP-mCherry, das heterotrimere GFP-GFP-mCherry (2xGFPmCherry) und das homotrimere GFP-GFP (3xGFP). GFP-mCherry und 2xGFPmCherry ermöglichten die Aktivierung von SyCyR(IL-23) und SyCyR(IL-23/2A) aktivieren, während 2xGFP-mCherry und 3xGFP die Homodimerisierung von SyCyR(IL-23R) induzierte.



Abb. 13: Schematische Darstellung der synthetischen Liganden. Fluoreszierende Proteine wurden in dieser Arbeit als synthetische Liganden zur Aktivierung der IL-23-ähnlichen Signaltransduktion verwendet. Zu diesen gehören monomeres GFP, monomeres mCherry und die GFP:mCherry-Fusionsproteine GFP-mCherry, 2xGFP-mCherry und 3xGFP.

3.2.1 Konstruktion des monomeren GFP

Zu Beginn dieser Arbeit lagen die cDNAs, die für monomeres mCherry, GFP-mCherry, 2xGFP-mCherry und 3xGFP kodieren, im Expressionsvektor pcDNA3.1 in der AG Scheller bereits vor (124, 125). Die für die fluoreszierenden Proteine kodierenden cDNAs wurden durch Fusion der Sequenzen für das humane IL-11R-Signalpeptid (Q14626, AS 1-24), gefolgt von den Sequenzen für den N-terminalen Flag-*tag* (DYKDDDDK) und die jeweiligen fluoreszierenden Proteine generiert (Abb. 14). Zur Konstruktion von monomerem GFP wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1-2xGFP-mCherry als Vorlage genutzt. Die für GFP kodierende cDNA wurde via PCR aus dem Expressionsvektor pcDNA3.1-GFP-mCherry kodierende cDNA entfernt wurde, eingefügt (Abb. 14). So entstand der Expressionsvektor pcDNA3.1-GFP, der die für GFP kodierende cDNA enthielt.



Abb. 14: Expressionskassetten der synthetischen Liganden (A) und Klonierungsschema für pcDNA3.1-GFP (B). A Dargestellt sind die Expressionskassetten von monomerem GFP, den GFP:mCherry-Fusionsproteinen und monomerem mCherry. Diese bestehen jeweils aus dem IL-11R-Signalpeptid (SP), dem Flag-*tag* und den entsprechenden fluoreszierenden Proteinen. Modifiziert nach Engelowski *et al.* 2018 (124). B Für die Amplifikation der für GFP kodierenden cDNA wurden GFP-BamHI-FP als fwd- und GFP-NotI-RP als rev-Primer genutzt, um BamHI- und NotI-Schnittstellen in das *insert* einzufügen. Durch restriktive Spaltung mit BamHI und NotI konnte die für GFP kodierende cDNA mit pcDNA3.1-2xGFP-mCherry, aus dem die für 2xGFP-mCherry kodierende cDNA entfernt wurde, ligiert werden. Die gekrümmten Pfeile zeigen die Richtung des ORF von 5' nach 3' an.

3.2.2 Stabil transfizierte CHO-K1-Zellen exprimieren GFP:mCherry-Fusionsproteine

Zur Expression der synthetischen Liganden wurde die Zelllinie CHO-K1 ausgewählt. CHO-K1-Zellen werden in der Biotechnologie routinemäßig zur Produktion von rekombinanten Proteinen verwendet (134). Die in dieser Arbeit verwendeten CHO-K1-Zellen wurden mit den für die fluoreszierenden Proteine kodierenden pcDNA3.1-Expressionsvektoren stabil transfiziert. Fünf verschiedene CHO-K1-Zelllinien wurden erzeugt, die entweder monomeres GFP, monomeres mCherry oder eines der GFP:mCherry-Fusionsproteine

exprimierten. Danach wurden die CHO-K1-Zelllinien mittels Kultivierung unter Geneticin (G418) selektiert, da nur bei Integration der entsprechenden cDNA ins Genom die Zellen bei Antibiotikagabe überleben konnten. Zunächst zeigten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, dass die stabil transfizierten CHO-K1-Zellen fluoreszieren und a priori fluoreszierende Proteine exprimierten (Abb. 15).



Abb. 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der stabil transfizierten CHO-K1-Zellen. CHO-K1-Zellen wurden jeweils mit pcDNA3.1-GFP, pcDNA3.1-GFP-mCherry, pcDNA3.1-2xGFP-mCherry, pcDNA3.1-3xGFP oder pcDNA3.1-mCherry stabil transfiziert und nach Selektion mit dem Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 untersucht. Die angegebenen stabil transfizierten CHO-K1-Zellen wiesen grüne oder rote Fluoreszenz infolge der Expression von GFP, mCherry und GFP:mCherry-Fusionsproteinen auf. Die Hellfeldmikroskopie wurde als brightfield und die Fluoreszenzmikroskopie als GFP bzw. mCherry bezeichnet. Overlay bezeichnet die Überlagerung der hellfeldmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Die Maßstabsleiste stellt eine Länge von 300 µm dar. Wiedergabe Genehmigung Springer der Abbildung mit freundlicher von Nature (124),http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

Die stabil transfizierten CHO-K1-Zellen sollten daraufhin die fluoreszierenden Proteine in den Zellkulturüberstand sezernieren. Diese Zellkulturüberstande wurden steril filtriert und

aliquotiert. Dadurch konnte die Expression der synthetischen Liganden in den stabil transfizierten CHO-K1-Zellen mittels SDS-PAGE und Western Blot aufgezeigt werden (Abb. 16). Dabei wurden die fluoreszierenden Proteine entweder anhand GFP oder ihres Flag-*tags* detektiert. Zusammen mit den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden somit die von den stabil transfizierten CHO-K1-Zellen in den Zellkulturüberstand sezernierten fluoreszierenden Proteinen nachgewiesen.



Abb. 16: Analyse der Expression fluoreszierender Proteine nach Sezernierung von stabil transfizierten CHO-K1-Zellen mittels SDS-PAGE und Western Blot. Konditionierte Zellkulturüberstände von stabil transfizierten CHO-K1-Zellen wurden gewonnen und mittels Western Blot analysiert. Gleiche Volumina der Zellkulturüberstände (20 μ l/Spur) wurden aufgetragen und die darin enthaltenen fluoreszierenden Proteine mittels α -GFP bzw. α -Flag detektiert. Die Molekulargewichte betragen 29 kDa für GFP, 27 kDa für mCherry, 55 kDa für GFP-mCherry, 82 kDa für 2xGFP-mCherry und 84 kDa für 3xGFP. *Hier handelt es sich am ehesten um ein Abbauprodukt.

Um die Ähnlichkeit der synthetischen Liganden zu den natürlichen Zytokinen nachweisen zu können, wurde die Konzentration der GFP:mCherry-Fusionsproteine bestimmt. Die Quantifizierung der fluoreszierenden Proteine erfolgte mittels Fluoreszenzmessung. Vorausgesetzt, dass die Fluoreszenz von GFP und von seinen Varianten positiv mit ihrer Konzentration korreliert (135), wurde rekombinantes (rGFP), dessen Konzentration bekannt war, zur Erstellung einer Standardgerade genutzt. Das rGFP wurde in Zellkulturüberständen gleich behandelter, untransfizierter CHO-K1-Zellen verdünnt, da unter anderem der pH-Wert einen Einfluss auf die Fluoreszenz von GFP nehmen kann (136). Die Ergebnisse der Quantifizierung zeigten, dass die fluoreszierenden Proteine in einer Konzentration von ca. 2-5 µg/ml in den konditionierten Zellkulturüberständen der stabil transfizierten CHO-K1-Zellen vorlagen (Abb. 17). Nach Quantifizierung der fluoreszierenden Proteine wurden diese als synthetische Liganden für die SyCyRs exprimierenden Ba/F3-gp130-Zellen eingesetzt.



Abb. 17: Quantifizierung von GFP und GFP:mCherry-Fusionsproteinen in Zellkulturüberständen. Die konditionierten Zellkulturüberstände der stabil transfizierten CHO-K1-Zellen, die die Fluoreszenzproteine exprimieren, wurden mittels Fluoreszenzmessung mit einer Exzitation bei 483 nm und einer Emission bei 535 nm quantifiziert. Rekombinantes GFP (rGFP) wurde zur Erstellung einer Standardgerade genutzt. Das rGFP wurde in Konzentrationen von 10 bis 0,3 μ g/ml in Zellkulturüberstand gleich behandelter, untransfizierter CHO-K1-Zellen verdünnt. Alle Fluoreszenzwerte wurden in Duplikaten gemessen und durch Subtraktion der Werte der Zellkulturüberstände untransfizierter CHO-K1-Zellen normiert. Wiedergabe der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature (124), <u>http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</u>.

3.3 Analyse der IL-23-SyCyR-Aktivität

3.3.1 GFP:mCherry-Fusionsproteine führen zur Proliferation der Ba/F3-SyCyR(IL-23)- und Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen

Da die Aktivierung von STAT3 ein Kennzeichen der IL-23 Signaltransduktion ist (29), wurde die STAT3-abhängige Proliferation der in dieser Arbeit erzeugten Ba/F3-gp130-Zelllinien analysiert. Dazu wurden Ba/F3-SyCyR(IL-23)-, Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-, Ba/F3-G_{VHH}-IL-12Rβ1- und Ba/F3-C_{VHH}-IL-23R-Zellen jeweils mit monomerem GFP, monomerem mCherry und GFP:mCherry-Fusionsproteinen stimuliert und die Proliferation mittels Zellviabilitätsassay (vgl. Abschnitt 2.3.4) untersucht. Die Stimulation mit dem diente Designer-Zytokin Hyper-IL-6 als Positivkontrolle der durchgeführten Zellviabilitätsassays, da Hyper-IL-6 in jedem Fall zur Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen führt (137). Hyper-IL-6 ist ein 60 kDa großes Fusionsprotein, das aus dem löslichen Interleukin-6 Rezeptor, einem Peptid-Linker und IL-6 besteht (138). Durch die direkte Interaktion mit gp130 aktiviert Hyper-IL-6 die IL-6 Signaltransduktion, was als trans*signaling* bezeichnet wird (139). Ba/F3-gp130-Zellen, die keine SyCyRs exprimierten, wurden ebenfalls mit den synthetischen Liganden stimuliert und als Negativkontrolle verwendet, um eine von den SyCyRs unabhängige Induktion der Proliferation durch fluoreszierende Proteine auszuschließen. Eine konstitutive Aktivität der SyCyRs durch Autodimerisierung sollte ausgeschlossen werden, indem SyCyRs exprimierende Ba/F3-gp130-Zellen ohne Zytokinstimulation parallel untersucht wurden (Abb. 18).



Abb. 18: Proliferation von SyCyRs exprimierenden Ba/F3-gp130-Zellen nach Stimulation mit synthetischen Liganden. A Die angegebenen Ba/F3-gp130-Zelllinien wurden mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 (HIL-6) oder 6,25 ng/ml Fluoreszenzproteinen stimuliert. Die Gabe vom nicht quantifizierten monomeren mCherry erfolgte mit demselben Volumen wie die vom monomeren GFP (volumenadaptiert mit 0,25% vom Gesamtvolumen). Die Fluoreszenzmessung (Exzitation bei 560 nm und Emission bei 590 nm) war ein Maß für die Proliferation der Ba/F3-gp130-Zelllinien. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus Triplikaten. Ein repräsentatives Experiment von n=3 ist abgebildet. ns, nicht signifikant. ***p \leq 0,001. B Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)- und Ba/F3-gp130-Zellen wurden in Gegenwart von 2xGFP-mCherry in aufsteigenden Konzentrationen (0,1-300 ng/ml) kultiviert. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation bei 560 nm und Emission bei 590 nm) war ein Maß für die Proliferation der Ba/F3-gp130-Zellen wurden in Gegenwart von 2xGFP-mCherry in aufsteigenden Konzentrationen (0,1-300 ng/ml) kultiviert. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation bei 560 nm und Emission bei 590 nm) war ein Maß für die Proliferation der Ba/F3-gp130-Zelllinien. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus Triplikaten. Ein repräsentatives Experiment von n=3 ist abgebildet. Wiedergabe der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature (124), http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

Interessanterweise induzierte nur die spezifische Stimulation mit GFP-mCherry oder 2xGFP-mCherry eine Proliferation von Ba/F3-SyCyR(IL-23)- und Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen. Ferner gelang es weder monomerem GFP noch monomerem mCherry, eine Proliferation von Ba/F3-SyCyR(IL-23)- und Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen zu induzieren. Ba/F3-gp130-Zellen, die nur den G_{VHH}-IL-12Rβ1 oder nur den C_{VHH}-IL-23R exprimierten, zeigten keinerlei GFP:mCherry-abhängige Proliferation. Diese Ergebnisse demonstrieren die hohe Selektivität und Spezifität des SyCyR-Systems, da eine zytokinabhängige Proliferation faktisch nur zustande kam, wenn die Zellen beide SyCyRs trugen und die **SyCyRs** durch ein GFP:mCherry-Fusionsprotein heterodimerisierten. Eine Autodimerisierung der SyCyRs konnte ausgeschlossen werden, da es ohne Zytokinstimulation zu keiner Proliferation von Ba/F3-SyCyR(IL-23)- und Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen kam. Die Stimulation mit Hyper-IL-6 führte regelhaft zur Proliferation aller Ba/F3-gp130-Zelllinien, wohingegen die fluoreszierenden Proteine auf Ba/F3-gp130-Zellen ohne SyCyR-Expression keine Wirkung zeigten.

Ergänzend wurde das dosisabhängige Proliferationsverhalten der Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von 2xGFP-mCherry untersucht. Ba/F3-gp130-Zellen, die keine SyCyRs exprimierten, dienten erneut als Negativkontrolle. Eine Proliferation war schon bei ca. 500 pg/ml zu beobachten, eine Sättigung trat erst bei ca. 100 ng/ml ein. Eine halbmaximale Proliferationsrate wurde mit einer Konzentration von ca. 1-2 ng/ml erreicht, was die hohe Wirksamkeit und die Vergleichbarkeit der synthetischen Liganden mit natürlich vorkommenden Zytokinen widerspiegelt.

3.3.2 SyCyR(IL-23) und SyCyR(IL-23/2A) aktivieren die JAK/STAT-, MAPK/ERK1/2- und PI3K/AKT-Signalwege

Da die IL-23 Signaltransduktion vor allem durch die intrazelluläre Aktivierung der JAK/STAT-, MAPK/ERK1/2- und PI3K/AKT-Signalwege gekennzeichnet ist (29), kann die Aktivierung der IL-23 Signaltransduktion über die Phosphorylierung der Signalproteine STAT3, ERK1/2 und AKT in Ba/F3-gp130-Zelllinien analysiert werden. Dazu wurden im Rahmen von Stimulationsassays (vgl. Abschnitt 2.3.5) Ba/F3-SyCyR(IL-23)-, Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-, Ba/F3-GvHH-IL-12Rβ1- und Ba/F3-CvHH-IL-23R-Zellen mit monomerem GFP, monomerem mCherry und GFP:mCherry-Fusionsproteinen stimuliert und die Phosphorylierung der Signalproteine mittels SDS-PAGE und Western Blot (vgl. Abschnitt 2.4.2) untersucht. Die Stimulation mit Hyper-IL-6 diente als Positivkontrolle der

durchgeführten Stimulationsassays, da Hyper-IL-6 in jedem Fall zur Phosphorylierung von STAT3, ERK1/2 und AKT in jeder Ba/F3-gp130-Zelllinie führt (140). Ba/F3-gp130-Zellen, die keine SyCyRs exprimierten, wurden ebenfalls mit den synthetischen Liganden stimuliert und als Negativkontrolle verwendet, um eine von den SyCyRs unabhängige Induktion der Phosphorylierung von Signalproteinen durch fluoreszierende Proteine auszuschließen (Abb. 19).



Abb. 19: Phosphorylierung von STAT3, ERK1/2 und AKT in Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen nach Stimulation mit synthetischen Liganden. Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)- und Ba/F3-gp130-Zellen wurden mit 100 ng/ml der angegebenen synthetischen Liganden oder Hyper-IL-6 (10 ng/ml) für 30 min stimuliert. Die Gabe vom nicht quantifizierten monomeren mCherry erfolgte mit demselben Volumen wie die vom monomeren GFP (volumenadaptiert mit 2% vom Gesamtvolumen). Auf die Herstellung der Zelllysate folgte die Analyse mittels Western Blot. Gleiche Mengen an gesamtem Protein (50 µg/Spur) wurden aufgetragen und die Signalproteine mittels Antikörper gegen phospho-STAT3/ERK1/2/AKT und STAT3/ERK1/2/AKT detektiert. Ein repräsentatives Experiment von n=3 ist abgebildet. Wiedergabe der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature (124), <u>http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</u>.

Vereinbar mit den Ergebnissen aus der Proliferationsanalyse induzierte nur die spezifische Stimulation mit GFP-mCherry oder 2xGFP-mCherry eine Phosphorylierung von STAT3, ERK1/2 und AKT in Ba/F3-SyCyR(IL-23)- und Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen. Ferner gelang es weder monomerem GFP, monomerem mCherry noch 3xGFP, eine Phosphorylierung von Signalproteinen in Ba/F3-SyCyR(IL-23)- und Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen zu induzieren. Ba/F3-gp130-Zellen, die nur den GvHH-IL-12Rβ1 oder nur den CvHH-IL-23R exprimierten, zeigten keine GFP:mCherry-abhängige Phosphorylierung von STAT3, ERK1/2 und AKT. Analog zum Proliferationsverhalten kam eine Aktivierung der JAK/STAT-, MAPK/ERK1/2- und PI3K/AKT-Signalwege faktisch nur zustande, wenn die Zellen beide SyCyRs trugen und die SyCyRs durch GFP:mCherry-Fusionsproteine heterodimerisierten. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass SyCyRs die klassische IL-23 Signaltransduktion vollständig und spezifisch phänokopieren. Eine Autodimerisierung der

SyCyRs konnte ausgeschlossen werden, da es ohne Zytokinstimulation zu keiner Aktivierung der IL-23 Signaltransduktion in Ba/F3-SyCyR(IL-23)- und Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen kam. Die Stimulation mit Hyper-IL-6 führte regelhaft zur Phosphorylierung von STAT3, ERK1/2 und AKT in Ba/F3-gp130-Zellen ohne SyCyR-Expression.

3.4 Analyse der IL-23R-SyCyR-Homodimere

Neben der Möglichkeit, die klassische IL-23 Signaltransduktion mittels SyCyRs zu untersuchen, stellte sich die Frage, ob auch andere, unkonventionelle Rezeptorkombinationen mit dem SyCyR-System analysiert werden konnten. Dazu boten sich IL-23R-Homodimere an, deren biologische Aktivität bereits vor Beginn dieser Arbeit nachgewiesen wurde (19, 23). Zu diesem Zweck wurde der IL-23R mit einem extrazellulär liegenden GVHH fusioniert (GVHH-IL-23R, SyCyR[IL-23R]), dass die beabsichtigte Homodimerisierung mit einem homodimeren GFP-Fusionsprotein induziert werden konnte (Abb. 20). Die biologische Aktivität von IL-23R-SyCyR-Homodimeren wurde parallel zu SyCyR(IL-23) (vgl. Abschnitte 3.3.1, 3.3.2) in Ba/F3-gp130-Zellen analysiert. Dazu wurden bereits vor Beginn dieser Arbeit Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen generiert (vgl. Abschnitt 3.1.5) (125). Die Produktion der homomeren GFP-Fusionsproteine erfolgte in CHO-K1-Zellen, die in dieser Arbeit stabil transfiziert wurden (vgl. Abschnitt 3.2).



Abb. 20: Schematische Darstellung der IL-23R-SyCyRs. Der größte Teil der ligandenbindenden, extrazellulären Domänen (ECD) des IL-23R wurde entfernt und durch GFP-bindende *nanobodies* (G_{VHH}) ersetzt werden. Dazu wurde der G_{VHH} an 17 Aminosäuren (AS) der ECD, die transmembranäre (TMD) und intrazelluläre (ICD) Domänen des IL-23R fusioniert (G_{VHH} -IL-23R). Durch Bindung eines homodimeren GFP-Fusionsprotein (GFP-GFP) wird eine Rezeptor-Homodimerisierung und konsekutive Signaltransduktion via JAK2 ausgelöst. Auf diese Weise kann ein IL-23-ähnlicher Signalweg mittels IL-23R-SyCyRs phänokopiert werden (SyCyR[IL-23R]). Modifiziert nach Engelowski *et al.* 2018 (124).

Die für den G_{VHH}-IL-23R kodierende cDNA wurde durch Fusion der Sequenzen für das humane IL-11R-Signalpeptid (Q14626, AS 1-24), gefolgt von den Sequenzen für den myc*tag* (EQKLISEEDL), den GFP-*nanobody* (G_{VHH}) (94) und den murinen IL-23R (Il23r, Q8K4B4), bestehend aus den Aminosäuren A358 bis K644 mit 17 AS der extrazellulären und den gesamten transmembranären und intrazellulären Domänen des Rezeptors, generiert (Abb. 21). Durch Integration in den Vektor pcDNA3.1 entstand der Expressionsvektor pcDNA3.1-G_{VHH}-IL-23R, der die für den G_{VHH}-IL-23R kodierende cDNA enthält und als Vorlage für die Konstruktion der IL-23-SyCyRs diente (vgl. Abschnitte 3.1.1, 3.1.2).



Abb. 21: Expressionskassette des SyCyR(IL-23R). Die Expressionskassette des SyCyR(IL-23R) besteht aus den Sequenzen für das IL-11R-Signalpeptid (SP), den myc-*tag*, den GFP-*nanobody* (G_{VHH}) und den murinen IL-23R (Q8K4B4), bestehend aus den Aminosäuren A358 bis K644 mit 17 AS der extrazellulären und den gesamten transmembranären und intrazellulären Domänen des Rezeptors. Modifiziert nach Engelowski *et al.* 2018 (124).

3.4.1 Homodimere GFP-Fusionsproteine führen zur Proliferation von Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen

Da vermutet werden kann, dass bei biologischer Aktivität die IL-23R-SyCyR-Homodimerisierung am ehesten eine IL-23-ähnliche Signaltransduktion auslöst, wurde zunächst das STAT3-abhängige Proliferationsverhalten analysiert. Hier wurden nun Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen mit den synthetischen Liganden stimuliert und das Proliferationsverhalten mittels Zellviabilitätsassay (vgl. Abschnitt 2.3.4) untersucht. Die Stimulation mit Hyper-IL-6 diente erneut als Positivkontrolle der durchgeführten Zellviabilitätsassays, während Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen ohne Zytokinstimulation zum Ausschluss einer konstitutiven Aktivität infolge IL-23R-SyCyR-Autodimerisierung dienten (Abb. 22).



Abb. 22: Proliferation von Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen nach Stimulation mit synthetischen Liganden (A) und dosisabhängige Proliferation von Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen nach Stimulation mit 2xGFP-mCherry (B). A Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen wurden mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 (HIL-6) oder 6,25 ng/ml GFP:mCherry-Fusionsproteinen stimuliert. Die Gabe vom nicht quantifizierten monomeren mCherry erfolgte mit demselben Volumen wie die vom monomeren GFP (volumenadaptiert mit 0,25% vom Gesamtvolumen). Die Fluoreszenzmessung (Exzitation bei 560 nm und Emission bei 590 nm) war ein Maß für die Proliferation der Ba/F3-gp130-Zelllinien. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus Triplikaten. Ein repräsentatives Experiment von n=3 ist abgebildet. ns, nicht signifikant. *** $p \le 0,001$. B Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen wurden in Gegenwart von 2xGFP-mCherry in aufsteigenden Konzentrationen (0,1-300 ng/ml) kultiviert. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation bei 560 nm und Emission bei 590 nm) war ein Maß für die Proliferation der Ba/F3-gp130-Zelllinien. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus Triplikaten. Ein repräsentatives Experiment von n=3 ist abgebildet. ns, nicht signifikant. *** $p \le 0,001$. B Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen wurden in Gegenwart von 2xGFP-mCherry in aufsteigenden Konzentrationen (0,1-300 ng/ml) kultiviert. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation bei 560 nm und Emission bei 590 nm) war ein Maß für die Proliferation der Ba/F3-gp130-Zelllinien. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus Triplikaten. Ein repräsentatives Experiment von n=3 ist abgebildet. Wiedergabe der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature (124), http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

Erwartungsgemäß induzierte nur die spezifische Stimulation mit 2xGFP-mCherry und 3xGFP eine Proliferation von Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen, während weder das monomere mCherry noch das heterodimere GFP-mCherry eine Proliferation auslösen konnten. Demzufolge wurde der G_{VHH}-IL-23R spezifisch von GFP gebunden und löste erst bei Homodimerisierung ein Signal aus. Ferner war auch das monomere GFP nicht in der Lage, eine Proliferation von Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen zu induzieren. Die in dieser Arbeit

verwendete A206K-Variante von GFP bildet also wie erwartet keine Di- oder Multimere, welche eine unkontrollierte Stimulation verursachen würden (92). Eine Autodimerisierung der IL-23R-SyCyRs konnte ausgeschlossen werden, da es ohne Zytokinstimulation zu keiner Proliferation von Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen kam. Die Stimulation mit Hyper-IL-6 führte regelhaft zur Proliferation der Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zelllinie.

In der ergänzenden Untersuchung des dosisabhängigen Proliferationsverhalten der Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von 2xGFP-mCherry war eine Proliferation schon bei ca. 500 pg/ml zu beobachten, eine Sättigung trat erst bei ca. 100 ng/ml ein. Analog zu den Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen wurde eine halbmaximale Proliferationsrate bei ca. 1-2 ng/ml erreicht, was die hohe Wirksamkeit sowohl der synthetischen Liganden als auch der IL-23R-Homodimere widerspiegelt.

3.4.2 SyCyR(IL-23R)-Homodimerisierung aktiviert die JAK/STAT-, MAPK/ERK1/2- und PI3K/AKT-Signalwege

Falls die IL-23R-SyCyR-Homodimerisierung eine IL-23-ähnliche Signaltransduktion induziert, sollte es nach Aktivierung von SyCyR(IL-23R) durch homomere GFP-Fusionsproteine zur Phosphorylierung von STAT3, ERK1/2 und AKT kommen. Dazu wurden im Rahmen von Stimulationsassays (vgl. Abschnitt 2.3.5) Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen mit monomerem GFP, 2xGFP-mCherry und 3xGFP stimuliert und die Phosphorylierung der Signalproteine mittels SDS-PAGE und Western Blot (vgl. Abschnitt 2.4.2) untersucht. Zum Ausschluss einer konstitutiven Aktivität infolge IL-23R-SyCyR-Autodimerisierung wurden Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen ohne Zytokinstimulation verwendet (Abb. 23).



Abb. 23: Phosphorylierung von STAT3, ERK1/2 und AKT in Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen nach Stimulation mit synthetischen Liganden. Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen wurden mit 100 ng/ml der angegebenen synthetischen Liganden oder Hyper-IL-6 (10 ng/ml) für 30 min stimuliert. Die Gabe vom nicht quantifizierten monomeren mCherry erfolgte mit demselben Volumen wie die vom monomeren GFP (volumenadaptiert mit 2% vom Gesamtvolumen). Auf die Herstellung der Zelllysate folgte die Analyse mittels Western Blot. Gleiche Mengen an gesamtem Protein (50 μ g/Spur) wurden aufgetragen und die Signalproteine mittels Antikörper gegen phospho-STAT3/ERK1/2/AKT und STAT3/ERK1/2/AKT detektiert. Ein repräsentatives Experiment von n=3 ist abgebildet. Wiedergabe der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature (124), http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

Analog zum Proliferationsverhalten kam es zur Phosphorylierung von STAT3, ERK1/2 und AKT, nachdem Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen mit 2xGFP-mCherry und 3xGFP, jedoch nicht mit monomerem GFP oder heterodimerem GFP-mCherry stimuliert wurden. Ohne Zytokinstimulation konnte keine Phosphorylierung von Signalproteinen in Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen beobachtet werden, sodass eine GFP-unabhängige Aktivität von SyCyR(IL-23R)-Homodimeren ausgeschlossen werden konnte. Interessanterweise wurden nicht nur der JAK/STAT-, sondern ebenso die MAPK/ERK1/2- und PI3K/AKT-Signalwege aktiviert, was eine der IL-23 Signaltransduktion ähnlichen Aktivität der IL-23R-Homodimere zeigt.

4 Diskussion

4.1 Synthetische Zytokinrezeptoren sind biologisch aktiv

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte neuartige synthetische Zytokinrezeptor- (SyCyR) System basiert auf GFP- und mCherry-bindende *nanobodies* (G_{VHH}, C_{VHH}), welche an deletierte Zytokinrezeptoren fusioniert wurden. Andere Arbeitsgruppen fusionierten bereits einen G_{VHH} an den Notch-Rezeptor, um Zellen mittels membrangebundenem GFP via Zell-Zell-Kontakt spezifisch zu aktivieren (141, 142). SyCyRs werden ohne die Notwendigkeit von Zell-Zell-Kontakten durch Stimulation mit löslichen GFP:mCherry-Fusionsproteinen aktiviert, da die *nanobodies* spezifisch ihr entsprechendes fluoreszierendes Protein und keine endogenen Liganden binden (94, 95). Fluoreszierende Proteine wurden als synthetische Liganden zur Induktion einer Zytokinsignaltransduktion gewählt, weil sie im Allgemeinen als nicht-toxisch auf Säugetiere gelten und keine endogenen Rezeptoren binden (143, 144). Die *nanobodies* selbst sind nicht immunogen, da sie aufgrund des fehlenden Fc-Fragments im Gegensatz zu klassischen Antikörpern nicht von Komplementfaktoren gebunden werden und folglich nicht zytotoxisch wirken (145). Das SyCyR-System wurde daher als weitestgehend nebenwirkungs- und hintergrundfrei definiert.

Als Modell zur Untersuchung der biologischen Aktivität von SyCyRs diente für diese Arbeit der IL-23 Rezeptorkomplex, der aus dem IL-12Rβ1 und dem IL-23R besteht (20). Durch die Bindung von IL-23 nähern sich die Rezeptoren an und es entsteht ein Signalkomplex aus zwei Januskinasen, die sich durch reziproke Phosphorylierung gegenseitig aktivieren, um Signalproteine wie STAT, ERK und AKT zu aktivieren (29, 146).

4.1.1 SyCyRs phänokopieren spezifisch, hintergrundfrei und schaltbar die IL-23 Signaltransduktion

Zur Phänokopie der IL-23 Signaltransduktion wurde der IL-23 Rezeptorkomplex molekularbiologisch verändert, indem der IL-12R β 1 mit einem G_{VHH} (G_{VHH}-IL-12R β 1) und der IL-23R mit einem C_{VHH} (C_{VHH}-IL-23R) fusioniert wurden. Der synthetische Zytokinrezeptor-Komplex, der sich aus diesen beiden SyCyRs zusammensetzt, wurde als SyCyR(IL-23) oder im Falle der Expression aus einem einzelnen offenen Leseraster als SyCyR(IL-23/2A) bezeichnet. Die für die SyCyRs kodierenden cDNAs wurden erfolgreich in die Expressionsvektoren pcDNA3.1, pMOWS-puro und pMOWS-hygro für die stabile Transfektion von CHO-K1-Zellen bzw. retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen kloniert. In früheren Studien der Arbeitsgruppe, in der diese Arbeit entstanden ist, waren diese Expressionsvektoren bereits mehrfach eingesetzt worden (19, 22, 24). Die Expression der SyCyRs in den generierten Ba/F3-gp130-Zellen wurde mittels Western-Blot-Analyse und Durchflusszytometrie verifiziert. Um jene Zellen zu stimulieren, wurden CHO-K1-Zellen zur Herstellung von GFP:mCherry-Fusionsproteinen verwendet. Wenige Arbeitsgruppen berichten von gescheiterten Versuchen, Zelllinien mit für GFP kodierender cDNA stabil zu transfizieren, und diskutierten toxische, Apoptose-induzierende Eigenschaften von GFP (147, 148). Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da die stabile Transfektion von CHO-K1-Zellen mit allen GFP:mCherry-Varianten problemlos funktionierte und die erzeugten CHO-K1-Zellen die fluoreszierenden Proteine in hohen Konzentrationen sezernierten. Möglicherweise reagieren verschiedene Zelllinien unterschiedlich auf die fluoreszierenden Proteine, wobei in den meisten bekannten transgenen Organismen GFP auch über längere Zeit keine toxische Wirkung zeigte (149). In einer anderen Studie wirkte GFP jedoch bei sehr hohen Dosen zytotoxisch (147).

Durch die spezifische Aktivierung der SyCyRs mit heterodi- und -trimeren GFP:mCherry-Fusionsproteinen wurde die IL-23 Signaltransduktion phänokopiert. Ba/F3gp130-Zellen, die SyCyR(IL-23) oder SyCyR(IL-23/2A) exprimierten (Ba/F3-SyCyR[IL-23], Ba/F3-SyCyR[IL-23/2A]), proliferierten nach Stimulation mit GFP-mCherry und 2xGFP-mCherry, aber nicht monomeren oder homotrimeren GFP:mCherry-Varianten. natürlichen IL-23 Signaltransduktion waren die Expression und Analog zur ligandenabhängige Heterodimerisierung beider Rezeptoren in den Zellen für die Induktion eines Signals notwendig. Außerdem bestätigen diese Ergebnisse, dass der C_{VHH} spezifisch nur sein entsprechendes fluoreszierendes Protein bindet, da 3xGFP keine Proliferation von (95). Ba/F3-SyCyR(IL-23)oder Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen induzierte In weitergehenden Untersuchungen ist gezeigt worden, dass die konzentrationsabhängige Proliferation von SyCyRs exprimierenden Ba/F3-gp130-Zellen vergleichbar war mit Ba/F3gp130-Zellen, die den murinen IL-23 Rezeptorkomplex exprimierten (Ba/F3-mIL-12RB1mIL-23R) und mit Hyper-IL-23 stimuliert wurden (24, 124). Hyper-IL-23 ist ein 56 kDa großes Fusionsprotein, das aus den Untereinheiten p19 und p40 besteht, die über einen Peptid-Linker verbunden sind (18). Diese Ergebnisse demonstrierten die vergleichbare Wirksamkeit der synthetischen Liganden mit IL-23. Ebenso kam es zu keiner GFP:mCherryabhängigen Proliferation von nativen Ba/F3-gp130-Zellen, was die angenommene fehlende Hintergrundaktivität der fluoreszierenden Proteine bestätigte. Dies ist ein Vorteil gegenüber den bisherigen chimären IL-12/IL-23 Rezeptorvarianten, deren Einsatz in vitro und in vivo aufgrund der Kreuzreaktivität physiologisch vorkommender Liganden wie IL-12 oder EGF limitiert ist (6, 150).

Grundsätzlich sind Zytokinrezeptoren bei Anwesenheit von Zytokinen aktiv und bei Abwesenheit von Zytokinen ausgeschaltet. Das Ausschalten von Zytokinrezeptoren kann zusätzlich über negative Rückkopplung oder Zytokin:Zytokinrezeptor-Depletion geschehen (151, 152). SyCyRs lassen sich durch Stimulation mit synthetischen Liganden aktivieren. Um SyCyRs wieder auszuschalten, müssen den Zytokinrezeptoren also ihre Liganden entzogen werden. Zu diesem Zweck wurde von Engelowski und Mitarbeitern ein Fusionsprotein konstruiert, welches aus je einem löslichen GFP- und mCherry-bindenden nanobody besteht (GVHH-CVHH) (Abb. 24) (124). Das GVHH-CVHH konkurriert mit den SyCyRs um die Bindung der GFP:mCherry-Fusionsproteine und hemmt die SyCyR-Aktivität somit kompetitiv. In weitergehenden Untersuchungen wurde die Schaltbarkeit des SyCyR-Systems nachgewiesen, indem die GFP:mCherry-abhängige Proliferation von Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen durch Hinzugabe von GVHH-CVHH konzentrationsabhängig gehemmt wurde (124). Bei höheren Konzentrationen von G_{VHH}-C_{VHH} nahm die Aktivität der SyCyRs konstant ab, bis die Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen schließlich bei einem Überschuss von G_{VHH}-C_{VHH} keinerlei Proliferation mehr zeigten. Die SyCyR-Aktivität lässt sich folglich fein justieren und bei Bedarf vollständig abschalten.



Abb. 24: Das Fusionsprotein G_{VHH} - C_{VHH} zur Hemmung der SyCyR-Aktivität. Engelowski und Mitarbeiter kombinierten ein lösliches G_{VHH} mit einem löslichen C_{VHH} zum Fusionsprotein G_{VHH} - C_{VHH} , welches die GFP:mCherry-Fusionsproteine band (124). Die SyCyRs wurden durch den Entzug ihrer synthetischen Liganden ausgeschaltet. Modifiziert nach Engelowski *et al.* 2018 (124).

Entscheidend für den Nachweis einer vollständigen Phänokopie der IL-23 Signaltransduktion war die Untersuchung der IL-23-charakteristischen JAK/STAT-,

MAPK/ERK1/2- und PI3K/AKT-Signalwege in SyCyRs exprimierenden Ba/F3-gp130-Zellen. Analog zum Proliferationsverhalten rief nur die Stimulation mit GFP-mCherry oder 2xGFP-mCherry eine Phosphorylierung der IL-23-charakteristischen Signalproteine STAT3, ERK1/2 und AKT in Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen hervor. In weiterführenden Untersuchungen der AG Scheller wurde zudem die GFP:mCherry-abhängige Phosphorylierung von JAK2 in Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen aufgezeigt und das SyCyR-System erfolgreich auf die humane Fibrosarkom-Zelllinie U4C übertragen (124). Chimäre Rezeptoren, deren extrazelluläre Domänen aus nicht-physiologischen Komponenten bestehen, können mittels nicht-physiologischer Liganden dimerisieren und sind infolgedessen uneingeschränkt dazu fähig, bei unveränderten zytoplasmatischen Domänen eine Signaltransduktion zu induzieren. Allerdings impliziert eine kürzlich veröffentlichte Studie, dass nicht nur die intrazellulären Rezeptoranteile, sondern auch die extrazellulären Modalitäten der Rezeptorkomplexe die Signalstärke bestimmen (153). Eine Punktmutation im EPO veränderte die EpoR-Homodimerisierung in einer Art und Weise, die zu einer reduzierten Aktivierung von STAT1 und STAT3 führte, ohne jedoch die Phosphorylierung von STAT5 zu beeinflussen (153). Eine weitere Studie weist darauf hin, dass Signaltransduktionen zu einem nicht unerheblichen Teil von der Geometrie der homo-/heterodimeren Rezeptorkomplexe bestimmt werden (154). Konsequenterweise evaluierten Engelowski und Mitarbeiter, ob IL-23-SyCyRs tatsächlich ein IL-23-identisches Signal übermitteln oder ob die Modifikation der IL-23 Rezeptorketten das Signal verändert. Die zeitabhängige Aktivierung von unter anderem STAT3 in Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen war vergleichbar mit der in Ba/F3-mIL-12Rβ1-mIL-23R-Zellen (124). Somit kann also von einer ähnlichen Kinetik und Signalstärke der Signaltransduktionen, die durch IL-23 und den synthetische Liganden induziert werden, ausgegangen werden. Erwartungsgemäß wurde das STAT3-Signal auch bei den SyCyRs nicht durch SOCS3 gehemmt (24, 124). Die Analyse der mRNA-Expression zeigte, dass die regulierten Gene, darunter klassische STAT3-Zielgene wie proto-oncogene serine/threonine-protein kinase (PIM), SOCS3 und Oncostatin M (OSM), in Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)- und Ba/F3-mIL-12Rβ1-mIL-23R-Zellen, die mit GFP-mCherry bzw. Hyper-IL-23 stimuliert wurden, nahezu identisch waren (124). Dennoch wurden in Ba/F3-mIL-12Rβ1-mIL-23R-Zellen mehr Gene aktiviert als in Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen, was jedoch zu erwartende Schwankungen waren, da Zelllinien mit unterschiedlichen Rezeptoren transduziert und über längere Zeit unabhängig voneinander selektiert werden (124). Ausschlaggebend war hingegen, dass die SyCyRs grundsätzlich dieselben Signalwege aktivierten wie der IL-23 Rezeptorkomplex (124).

Zusammenfassend zeichneten sich die Transkriptome der natürlichen und synthetischen Signaltransduktionen durch ein hohes Maß an Überlappung aus, sodass die SyCyRs mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit die IL-23 Signaltransduktion vollständig phänokopieren konnten (124). Dies ist ein weiterer Vorteil des SyCyR-Systems gegenüber den bisherigen chimären IL-12/IL-23 Rezeptorvarianten, bei denen die extrazelluläre Domäne die Signalstärke veränderte (6).

Die in dieser Arbeit entwickelten SyCyRs sind die ersten chimären Rezeptorkomplexe, deren Signaltransduktion und Expressionsprofil detailliert untersucht worden sind (124). In Zukunft bieten synthetische Rezeptorsysteme breite Einsatzmöglichkeiten, unter anderem könnte das SyCyR-System auf weitere Zytokin-Signalwege übertragen werden (78). Überdies könnten neue Zytokine wie das von Floss und Mitarbeiter postulierte IL-Z2, welches über WSX-1 und IL-23R ein Signal übermitteln könnte, mittels SyCyRs nachgewiesen werden (6).

4.1.2 Aktivität von IL-6-SyCyRs in vivo

In weitergehenden Untersuchungen wurde das SyCyR-System auf den IL-6-Signalweg übertragen, indem die extrazelluläre Domäne durch ein GVHH ersetzt wurde (GVHH-gp130, SyCyR[IL-6]) (124). IL-6 bindet an den nicht-signalgebenden IL-6R, wodurch ein Rezeptorkomplex mit zwei signalgebenden gp130-Rezeptorketten entsteht (7). Die Homodimerisierung von gp130 induziert schließlich die Signaltransduktion via STAT, ERK1/2 und AKT (140). In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene synthetische gp130-Varianten entwickelt. Der Austausch von 15 AS der ECD von gp130 durch ein Leucin-Zipperpeptid sowie die Deletion von FNIII-Domänen und Verkürzung der stalkeine prolongierte Region des gp130 forcierten STAT3-Aktivierung durch ligandenunabhängige Homodimerisierung (155, 156). Die Stimulation von Ba/F3-gp130-Zellen, die SyCyR(IL-6) exprimierten, mit homodimeren GFP-Fusionsproteinen führte zu ähnlich deutlichen Resultaten, wie die in dieser Arbeit analysierte Phänokopie der IL-23 Signaltransduktion (124). Interessanterweise wurde SyCyR(IL-6) anders als die Leucin-Zipperpeptid-Varianten oder die IL-23-SyCyRs von SOCS3 gehemmt, was auch dem Verhalten des natürlichen IL-6-Signalwegs entspricht (124, 157). Die SyCyRs waren in der Lage, die IL-6 Signaltransduktion ebenfalls vollständig zu phänokopieren und sind demzufolge prinzipiell auf jeden Zytokinsignalweg übertragbar.

In entzündlichen hepatozellulären Adenomen wurde eine natürliche *gain-offunction*-Mutation im gp130 entdeckt, die ebenfalls zur dauerhaften Aktivierung von STAT3

60

führte (158). Daher lag es nahe, die *in vivo*-Aktivität der SyCyRs in der Leber von Mäusen zu testen. Nur die kombinierte hydrodynamische Schwanzveneninjektion beider cDNAs, die für G_{VHH}-gp130 und 3xGFP kodieren, rief eine erhöhte mRNA-Expression des IL-6-charakteristischen Akute-Phase-Proteins Serumamyloid A1 (SAA1) in Mäuselebern hervor, wohingegen die Injektion nur einer der beiden cDNAs keine erhöhte mRNA-Expression von SAA1 verursachte (124, 159, 160). Zudem kam es nur bei der hydrodynamischen Injektion von einer der beiden cDNAs zur Akkumulation von G_{VHH}-gp130 und 3xGFP in der Leber bzw. im Serum, sodass von einer internalisierenden Degradation des synthetischen Zytokin:Zytokinrezeptor-Komplexes ausgegangen werden kann (124, 161). Die Mäuse wiesen überdies keinerlei Symptome wie beispielsweise Fieber auf, die normalerweise bei systemischer Injektion von IL-6 auftreten, weil SyCyR(IL-6) nur in Hepatozyten aktiviert wurde (124, 162). Folglich könnten die in dieser Arbeit konstruierten SyCyRs in Zukunft ein wertvolles Werkzeug sein, um die zelltypspezifische Aktivierung in transgenen Mäusen zu analysieren.

4.2 Die Übertragung des SyCyR-Systems auf unkonventionelle, multimere Rezeptorkomplexe

Einige Arbeitsgruppen beschreiben heterodimere synthetische Liganden, die natürliche Zytokine ersetzen. Janda und Mitarbeiter entwickelten einen leicht zu reinigenden, hydrophilen Wnt-Agonisten, der die Wnt-Signaltransduktion phänokopiert (163). Ein großer Vorteil des synthetischen Wnt-Agonisten ist, dass er die Rekrutierung spezifischer Wnt-Rezeptoren (frizzled, FZD) und somit eine exakte Aussage über die biologische Funktion von Wnt- und FZD-Subtypen erlaubt (163, 164). Dadurch konnte nachfolgend gezeigt werden, dass Wnt nicht direkt, sondern über erhöhte R-Spondin-Liganden- (RSPO) Rezeptorexpression die Stammzellselbsterneuerung im Darmepithel induziert (164). Moraga und Mitarbeiter verfolgten den Ansatz, physiologische Zytokinbestandteile als Einheiten von synthetischen, zytokinähnlichen Fusionsproteinen (synthekines) zu nutzen (165). Durch die Bindung eines synthekines, welches sich aus den dominant-negativen Untereinheiten von IL-4 und IL-2 zusammensetzte, entstand ein biologisch aktiver, unkonventioneller Rezeptorkomplex bestehend aus IL-2R β und IL-4R α (165). Vereinbar mit den dargelegten Studien demonstrierten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der heterodimere synthetische Ligand GFP-mCherry eine Rezeptoraktivierung induziert und folglich zytokinähnlich agiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere homo- und heterotrimere GFP:mCherry-Fusionsproteine in CHO-K1-Zellen produziert, um
gleichermaßen eine exakte Aussage über die rekrutierten Rezeptoren machen zu können und unkonventionelle, multimere Rezeptorkomplexe mittels SyCyRs zu analysieren.

4.2.1 IL-23R-SyCyR-Homodimere induzieren eine IL-23-ähnliche Signaltransduktion

Bislang wurde dem IL-12Rβ1 bis auf die Aktivierung einer Januskinase noch keine essentielle Bedeutung in der IL-23 Signaltransduktion zugewiesen (22). Da nur der IL-23R die für die Signalproteine entscheidenden Tyrosinreste innerhalb seiner zytoplasmatischen Domäne besitzt, konnte die Aktivität von IL-23R-Homodimeren vermutet werden (20). Schon 2013 beobachtete eine Arbeitsgruppe eine vom IL-12Rβ1 unabhängige STAT3-Aktivierung in Lungenkrebszellen infolge Stimulation mit IL-23 (76). Schröder und Mitarbeiter konnten trotz Ausschaltung der Bindung von p40 an IL-12Rβ1 die Proliferation von Zellen nicht verhindern (19). Inzwischen wurde durch die synthetische Modifikation des IL-23R die Aktivität von IL-23R-Homodimeren schließlich nachgewiesen (23). Mit Hilfe der SyCyRs wurde in dieser Arbeit untersucht, ob IL-23R-Homodimere eine IL-23identische oder zumindest IL-23-ähnliche Signaltransduktion auslösen können.

Dazu wurden bereits vor Beginn dieser Arbeit der IL-23R mit einem GVHH fusioniert (G_{VHH}-IL-23R, SyCyR[IL-23R]) und Ba/F3-gp130-Zellen generiert, die den G_{VHH}-IL-23R exprimieren (Ba/F3-SyCyR[IL-23R]) (124). Die Expression des GvHH-IL-23R in Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen wurde in dieser Arbeit mittels Western Blot-Analyse und Durchflusszytometrie verifiziert. Die darauffolgende Stimulation mit dem heterotrimeren 2xGFP-mCherry und dem homotrimeren 3xGFP, die beide aus den stabil transfizierten CHO-K1-Zellen isoliert wurden, führte zur Proliferation von Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen. Demgegenüber kam es zu keiner signalgebenden Homodimerisierung des G_{VHH}-IL-12Rβ1, weil weder Ba/F3-G_{VHH}-IL-12Rβ1-, Ba/F3-SyCyR(IL-23)- noch Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen nach Stimulation mit 2xGFP-mCherry oder 3xGFP proliferierten. Diese Ergebnisse belegt wie eine andere Studie zuvor, dass IL-12RB1 durch die Aktivierung von Januskinasen zwar an der Signaltransduktion beteiligt ist, jedoch keine Signalproteine bindet und aktiviert (22). Russell und Mitarbeiter konnten allerdings zeigen, dass die p80-abhängige Aktivierung von IL-12Rβ1 zu einer chemotaktischen Migration von Makrophagen führte (166). Möglicherweise existieren Signalwege, die über den IL-12R\beta1 induziert werden und bisher noch nicht entdeckt worden sind. Die Proliferationsanalyse bestätigte zudem, dass der GVHH spezifisch nur sein entsprechendes fluoreszierendes Protein bindet, da GFP-mCherry keine SyCyR(IL-23R)-Homodimerisierung induzieren konnte (94). Da das monomere GFP keine Wirkung auf Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen hatte, scheint das in dieser Arbeit in CHO-K1-Zellen produzierte GFP keine willkürlichen Di- oder Oligomere zu bilden. Dies war zu erwarten, da die A206K-Variante von GFP in dieser Arbeit verwendet wurde (92). GFP neigt klassischerweise zur spontanen Di- und Oligomerisierung (167), weshalb beispielsweise Cystein-freie GFP-Varianten entwickelt worden sind (168). Somit erlauben die in dieser Arbeit hergestellten GFP:mCherry-Fusionsproteine eine exakte Bestimmung der Rezeptorstöchiometrie.

Um genau zu determinieren, inwiefern die IL-23R-Homodimerisierung mittels SyCyRs eine IL-23-identische oder IL-23-ähnliche Signaltransduktion induziert, wurden die dosisabhängige Proliferation und die IL-23-charakteristischen Signalwege analysiert. Das Proliferationsverhalten von Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen war vergleichbar mit dem der Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen, da eine halbmaximale Proliferation mit ca. 1-2 ng/ml desselben verwendeten synthetischen Liganden, 2xGFP-mCherry, erreicht wurde. In nachfolgenden Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass die Proliferation von Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen, die mit 3xGFP stimuliert wurden, etwas geringer war als die Proliferation von Ba/F3-mIL-12R\beta1-mIL-23R-Zellen, die mit Hyper-IL-23 stimuliert wurden (124). Diese Unterschiede lassen sich nicht durch die molare Konzentration der Liganden erklären. Analog zum Proliferationsverhalten induzierte nur die Stimulation von Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen mit 2xGFP-mCherry und 3xGFP eine intrazelluläre Phosphorylierung der IL-23-charakteristischen Signalproteine STAT3, ERK1/2 und AKT. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass IL-23R-Homodimere mindestens eine zu IL-23 ähnliche Signaltransduktion hervorrufen. Im Weiteren deckte die zeitabhängige Aktivierung von unter anderem STAT3 in Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen auf, dass wie in Ba/F3-mIL-12Rβ1-mIL-23R-Zellen die STAT3-Aktivierung nicht durch SOCS3 inhibiert wurde, was die Annahme einer IL-23-ähnlichen Signaltransduktion durch IL-23R-Homodimerisierung unterstreicht (124). Konsequenterweise analysierten Engelowski und Mitarbeiter daraufhin die mRNA-Expression von Ba/F3-SyCyR(IL-23R)- mit Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A)-Zellen, die mit 3xGFP bzw. GFP-mCherry stimuliert wurden (124). Zwar wurden klassische STAT3-Zielgene wie PIM, SOCS3 und OSM detektiert, jedoch war insgesamt die Anzahl regulierten Genen in Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen reduziert. Dies könnte an möglicherweise durch die beschriebene schwächere Proliferation von Ba/F3-SyCyR(IL-23R)-Zellen erklärt werden. Nichtsdestotrotz wurden von IL-23R-SyCyRs dieselben Signalwege beeinflusst wie von IL-23-SyCyRs, sodass es zwar quantitative, aber keine qualitativen Unterschiede in der Signaltransduktion gab (124). Zusammenfassend phänokopierte die Homodimerisierung von SyCyR(IL-23R) eine reduzierte, aber dennoch IL-23-charakteristische Signaltransduktion.

Die Rekrutierung von IL-23R-Homodimeren verdeutlicht, dass unkonventionelle Rezeptorkomplexe mittels SyCyRs analysiert werden können. Im Gegensatz zu den chimären EGFR:ELPs-Fusionsproteinen konnten IL-23R-SyCyRs nicht nur kontrollierbar homodimerisieren, sondern darüber hinaus eine Aussage über die Rezeptorstöchiometrie ermöglichen (102). Die *synthekines* von Moraga und Mitarbeiter erlauben zwar ebenso die Erforschung unkonventioneller Rezeptorkomplexe, haben aber den Nachteil, dass die Aktivierung *in vivo* davon abhängt, welche Zellen die benötigten Rezeptoren exprimieren (165). Die durch SyCyRs realisierbaren multimeren Rezeptorkombinationen werden lediglich durch die maximale Summe an GFP:mCherry-Einheiten in den synthetischen Liganden begrenzt. Daher rücken für zukünftige Verbesserungen der SyCyR-Technologie alternative Strategien zur GFP:mCherry-Multimerisierung in den Fokus (169, 170).

4.2.2 SyCyRs weisen Transphosphorylierung von Zytokinrezeptoren nach

Tyrosinkinaserezeptoren und Rezeptoren mit assoziierten Kinasen sind klassischerweise als Dimere aktiv und sorgen bei Dimerisierung für eine Aktivierung von mindestens zwei sich gegenseitig phosphorylierenden Januskinasen (Transphosphorylierung) (21). Natürlich vorkommenden Rezeptoren benötigen grundsätzlich keinen dritten Rezeptor für eine Signaltransduktion. Mit Hilfe der in dieser Arbeit produzierten heterodi- und heterotrimeren GFP:mCherry-Fusionsproteinen analysierten Engelowski und Mitarbeiter, ob auch trimere Rezeptorkomplexe biologisch aktiv sein können (124). Zu diesem Zweck wurde ein intrazellulär gekürzter IL-23R, dem das Bindemotiv für STAT3 fehlt (Δ STAT), mit einem G_{VHH} verknüpft (G_{VHH}-IL-23R-ΔSTAT), während JAK-defiziente IL-23R-Varianten mit einem C_{VHH} verbunden wurden (C_{VHH}-IL-23R-ΔJAK) (Abb. 25) (22, 24, 124). G_{VHH}-IL-23R-ASTAT oder CVHH-IL-23R-AJAK können ohne Bindung von STAT3 bzw. ohne Rekrutierung von mindestens zwei Januskinasen weder als homo- noch als heterodimere Rezeptorkomplexe eine Signaltransduktion auslösen. Die fehlende Phosphorylierung von STAT3 nach Stimulation mit dem heterodimeren GFP-mCherry bekräftigte, dass mindestens zwei Januskinasen für eine hinreichende Signaltransduktion unverzichtbar sind (124). Die Stimulation mit 2xGFP-mCherry hingegen initiierte die Anordnung eines heterotrimeren Rezeptorkomplexes, bei dem die Homodimerisierung vom JAK-suffizienten GVHH-IL-23R-ASTAT zur Aktivierung von Januskinasen führte, welche wiederum die im C_{VHH}-IL-23R-∆JAK vorhandene STAT-Domäne transphosphorylierten (124).

In den bisher existierenden Studien wurde nur die Transphosphorylierung durch Tyrosinkinaserezeptoren der *platelet-derived growth factor*- (PDGF) (171, 172) und EGF-Familien (173, 174) nachgewiesen. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit wurden in weiteren Studien der AG Scheller SyCyRs entwickelt, mit denen erstmals die Transphosphorylierung von Rezeptoren mit assoziierten Januskinasen aufgezeigt werden konnte (124). In Zukunft könnten SyCyRs auf die Untersuchung weiterer trimerer Rezeptorkomplexe, wie z.B. von TNF- α , ausgeweitet werden (175).



Abb. 25: Schematische Darstellung der mittels SyCyRs induzierten STAT3-Transphosphorylierung. Der G_{VHH} wurde an 16 Aminosäuren (AS) der ECD, die transmembranäre (TMD) und intrazelluläre (ICD) Domänen vom IL-23R, dem STAT3-Bindemotive fehlen, fusioniert (G_{VHH} -IL-23R- Δ STAT) (24, 124). Der C_{VHH} wurde an 16 Aminosäuren (AS) der ECD, die transmembranäre (TMD) und intrazelluläre (ICD) Domänen vom IL-23R, dem JAK-Bindemotive fehlen, fusioniert (C_{VHH} -IL-23R- Δ JAK) (22, 124). Durch Bindung eines heterotrimeren GFP:mCherry-Fusionsprotein (2xGFP-mCherry) wird eine Rezeptor-Trimerisierung induziert, bei der die aktivieren JAKs der G_{VHH} -IL-23R- Δ STAT Rezeptorketten die STAT3-Domänen vom C_{VHH} -IL-23R- Δ JAK transphosphorylieren sollen. Modifiziert nach Engelowski *et al.* 2018 (124).

4.3 Neue therapeutische Ansätze zur Optimierung der Immuntherapie und Limitierungen der SyCyRs

Die Tumorregression durch Immuntherapie wird ausschlaggebend vom intrinsischen Leistungsvermögen der T-Zellen bestimmt (176). Ausgelöst durch chronische Antigenstimulation führen bestimmte Transkriptionsfaktoren zu einer ausgeprägten T-Zell-Erschöpfung und -Dysfunktion, was sich in der Hochregulierung inhibitorischer Rezeptoren wie *programmed cell death protein 1* (PD-1) und *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3* (TIM-3) äußert (177). SyCyRs könnten genutzt werden, um dem Verlust der T-Zell-Effektorfunktion vorzubeugen, indem SyCyRs mit stimulatorischen Signaldomänen wie beispielsweise gp130 konstruiert werden (124). Die spezifische Aktivierung von

SyCyRs in CAR-T-Zellen könnte schließlich zur *ex/in vivo*-Expansion und höheren Antitumoraktivität dieser führen (Abb. 26). Da die nicht-physiologischen Liganden ausschließlich die mit SyCyRs ausgestatteten T-Zellen stimulieren, wären die systemischen Nebenwirkungen geringer als bei der Injektion eines physiologischen Zytokins (178). Bisherige Versuche beabsichtigten eine anhaltende, nicht ausschaltbare Steigerung der T-Zell-Aktivität basierend auf konstitutiv-aktiven IL-7 Rezeptoren (179), verbesserten CARs (180), simultaner Sekretion bispezifischer Antikörper (181), APC-abhängigen amphiphilen CAR-T-Zell-Liganden (182) und kostimulatorischen Molekülen wie CD28 (183, 184). Im Gegensatz dazu können SyCyRs bei Bedarf aktiviert und durch Hinzugabe löslicher *nanobodies* deaktiviert werden. Chang und Mitarbeiter entwickelten bereits CAR-T-Zellen, die auf Basis von GFP-*nanobody*:GFP-Interaktion aktiviert werden (185).

Eine überschießende Aktivierung von CAR-T-Zellen hat regelmäßig neurologische Störungen wie Aphasie, Enzephalopathie und Hirnödemen zur Folge (186). Zudem kann es Anti-CD19-CAR-T-Zellen bei durch off-tumor-on-target-Effekte zur Hypogammaglobulinämie infolge von B-Zell-Aplasie kommen (187). Daher werden Strategien zur tumorspezifischeren Wirkung und transienten Ausschaltung von CAR-T-Zellen verfolgt. Eine tumorspezifischere CAR-T-Zell-Wirkung kann beispielsweise mit Notch-basierten oder antigenspezifischen kostimulatorischen Rezeptoren erreicht werden (188, 189). Andere Arbeitsgruppen entwickelten CAR-T-Zellen, die erst bei Hinzugabe eines nicht-physiologischen Peptid-/scFv-Fusionsprotein aktiv werden (190, 191). Mittels SyCyRs könnten übermäßig aktive CAR-T-Zellen transient ausgeschaltet werden, indem SyCyRs mit inhibitorischen Signaldomänen wie PD-1 oder TIM-3 konstruiert werden. Fedorov und Mitarbeiter zeigten bereits, dass inhibitorische iCARs die CAR-T-Zell-Aktivität unter anderem via PD-1 eindämmen können (192). Die iCARs sind jedoch im Gegensatz zu den SyCyRs nicht schaltbar.

Die häufigste und zugleich gefährlichste Komplikation der CAR-T-Zell-Therapie ist das *cytokine release syndrome* (CRS), welches Fieber und in schwerer Form Herz-Kreislauf-Störungen und Multiorganversagen verursacht (193, 194). In solchen Situationen wäre ein notfallmäßiger Selbstmord-Schalter in CAR-T-Zellen eine nützliche Lösung (Abb. 26). Vor Kurzem wurde gezeigt, dass der Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib effektiv die CAR-T-Zellen dosisabhängig supprimiert (195, 196). Problematisch ist hierbei die unspezifische Wirkung von Dasatinib auf physiologische Zellen und die damit einhergehenden Nebenwirkungen (197). Duong und Mitarbeiter entwickelten ein schaltbares Rezeptorsystem, mit dem CAR-T-Zellen durch Hinzugabe des zellpermeablen Moleküls Rapamycin (Sirolimus) via Caspase9-induzierter Apoptose inhibiert werden (198). SyCyRs könnten ebenfalls an Apoptose-induzierende Signaldomänen wie z.B. dem FasR fusioniert werden und bei Anzeichen eines CRS frühzeitig aktiviert werden, um eine Verlegung des Patienten auf die Intensivstation oder einen tödlichen Verlauf abzuwenden (199). Im Gegensatz zum Sirolimus-basierten System von Duong und Mitarbeitern würden die nicht-physiologischen Liganden des SyCyR-Systems aufgrund ihrer fehlenden Hintergrundaktivität keine unspezifische Immunsuppression hervorrufen (200).

Eine Alternative zu CAR-T-Zellen stellt die gentechnologische Modifizierung von endogenen tumorspezifischen T-Zellen dar, bei denen das zu erkennende Tumorantigen vorher nicht bekannt sein muss (Abb. 26). Nach Immuncheckpoint-Blockade finden sich mehr T-Zellen mit tumorerkennenden TCR, die anschließend mit SyCyRs ausgestattet werden könnten (201). Eine Herausforderung stellt hierbei die Integration der SyCyR-cDNA in das T-Zell-Genom dar, die bei retroviralem Gentransfer zufällig geschieht. Mit neuen Methoden wie *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*/CRISPR*associated* 9 (CRISPR/Cas9) könnten SyCyRs in das T-Zell-Genom ohne Interferenz mit dem endogenen TCR-*Locus* eingefügt werden (202).

Eine zu überwindende Limitierung des hier beschriebenen SyCyR-Systems in vivo stellt die eventuelle immunogene Wirkung der synthetischen Liganden im menschlichen Körper dar, der bei wiederholter Applikation von fluoreszierenden Proteinen Antikörper gegen diese bildet (203). Zudem finden sich einige Hinweise darauf, dass fluoreszierende Proteine wie GFP und mCherry möglicherweise doch toxische Wirkungen auf menschliche Epithel- und T-Zellen haben (204, 205). Diese Nachteile würden zum einen zur Abschwächung der SyCyR-Aktivierung und zum anderen zu zytotoxischen Nebenwirkungen führen. Nicht-immunogene, synthetische Liganden würden diese Umständen bewältigen können. Problematik unter Als Beispiele seien hier computergenerierte Neoleukine, die trotz ihrer physiologischen Komponenten weitestgehend nebenwirkungs- und hintergrundfrei sind, oder mutierte IL-2- und IL-2 Rezeptor-Varianten, die zur T-Zell-Expansion ohne Interaktion mit dem physiologischen IL-2:IL-2R-System führen, genannt (206, 207). Auch wenn in dieser Arbeit keine toxischen Wirkungen der synthetischen Liganden beobachtet wurden, ist eine genauere Evaluation ihrer Wirkung im Menschen notwendig.



Abb. 26: Optimierung der Immuntherapie mittels schaltbarer SyCyRs. CAR-T-Zellen erkennen ein tumorspezifisches Oberflächenantigen, z.B. CD19, und zerstören auf diese Weise Tumorzellen (112). Je nach Antitumoraktivitätszustand kann es zu insuffizienten, überschießenden oder fatalen Reaktionen im Patienten kommen. In solchen Situationen könnten SyCyRs mit stimulatorischen (STIM-SyCyRs), inhibierenden (INH-SyCyRs) oder Apoptose-induzierenden (DEATH-SyCyRs) Signaldomänen die CAR-T-Zellen steuern. Die Aktivierung von STIM-SyCyRs in CAR-T-Zellen soll zur verstärkten Antitumoraktivität, von INH-SyCyRs zum transienten Ausschalten und DEATH-SyCyRs im Notfall zur Apoptose von CAR-T-Zellen führen. So käme es zu einem verbesserten klinischen Ergebnis für den Patienten. Alternativ können statt CAR-T-Zellen auch endogene tumorspezifische T-Zellen, die den Tumor MHC-abhängig mittels TCR erkennen, mit SyCyRs ausgestattet werden.

4.4 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das in dieser Arbeit konstruierte SyCyR-System eine individualisierte Analyse von Zytokin-Signalwegen durch die kontrollierbare Zusammensetzung und spezifische Aktivierung einer festlegbaren Anzahl von gleichen oder verschiedenen Rezeptorketten erlaubt. Die exakte Rezeptorkonstellation wird letztendlich durch die Anzahl und Sequenz der GFP- und mCherry-Einheiten in den synthetischen Liganden, welche die Rezeptoren rekrutieren, determiniert. Die Analysen des Proliferationsverhaltens, der Phosphorylierung von Signalproteinen und der Genexpression zeigten, dass dieses System in der Lage ist, den Signalweg von IL-23 spezifisch und vollständig zu phänokopieren. Das Prinzip, extrazelluläre Rezeptordomänen durch nichtphysiologische *nanobodies* und Liganden durch nicht-physiologische, fluoreszierende Proteine zu ersetzen, ist aufgrund seiner allgemeingültigen Natur auf andere ZytokinSignalwege übertragbar. Unter anderem ist es in dieser Arbeit gelungen, mittels synthetischer Zytokinrezeptoren die IL-23-ähnliche Signaltransduktion von IL-23R-Homodimeren nachzuweisen. Die synthetischen Zytokinrezeptoren stellen somit eine neue Technologie zur Erforschung der Signaltransduktion von Zytokinen dar, um die Rolle von IL-23 und anderen Zytokinen in diversen Krankheiten genauer zu definieren. Im Gegensatz zu den gegenwärtig vorhandenen chimären Rezeptorsystemen, die den Nachteil der Kreuzreaktivität haben und eine zu geringe Steuerbarkeit aufweisen, ist das SyCyR-System dank seiner nicht-physiologischen Bestandteile hintergrundfrei und durch die Hinzugabe löslicher *nanobodies* leicht ausschaltbar. Zudem erlaubt die geringe bis fehlende Toxizität der fluoreszierenden Proteine den Einsatz des SyCyR-Systems *in vitro* und *in vivo*. Diese Eigenschaften bieten ein großes Potential für neue Ansätze, die Zelltyp-spezifische Rezeptoraktivierung in transgenen Mäusen zu analysieren und die Immuntherapie zur Behandlung krebskranker Patienten zu optimieren.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- (1) Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J.J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., Blanchard, D., Gaillard, C., Das Mahapatra, B., Rouvier, E., Golstein, P., Banchereau, J., Lebecque, S., (1996), T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *Journal of Experimental Medicine*, (183) 2593-2603
- (2) Hou, T., Huang, D., Zeng, R., Ye, Z., Zhang, Y., (2015), Accuracy of serum interleukin (IL)-6 in sepsis diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, (8) 15238-15245
- (3) O'Shea, J.J., Gadina, M., Siegel, R.M., (2019), Cytokines and Cytokine Receptors. In: Rich, R.R., Fleisher, T.A., Shearer, W.T., Schroeder, H.W., Frew, A.J., Weyand, C.M. (Eds.), *Clinical Immunology*, (5th Edition), Elsevier, 127-155
- (4) Vignali, D.A., Kuchroo, V.K., (2012), IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Immunology*, (13) 722-728
- (5) Wang, X., Wei, Y., Xiao, H., Liu, X., Zhang, Y., Han, G., Chen, G., Hou, C., Ma, N., Shen, B., Li, Y., Egwuagu, C.E., Wang, R., (2016), A novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in Lupus-like mice. *European Journal of Immunology*, (46) 1343-1350
- (6) Floss, D.M., Schonberg, M., Franke, M., Horstmeier, F.C., Engelowski, E., Schneider, A., Rosenfeldt, E.M., Scheller, J., (2017), 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*, (7) 15172
- (7) Garbers, C., Hermanns, H.M., Schaper, F., Muller-Newen, G., Grotzinger, J., Rose-John, S., Scheller, J., (2012), Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, (23) 85-97
- (8) Rose-John, S., Scheller, J., Schaper, F., (2015), "Family reunion"--A structured view on the composition of the receptor complexes of interleukin-6-type and interleukin-12-type cytokines. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, (26) 471-474
- (9) Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., Murphy, K.M., (1993), Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeriainduced macrophages. *Science*, (260) 547-549
- (10) Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M.G., Piccinni, M.P., Maggi, E., Trinchieri, G., Romagnani, S., (1993), Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *Journal of Experimental Medicine*, (177) 1199-1204
- (11) Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.H., de Sauvage, F.J., Gurney, A.L., (2003), Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *Journal of Biological Chemistry*, (278) 1910-1914
- (12) Lucas, S., Ghilardi, N., Li, J., de Sauvage, F.J., (2003), IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (100) 15047-15052
- (13) Hall, A.O., Beiting, D.P., Tato, C., John, B., Oldenhove, G., Lombana, C.G., Pritchard, G.H., Silver, J.S., Bouladoux, N., Stumhofer, J.S., Harris, T.H., Grainger, J., Wojno, E.D., Wagage, S., Roos, D.S., Scott, P., Turka, L.A., Cherry, S., Reiner, S.L., Cua, D., Belkaid, Y., Elloso, M.M., Hunter, C.A., (2012), The cytokines interleukin 27 and interferon-gamma promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology. *Immunity*, (37) 511-523

- (14) Stumhofer, J.S., Laurence, A., Wilson, E.H., Huang, E., Tato, C.M., Johnson, L.M., Villarino, A.V., Huang, Q., Yoshimura, A., Sehy, D., Saris, C.J., O'Shea, J.J., Hennighausen, L., Ernst, M., Hunter, C.A., (2006), Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nature Immunology*, (7) 937-945
- (15) Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., Vignali, D.A., (2007), The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, (450) 566-569
- (16) Collison, L.W., Chaturvedi, V., Henderson, A.L., Giacomin, P.R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C.J., Brown, S.A., Rehg, J.E., Jones, M.L., Ni, H.T., Artis, D., Turk, M.J., Vignali, D.A., (2010), IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nature Immunology*, (11) 1093-1101
- Ramnath, D., Tunny, K., Hohenhaus, D.M., Pitts, C.M., Bergot, A.S., Hogarth, P.M., Hamilton, J.A., Kapetanovic, R., Sturm, R.A., Scholz, G.M., Sweet, M.J., (2015), TLR3 drives IRF6-dependent IL-23p19 expression and p19/EBI3 heterodimer formation in keratinocytes. *Immunology and Cell Biology*, (93) 771-779
- (18) Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J.S., Moore, K.W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J.F., Kastelein, R.A., (2000), Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, (13) 715-725
- (19) Schroder, J., Moll, J.M., Baran, P., Grotzinger, J., Scheller, J., Floss, D.M., (2015), 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*, (290) 359-370
- (20) Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K.P., Vega, F., To, W., Wagner, J., O'Farrell, A.M., McClanahan, T., Zurawski, S., Hannum, C., Gorman, D., Rennick, D.M., Kastelein, R.A., de Waal Malefyt, R., Moore, K.W., (2002), A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *Journal of Immunology*, (168) 5699-5708
- (21) Pawson, T., (1995), Protein modules and signalling networks. *Nature*, (373) 573-580
- (22) Floss, D.M., Klocker, T., Schroder, J., Lamertz, L., Mrotzek, S., Strobl, B., Hermanns, H., Scheller, J., (2016), Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor beta1 and interleukin 23 receptor to Janus kinases. *Molecular Biology of the Cell*, (27) 2301-2316
- (23) Hummel, T.M., Ackfeld, T., Schonberg, M., Ciupka, G., Schulz, F., Oberdoerster, A., Grotzinger, J., Scheller, J., Floss, D.M., (2017), Synthetic Deletion of the Interleukin 23 Receptor (IL-23R) Stalk Region Led to Autonomous IL-23R Homodimerization and Activation. *Molecular and Cellular Biology*, (37) e00014-00017
- (24) Floss, D.M., Mrotzek, S., Klocker, T., Schroder, J., Grotzinger, J., Rose-John, S., Scheller, J., (2013), Identification of canonical tyrosine-dependent and noncanonical tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, (288) 19386-19400
- (25) Ortmann, R.A., Cheng, T., Visconti, R., Frucht, D.M., O'Shea, J.J., (2000), Janus kinases and signal transducers and activators of transcription: their roles in cytokine signaling, development and immunoregulation. *Arthritis Research*, (2) 16-32
- (26) Cho, M.L., Kang, J.W., Moon, Y.M., Nam, H.J., Jhun, J.Y., Heo, S.B., Jin, H.T., Min, S.Y., Ju, J.H., Park, K.S., Cho, Y.G., Yoon, C.H., Park, S.H., Sung, Y.C., Kim,

H.Y., (2006), STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Journal of Immunology*, (176) 5652-5661

- (27) Chua, A.O., Chizzonite, R., Desai, B.B., Truitt, T.P., Nunes, P., Minetti, L.J., Warrier, R.R., Presky, D.H., Levine, J.F., Gately, M.K., et al., (1994), Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *Journal of Immunology*, (153) 128-136
- (28) Chua, A.O., Wilkinson, V.L., Presky, D.H., Gubler, U., (1995), Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component. *Journal of Immunology*, (155) 4286-4294
- (29) Floss, D.M., Schroder, J., Franke, M., Scheller, J., (2015), Insights into IL-23 biology: From structure to function. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, (26) 569-578
- (30) Khader, S.A., Guglani, L., Rangel-Moreno, J., Gopal, R., Junecko, B.A., Fountain, J.J., Martino, C., Pearl, J.E., Tighe, M., Lin, Y.Y., Slight, S., Kolls, J.K., Reinhart, T.A., Randall, T.D., Cooper, A.M., (2011), IL-23 is required for long-term control of Mycobacterium tuberculosis and B cell follicle formation in the infected lung. *Journal of Immunology*, (187) 5402-5407
- (31) Thompson, A., Orr, S.J., (2018), Emerging IL-12 family cytokines in the fight against fungal infections. *Cytokine*, (111) 398-407
- (32) Langrish, C.L., McKenzie, B.S., Wilson, N.J., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R.A., Cua, D.J., (2004), IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunological Reviews*, (202) 96-105
- (33) Gaffen, S.L., Jain, R., Garg, A.V., Cua, D.J., (2014), The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nature Reviews: Immunology*, (14) 585-600
- (34) Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K., (2006), Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, (441) 235-238
- (35) Zhou, L., Ivanov, II, Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., Littman, D.R., (2007), IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature Immunology*, (8) 967-974
- (36) Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Cua, D.J., (2005), IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, (201) 233-240
- (37) Zheng, Y., Danilenko, D.M., Valdez, P., Kasman, I., Eastham-Anderson, J., Wu, J., Ouyang, W., (2007), Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*, (445) 648-651
- (38) El-Behi, M., Ciric, B., Dai, H., Yan, Y., Cullimore, M., Safavi, F., Zhang, G.X., Dittel, B.N., Rostami, A., (2011), The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature Immunology*, (12) 568-575
- (39) Cua, D.J., Tato, C.M., (2010), Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature Reviews: Immunology*, (10) 479-489
- (40) Buonocore, S., Ahern, P.P., Uhlig, H.H., Ivanov, II, Littman, D.R., Maloy, K.J., Powrie, F., (2010), Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature*, (464) 1371-1375
- (41) Croxford, A.L., Mair, F., Becher, B., (2012), IL-23: one cytokine in control of autoimmunity. *European Journal of Immunology*, (42) 2263-2273

- (42) Croxford, A.L., Kulig, P., Becher, B., (2014), IL-12-and IL-23 in health and disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, (25) 415-421
- (43) Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S.A., Gorman, D., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., (2003), Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, (421) 744-748
- (44) Segal, B.M., Constantinescu, C.S., Raychaudhuri, A., Kim, L., Fidelus-Gort, R., Kasper, L.H., Ustekinumab, M.S.I., (2008), Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, doseranging study. *Lancet Neurology*, (7) 796-804
- (45) Becher, B., Durell, B.G., Noelle, R.J., (2003), IL-23 produced by CNS-resident cells controls T cell encephalitogenicity during the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Clinical Investigation*, (112) 1186-1191
- (46) Wang, X., Tomso, D.J., Liu, X., Bell, D.A., (2005), Single nucleotide polymorphism in transcriptional regulatory regions and expression of environmentally responsive genes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, (207) 84-90
- (47) Papp, K.A., Langley, R.G., Lebwohl, M., Krueger, G.G., Szapary, P., Yeilding, N., Guzzo, C., Hsu, M.C., Wang, Y., Li, S., Dooley, L.T., Reich, K., investigators, P.s., (2008), Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, doubleblind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2). *Lancet*, (371) 1675-1684
- (48) Leonardi, C.L., Kimball, A.B., Papp, K.A., Yeilding, N., Guzzo, C., Wang, Y., Li, S., Dooley, L.T., Gordon, K.B., investigators, P.s., (2008), Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1). *Lancet*, (371) 1665-1674
- (49) Gordon, K.B., Langley, R.G., Gottlieb, A.B., Papp, K.A., Krueger, G.G., Strober, B.E., Williams, D.A., Gu, Y., Valdes, J.M., (2012), A phase III, randomized, controlled trial of the fully human IL-12/23 mAb briakinumab in moderate-to-severe psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, (132) 304-314
- (50) Chan, J.R., Blumenschein, W., Murphy, E., Diveu, C., Wiekowski, M., Abbondanzo, S., Lucian, L., Geissler, R., Brodie, S., Kimball, A.B., Gorman, D.M., Smith, K., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R.A., McClanahan, T.K., Bowman, E.P., (2006), IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *Journal of Experimental Medicine*, (203) 2577-2587
- (51) Lee, E., Trepicchio, W.L., Oestreicher, J.L., Pittman, D., Wang, F., Chamian, F., Dhodapkar, M., Krueger, J.G., (2004), Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *Journal of Experimental Medicine*, (199) 125-130
- (52) Fotiadou, C., Lazaridou, E., Sotiriou, E., Ioannides, D., (2018), Targeting IL-23 in psoriasis: current perspectives. *Psoriasis (Auckland, NZ)*, (8) 1-5
- (53) Argollo, M.C., Allocca, M., Furfaro, F., Peyrin-Biroulet, L., Danese, S., (2019), Interleukin-23 Blockers: Born to be First-line Biologic Agents in Inflammatory Bowel Disease? *Current Pharmaceutical Design*, (25) 25-31
- (54) Yen, D., Cheung, J., Scheerens, H., Poulet, F., McClanahan, T., McKenzie, B., Kleinschek, M.A., Owyang, A., Mattson, J., Blumenschein, W., Murphy, E., Sathe, M., Cua, D.J., Kastelein, R.A., Rennick, D., (2006), IL-23 is essential for T cell-

mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *Journal of Clinical Investigation*, (116) 1310-1316

- (55) Cox, J.H., Kljavin, N.M., Ota, N., Leonard, J., Roose-Girma, M., Diehl, L., Ouyang, W., Ghilardi, N., (2012), Opposing consequences of IL-23 signaling mediated by innate and adaptive cells in chemically induced colitis in mice. *Mucosal Immunology*, (5) 99-109
- (56) Bernshtein, B., Curato, C., Ioannou, M., Thaiss, C.A., Gross-Vered, M., Kolesnikov, M., Wang, Q., David, E., Chappell-Maor, L., Harmelin, A., Elinav, E., Thakker, P., Papayannopoulos, V., Jung, S., (2019), IL-23-producing IL-10Ralpha-deficient gut macrophages elicit an IL-22-driven proinflammatory epithelial cell response. *Science Immunology*, (4) eaau6571
- (57) Teng, M.W., Bowman, E.P., McElwee, J.J., Smyth, M.J., Casanova, J.L., Cooper, A.M., Cua, D.J., (2015), IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nature Medicine*, (21) 719-729
- (58) Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M., (2010), Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, (140) 883-899
- (59) Tugues, S., Burkhard, S.H., Ohs, I., Vrohlings, M., Nussbaum, K., Vom Berg, J., Kulig, P., Becher, B., (2015), New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death and Differentiation*, (22) 237-246
- (60) Yan, J., Smyth, M.J., Teng, M.W.L., (2018), Interleukin (IL)-12 and IL-23 and Their Conflicting Roles in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, (10) a028530
- (61) Wolf, A.M., Rumpold, H., Reimer, D., Marth, C., Zeimet, A.G., Wolf, D., (2010), High IL-12 p35 and IL-23 p19 mRNA expression is associated with superior outcome in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, (118) 244-250
- (62) Grivennikov, S.I., Wang, K., Mucida, D., Stewart, C.A., Schnabl, B., Jauch, D., Taniguchi, K., Yu, G.Y., Osterreicher, C.H., Hung, K.E., Datz, C., Feng, Y., Fearon, E.R., Oukka, M., Tessarollo, L., Coppola, V., Yarovinsky, F., Cheroutre, H., Eckmann, L., Trinchieri, G., Karin, M., (2012), Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*, (491) 254-258
- (63) Chan, I.H., Jain, R., Tessmer, M.S., Gorman, D., Mangadu, R., Sathe, M., Vives, F., Moon, C., Penaflor, E., Turner, S., Ayanoglu, G., Chang, C., Basham, B., Mumm, J.B., Pierce, R.H., Yearley, J.H., McClanahan, T.K., Phillips, J.H., Cua, D.J., Bowman, E.P., Kastelein, R.A., LaFace, D., (2014), Interleukin-23 is sufficient to induce rapid de novo gut tumorigenesis, independent of carcinogens, through activation of innate lymphoid cells. *Mucosal Immunology*, (7) 842-856
- (64) Langowski, J.L., Zhang, X., Wu, L., Mattson, J.D., Chen, T., Smith, K., Basham, B., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Oft, M., (2006), IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*, (442) 461-465
- (65) Teng, M.W., Andrews, D.M., McLaughlin, N., von Scheidt, B., Ngiow, S.F., Moller, A., Hill, G.R., Iwakura, Y., Oft, M., Smyth, M.J., (2010), IL-23 suppresses innate immune response independently of IL-17A during carcinogenesis and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (107) 8328-8333
- (66) Fu, Q., Xu, L., Wang, Y., Jiang, Q., Liu, Z., Zhang, J., Zhou, Q., Zeng, H., Tong, S., Wang, T., Qi, Y., Hu, B., Fu, H., Xie, H., Zhou, L., Chang, Y., Zhu, Y., Dai, B., Zhang, W., Xu, J., (2019), Tumor-associated Macrophage-derived Interleukin-23 Interlinks Kidney Cancer Glutamine Addiction with Immune Evasion. *European* Urology, (75) 752-763

- (67) Chen, D., Li, W., Liu, S., Su, Y., Han, G., Xu, C., Liu, H., Zheng, T., Zhou, Y., Mao, C., (2015), Interleukin-23 promotes the epithelial-mesenchymal transition of oesophageal carcinoma cells via the Wnt/beta-catenin pathway. *Scientific Reports*, (5) 8604
- Yang, C., Lee, H., Pal, S., Jove, V., Deng, J., Zhang, W., Hoon, D.S., Wakabayashi, M., Forman, S., Yu, H., (2013), B cells promote tumor progression via STAT3 regulated-angiogenesis. *PloS One*, (8) e64159
- (69) Teng, M.W., von Scheidt, B., Duret, H., Towne, J.E., Smyth, M.J., (2011), Anti-IL-23 monoclonal antibody synergizes in combination with targeted therapies or IL-2 to suppress tumor growth and metastases. *Cancer Research*, (71) 2077-2086
- (70) Baird, A.M., Leonard, J., Naicker, K.M., Kilmartin, L., O'Byrne, K.J., Gray, S.G., (2013), IL-23 is pro-proliferative, epigenetically regulated and modulated by chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, (79) 83-90
- (71) von Scheidt, B., Leung, P.S., Yong, M.C., Zhang, Y., Towne, J.E., Smyth, M.J., Teng, M.W., (2014), Combined anti-CD40 and anti-IL-23 monoclonal antibody therapy effectively suppresses tumor growth and metastases. *Cancer Research*, (74) 2412-2421
- (72) Oniki, S., Nagai, H., Horikawa, T., Furukawa, J., Belladonna, M.L., Yoshimoto, T., Hara, I., Nishigori, C., (2006), Interleukin-23 and interleukin-27 exert quite different antitumor and vaccine effects on poorly immunogenic melanoma. *Cancer Research*, (66) 6395-6404
- (73) Hu, P., Hu, H.D., Chen, M., Peng, M.L., Tang, L., Tang, K.F., Matsui, M., Belladonna, M.L., Yoshimoto, T., Zhang, D.Z., Xiang, R., Ren, H., (2009), Expression of interleukins-23 and 27 leads to successful gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Molecular Immunology*, (46) 1654-1662
- (74) Cocco, C., Canale, S., Frasson, C., Di Carlo, E., Ognio, E., Ribatti, D., Prigione, I., Basso, G., Airoldi, I., (2010), Interleukin-23 acts as antitumor agent on childhood Bacute lymphoblastic leukemia cells. *Blood*, (116) 3887-3898
- (75) Hewitt, S.L., Bai, A., Bailey, D., Ichikawa, K., Zielinski, J., Karp, R., Apte, A., Arnold, K., Zacharek, S.J., Iliou, M.S., Bhatt, K., Garnaas, M., Musenge, F., Davis, A., Khatwani, N., Su, S.V., MacLean, G., Farlow, S.J., Burke, K., Frederick, J.P., (2019), Durable anticancer immunity from intratumoral administration of IL-23, IL-36gamma, and OX40L mRNAs. *Science Translational Medicine*, (11) eaat9143
- (76) Li, J., Zhang, L., Zhang, J., Wei, Y., Li, K., Huang, L., Zhang, S., Gao, B., Wang, X., Lin, P., (2013), Interleukin 23 regulates proliferation of lung cancer cells in a concentration-dependent way in association with the interleukin-23 receptor. *Carcinogenesis*, (34) 658-666
- (77) Porcar, M., Pereto, J., (2016), Nature versus design: synthetic biology or how to build a biological non-machine. *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano* to Macro, (8) 451-455
- (78) Scheller, J., Engelowski, E., Moll, J.M., Floss, D.M., (2019), Immunoreceptor Engineering and Synthetic Cytokine Signaling for Therapeutics. *Trends in Immunology*, (40) 258-272
- (79) Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., Hamers, R., (1993), Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, (363) 446-448
- (80) Greenberg, A.S., Avila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E.C., Flajnik, M.F., (1995), A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*, (374) 168-173
- (81) Konning, D., Zielonka, S., Grzeschik, J., Empting, M., Valldorf, B., Krah, S., Schroter, C., Sellmann, C., Hock, B., Kolmar, H., (2017), Camelid and shark single

domain antibodies: structural features and therapeutic potential. *Current Opinion in Structural Biology*, (45) 10-16

- (82) Stanfield, R.L., Dooley, H., Flajnik, M.F., Wilson, I.A., (2004), Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme. *Science*, (305) 1770-1773
- (83) Harmsen, M.M., De Haard, H.J., (2007), Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (77) 13-22
- (84) Vaneycken, I., Devoogdt, N., Van Gassen, N., Vincke, C., Xavier, C., Wernery, U., Muyldermans, S., Lahoutte, T., Caveliers, V., (2011), Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. *FASEB Journal*, (25) 2433-2446
- (85) D'Huyvetter, M., Vincke, C., Xavier, C., Aerts, A., Impens, N., Baatout, S., De Raeve, H., Muyldermans, S., Caveliers, V., Devoogdt, N., Lahoutte, T., (2014), Targeted radionuclide therapy with A 177Lu-labeled anti-HER2 nanobody. *Theranostics*, (4) 708-720
- (86) Floss, D.M., Scheller, J., (2019), Naturally occurring and synthetic constitutiveactive cytokine receptors in disease and therapy. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, (47) 1-20
- (87) Poullin, P., Bornet, C., Veyradier, A., Coppo, P., (2019), Caplacizumab to treat immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Drugs Today (Barc)*, (55) 367-376
- (88) Tsien, R.Y., (1998), The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, (67) 509-544
- (89) Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y., (1962), Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, (59) 223-239
- (90) Cormack, B.P., Valdivia, R.H., Falkow, S., (1996), FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, (173) 33-38
- (91) Genove, G., Glick, B.S., Barth, A.L., (2005), Brighter reporter genes from multimerized fluorescent proteins. *Biotechniques*, (39) 814-822
- (92) von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Goedhart, J., Gadella, T.W., Jr., Royant, A., (2012), Structure of a fluorescent protein from Aequorea victoria bearing the obligate-monomer mutation A206K. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, (68) 878-882
- (93) Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., Tsien, R.Y., (2004), Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, (22) 1567-1572
- (94) Rothbauer, U., Zolghadr, K., Muyldermans, S., Schepers, A., Cardoso, M.C., Leonhardt, H., (2008), A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, (7) 282-289
- (95) Fridy, P.C., Li, Y., Keegan, S., Thompson, M.K., Nudelman, I., Scheid, J.F., Oeffinger, M., Nussenzweig, M.C., Fenyo, D., Chait, B.T., Rout, M.P., (2014), A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires. *Nature Methods*, (11) 1253-1260
- (96) Kirchhofer, A., Helma, J., Schmidthals, K., Frauer, C., Cui, S., Karcher, A., Pellis, M., Muyldermans, S., Casas-Delucchi, C.S., Cardoso, M.C., Leonhardt, H., Hopfner, K.P., Rothbauer, U., (2010), Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nature Structural & Molecular Biology*, (17) 133-138

- (97) Herce, H.D., Deng, W., Helma, J., Leonhardt, H., Cardoso, M.C., (2013), Visualization and targeted disruption of protein interactions in living cells. *Nature Communications*, (4) 2660
- (98) Kubala, M.H., Kovtun, O., Alexandrov, K., Collins, B.M., (2010), Structural and thermodynamic analysis of the GFP:GFP-nanobody complex. *Protein Science*, (19) 2389-2401
- (99) Foster, S.A., Whalen, D.M., Ozen, A., Wongchenko, M.J., Yin, J., Yen, I., Schaefer, G., Mayfield, J.D., Chmielecki, J., Stephens, P.J., Albacker, L.A., Yan, Y., Song, K., Hatzivassiliou, G., Eigenbrot, C., Yu, C., Shaw, A.S., Manning, G., Skelton, N.J., Hymowitz, S.G., Malek, S., (2016), Activation Mechanism of Oncogenic Deletion Mutations in BRAF, EGFR, and HER2. *Cancer Cell*, (29) 477-493
- (100) Cheng, H., Langley, R.R., Wu, Q., Wu, W., Feng, J., Tsan, R., Fan, D., Fidler, I.J., (2005), Construction of a novel constitutively active chimeric EGFR to identify new targets for therapy. *Neoplasia*, (7) 1065-1072
- (101) Kellar, K.A., Lorenzi, M.V., Ho, C.P., You, D., Wen, M.L., Ryseck, R.P., Oppenheimer, S., Fink, B.E., Vite, G.D., Rowley, B.R., Yu, C., Bol, D.K., Lee, F.Y., Wong, T.W., (2006), Constitutively active receptor tyrosine kinases as oncogenes in preclinical models for cancer therapeutics. *Molecular Cancer Therapeutics*, (5) 1571-1576
- (102) Li, Z., Tyrpak, D.R., Park, M., Okamoto, C.T., MacKay, J.A., (2018), A new temperature-dependent strategy to modulate the epidermal growth factor receptor. *Biomaterials*, (183) 319-330
- (103) Floss, D.M., Schallau, K., Rose-John, S., Conrad, U., Scheller, J., (2010), Elastinlike polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application. *Trends in Biotechnology*, (28) 37-45
- (104) Hemmann, U., Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Kurapkat, G., Grotzinger, J., Wollmer, A., Zhong, Z., Darnell, J.E., Jr., Graeve, L., Heinrich, P.C., Horn, F., (1996), 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*, (271) 12999-13007
- (105) Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Horn, F., Heinrich, P.C., Graeve, L., (1996), 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*, (271) 12991-12998
- (106) Bohlius, J., Wilson, J., Seidenfeld, J., Piper, M., Schwarzer, G., Sandercock, J., Trelle, S., Weingart, O., Bayliss, S., Djulbegovic, B., Bennett, C.L., Langensiepen, S., Hyde, C., Engert, A., (2006), Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients. *Journal of the National Cancer Institute*, (98) 708-714
- (107) Spencer, D.M., Wandless, T.J., Schreiber, S.L., Crabtree, G.R., (1993), Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science*, (262) 1019-1024
- (108) June, C.H., O'Connor, R.S., Kawalekar, O.U., Ghassemi, S., Milone, M.C., (2018), CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*, (359) 1361-1365
- (109) Xu, J., Melenhorst, J.J., Fraietta, J.A., (2018), Toward precision manufacturing of immunogene T-cell therapies. *Cytotherapy*, (20) 623-638
- (110) Miliotou, A.N., Papadopoulou, L.C., (2018), CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, (19) 5-18
- (111) Hay, K.A., Turtle, C.J., (2017), Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells: Lessons Learned from Targeting of CD19 in B-Cell Malignancies. *Drugs*, (77) 237-245

- (112) Chmielewski, M., Hombach, A.A., Abken, H., (2013), Antigen-Specific T-Cell Activation Independently of the MHC: Chimeric Antigen Receptor-Redirected T Cells. *Frontiers in Immunology*, (4) 371
- (113) Porter, D.L., Hwang, W.T., Frey, N.V., Lacey, S.F., Shaw, P.A., Loren, A.W., Bagg, A., Marcucci, K.T., Shen, A., Gonzalez, V., Ambrose, D., Grupp, S.A., Chew, A., Zheng, Z., Milone, M.C., Levine, B.L., Melenhorst, J.J., June, C.H., (2015), Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Science Translational Medicine*, (7) 303ra139
- (114) Hucks, G., Rheingold, S.R., (2019), The journey to CAR T cell therapy: the pediatric and young adult experience with relapsed or refractory B-ALL. *Blood Cancer Journal*, (9) 10
- (115) Maude, S.L., Laetsch, T.W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneris, M.R., Stefanski, H.E., Myers, G.D., Qayed, M., De Moerloose, B., Hiramatsu, H., Schlis, K., Davis, K.L., Martin, P.L., Nemecek, E.R., Yanik, G.A., Peters, C., Baruchel, A., Boissel, N., Mechinaud, F., Balduzzi, A., Krueger, J., June, C.H., Levine, B.L., Wood, P., Taran, T., Leung, M., Mueller, K.T., Zhang, Y., Sen, K., Lebwohl, D., Pulsipher, M.A., Grupp, S.A., (2018), Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, (378) 439-448
- (116) Schuster, S.J., Bishop, M.R., Tam, C.S., Waller, E.K., Borchmann, P., McGuirk, J.P., Jäger, U., Jaglowski, S., Andreadis, C., Westin, J.R., Fleury, I., Bachanova, V., Foley, S.R., Ho, P.J., Mielke, S., Magenau, J.M., Holte, H., Pantano, S., Pacaud, L.B., Awasthi, R., Chu, J., Anak, Ö., Salles, G., Maziarz, R.T., (2018), Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, (380) 45-56
- (117) Neelapu, S.S., Locke, F.L., Bartlett, N.L., Lekakis, L.J., Miklos, D.B., Jacobson, C.A., Braunschweig, I., Oluwole, O.O., Siddiqi, T., Lin, Y., Timmerman, J.M., Stiff, P.J., Friedberg, J.W., Flinn, I.W., Goy, A., Hill, B.T., Smith, M.R., Deol, A., Farooq, U., McSweeney, P., Munoz, J., Avivi, I., Castro, J.E., Westin, J.R., Chavez, J.C., Ghobadi, A., Komanduri, K.V., Levy, R., Jacobsen, E.D., Witzig, T.E., Reagan, P., Bot, A., Rossi, J., Navale, L., Jiang, Y., Aycock, J., Elias, M., Chang, D., Wiezorek, J., Go, W.Y., (2017), Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, (377) 2531-2544
- (118) Raje, N., Berdeja, J., Lin, Y., Siegel, D., Jagannath, S., Madduri, D., Liedtke, M., Rosenblatt, J., Maus, M.V., Turka, A., Lam, L.P., Morgan, R.A., Friedman, K., Massaro, M., Wang, J., Russotti, G., Yang, Z., Campbell, T., Hege, K., Petrocca, F., Quigley, M.T., Munshi, N., Kochenderfer, J.N., (2019), Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, (380) 1726-1737
- (119) Brown, C.E., Alizadeh, D., Starr, R., Weng, L., Wagner, J.R., Naranjo, A., Ostberg, J.R., Blanchard, M.S., Kilpatrick, J., Simpson, J., Kurien, A., Priceman, S.J., Wang, X., Harshbarger, T.L., D'Apuzzo, M., Ressler, J.A., Jensen, M.C., Barish, M.E., Chen, M., Portnow, J., Forman, S.J., Badie, B., (2016), Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *New England Journal of Medicine*, (375) 2561-2569
- (120) Martinez, M., Moon, E.K., (2019), CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, (10) 128
- (121) Sotillo, E., Barrett, D.M., Black, K.L., Bagashev, A., Oldridge, D., Wu, G., Sussman, R., Lanauze, C., Ruella, M., Gazzara, M.R., Martinez, N.M., Harrington, C.T.,

Chung, E.Y., Perazzelli, J., Hofmann, T.J., Maude, S.L., Raman, P., Barrera, A., Gill, S., Lacey, S.F., Melenhorst, J.J., Allman, D., Jacoby, E., Fry, T., Mackall, C., Barash, Y., Lynch, K.W., Maris, J.M., Grupp, S.A., Thomas-Tikhonenko, A., (2015), Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discovery*, (5) 1282-1295

- (122) Brudno, J.N., Kochenderfer, J.N., (2016), Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood*, (127) 3321-3330
- (123) Althoff, K., Mullberg, J., Aasland, D., Voltz, N., Kallen, K., Grotzinger, J., Rose-John, S., (2001), Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins. *Biochemical Journal*, (353) 663-672
- (124) Engelowski, E., Schneider, A., Franke, M., Xu, H., Clemen, R., Lang, A., Baran, P., Binsch, C., Knebel, B., Al-Hasani, H., Moll, J.M., Floss, D.M., Lang, P.A., Scheller, J., (2018), Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands. *Nature Communications*, (9) 2034
- (125) Engelowski, E., (2015), Charakterisierung von Interleukin 23 in kardialer Ischämie. Masterarbeit, *Universitäts- und Landesbibliothek Düsseldorf*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- (126) Suthaus, J., Tillmann, A., Lorenzen, I., Bulanova, E., Rose-John, S., Scheller, J., (2010), 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*, (21) 2797-2807
- (127) Ketteler, R., Glaser, S., Sandra, O., Martens, U.M., Klingmuller, U., (2002), Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Therapy*, (9) 477-487
- (128) Gearing, D.P., Ziegler, S.F., Comeau, M.R., Friend, D., Thoma, B., Cosman, D., Park, L., Mosley, B., (1994), Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (91) 1119-1123
- (129) Tjio, J.H., Puck, T.T., (1958), Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *Journal of Experimental Medicine*, (108) 259-268
- (130) Puck, T.T., Cieciura, S.J., Robinson, A., (1958), Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *Journal of Experimental Medicine*, (108) 945-956
- (131) Palacios, R., Henson, G., Steinmetz, M., McKearn, J.P., (1984), Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro. *Nature*, (309) 126-131
- (132) Palacios, R., Steinmetz, M., (1985), Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell*, (41) 727-734
- (133) Fang, J., Qian, J.J., Yi, S., Harding, T.C., Tu, G.H., VanRoey, M., Jooss, K., (2005), Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nature Biotechnology*, (23) 584-590
- (134) Wurm, F.M., (2004), Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, (22) 1393-1398
- (135) Albano, C.R., Randers-Eichhon, L., Chang, Q., Bentley, W.E., Rao, G., (1996), Quantitative measurement of green fluorescent protein expression. *Biotechnology Techniques*, (10) 953-958

- (136) Roberts, T.M., Rudolf, F., Meyer, A., Pellaux, R., Whitehead, E., Panke, S., Held, M., (2016), Identification and Characterisation of a pH-stable GFP. *Scientific Reports*, (6) 28166
- (137) Rakemann, T., Niehof, M., Kubicka, S., Fischer, M., Manns, M.P., Rose-John, S., Trautwein, C., (1999), The designer cytokine hyper-interleukin-6 is a potent activator of STAT3-dependent gene transcription in vivo and in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, (274) 1257-1266
- (138) Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J.P., Kallen, K.J., Wollmer, A., Grotzinger, J., Rose-John, S., (1997), I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nature Biotechnology*, (15) 142-145
- (139) Rose-John, S., Heinrich, P.C., (1994), Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochemical Journal*, (300 (2)) 281-290
- (140) Eulenfeld, R., Dittrich, A., Khouri, C., Muller, P.J., Mutze, B., Wolf, A., Schaper, F., (2012), Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs. *European Journal of Cell Biology*, (91) 486-495
- (141) Morsut, L., Roybal, K.T., Xiong, X., Gordley, R.M., Coyle, S.M., Thomson, M., Lim, W.A., (2016), Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. *Cell*, (164) 780-791
- (142) He, L., Huang, J., Perrimon, N., (2017), Development of an optimized synthetic Notch receptor as an in vivo cell-cell contact sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (114) 5467-5472
- (143) Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., Nishimune, Y., (1997), 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters*, (407) 313-319
- (144) Fink, D., Wohrer, S., Pfeffer, M., Tombe, T., Ong, C.J., Sorensen, P.H., (2010), Ubiquitous expression of the monomeric red fluorescent protein mCherry in transgenic mice. *Genesis*, (48) 723-729
- (145) Schroeder, H.W., Jr., Cavacini, L., (2010), Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, (125) S41-52
- (146) Ghoreschi, K., Laurence, A., O'Shea, J.J., (2009), Janus kinases in immune cell signaling. *Immunological Reviews*, (228) 273-287
- (147) Hanazono, Y., Yu, J.M., Dunbar, C.E., Emmons, R.V., (1997), Green fluorescent protein retroviral vectors: low titer and high recombination frequency suggest a selective disadvantage. *Human Gene Therapy*, (8) 1313-1319
- (148) Liu, H.S., Jan, M.S., Chou, C.K., Chen, P.H., Ke, N.J., (1999), Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (260) 712-717
- (149) Brazelton, T.R., Blau, H.M., (2005), Optimizing techniques for tracking transplanted stem cells in vivo. *Stem Cells*, (23) 1251-1265
- (150) Zou, J., Presky, D.H., Wu, C.Y., Gubler, U., (1997), Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases. *Journal of Biological Chemistry*, (272) 6073-6077
- (151) Lehmann, U., Schmitz, J., Weissenbach, M., Sobota, R.M., Hortner, M., Friederichs, K., Behrmann, I., Tsiaris, W., Sasaki, A., Schneider-Mergener, J., Yoshimura, A., Neel, B.G., Heinrich, P.C., Schaper, F., (2003), SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *Journal of Biological Chemistry*, (278) 661-671
- (152) Vire, B., David, A., Wiestner, A., (2011), TOSO, the Femicro receptor, is highly expressed on chronic lymphocytic leukemia B cells, internalizes upon IgM binding, shuttles to the lysosome, and is downregulated in response to TLR activation. *Journal of Immunology*, (187) 4040-4050

- (153) Kim, A.R., Ulirsch, J.C., Wilmes, S., Unal, E., Moraga, I., Karakukcu, M., Yuan, D., Kazerounian, S., Abdulhay, N.J., King, D.S., Gupta, N., Gabriel, S.B., Lander, E.S., Patiroglu, T., Ozcan, A., Ozdemir, M.A., Garcia, K.C., Piehler, J., Gazda, H.T., Klein, D.E., Sankaran, V.G., (2017), Functional Selectivity in Cytokine Signaling Revealed Through a Pathogenic EPO Mutation. *Cell*, (168) 1053-1064
- (154) Moraga, I., Wernig, G., Wilmes, S., Gryshkova, V., Richter, C.P., Hong, W.J., Sinha, R., Guo, F., Fabionar, H., Wehrman, T.S., Krutzik, P., Demharter, S., Plo, I., Weissman, I.L., Minary, P., Majeti, R., Constantinescu, S.N., Piehler, J., Garcia, K.C., (2015), Tuning cytokine receptor signaling by re-orienting dimer geometry with surrogate ligands. *Cell*, (160) 1196-1208
- (155) Stuhlmann-Laeisz, C., Lang, S., Chalaris, A., Krzysztof, P., Enge, S., Eichler, J., Klingmuller, U., Samuel, M., Ernst, M., Rose-John, S., Scheller, J., (2006), 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, (17) 2986-2995
- (156) Lamertz, L., Floss, D.M., Scheller, J., (2018), Combined deletion of the fibronectintype III domains and the stalk region results in ligand-independent, constitutive activation of the Interleukin 6 signal-transducing receptor gp130. *Cytokine*, (110) 428-434
- (157) Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P.C., Schaper, F., (2000), SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *Journal of Biological Chemistry*, (275) 12848-12856
- (158) Rebouissou, S., Amessou, M., Couchy, G., Poussin, K., Imbeaud, S., Pilati, C., Izard, T., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P., Zucman-Rossi, J., (2009), Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature*, (457) 200-204
- (159) Zhang, G., Budker, V., Wolff, J.A., (1999), High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Human Gene Therapy*, (10) 1735-1737
- (160) Fattori, E., Cappelletti, M., Costa, P., Sellitto, C., Cantoni, L., Carelli, M., Faggioni, R., Fantuzzi, G., Ghezzi, P., Poli, V., (1994), Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*, (180) 1243-1250
- (161) Thiel, S., Dahmen, H., Martens, A., Muller-Newen, G., Schaper, F., Heinrich, P.C., Graeve, L., (1998), Constitutive internalization and association with adaptor protein-2 of the interleukin-6 signal transducer gp130. *FEBS Letters*, (441) 231-234
- (162) Schobitz, B., Pezeshki, G., Pohl, T., Hemmann, U., Heinrich, P.C., Holsboer, F., Reul, J.M., (1995), Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor augments central effects of IL-6 in vivo. *FASEB Journal*, (9) 659-664
- (163) Janda, C.Y., Dang, L.T., You, C., Chang, J., de Lau, W., Zhong, Z.A., Yan, K.S., Marecic, O., Siepe, D., Li, X., Moody, J.D., Williams, B.O., Clevers, H., Piehler, J., Baker, D., Kuo, C.J., Garcia, K.C., (2017), Surrogate Wnt agonists that phenocopy canonical Wnt and beta-catenin signalling. *Nature*, (545) 234-237
- (164) Yan, K.S., Janda, C.Y., Chang, J., Zheng, G.X.Y., Larkin, K.A., Luca, V.C., Chia, L.A., Mah, A.T., Han, A., Terry, J.M., Ootani, A., Roelf, K., Lee, M., Yuan, J., Li, X., Bolen, C.R., Wilhelmy, J., Davies, P.S., Ueno, H., von Furstenberg, R.J., Belgrader, P., Ziraldo, S.B., Ordonez, H., Henning, S.J., Wong, M.H., Snyder, M.P., Weissman, I.L., Hsueh, A.J., Mikkelsen, T.S., Garcia, K.C., Kuo, C.J., (2017), Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5(+) intestinal stem-cell self-renewal. *Nature*, (545) 238-242

- (165) Moraga, I., Spangler, J.B., Mendoza, J.L., Gakovic, M., Wehrman, T.S., Krutzik, P., Garcia, K.C., (2017), Synthekines are surrogate cytokine and growth factor agonists that compel signaling through non-natural receptor dimers. *Elife*, (6) e22882
- (166) Russell, T.D., Yan, Q., Fan, G., Khalifah, A.P., Bishop, D.K., Brody, S.L., Walter, M.J., (2003), IL-12 p40 homodimer-dependent macrophage chemotaxis and respiratory viral inflammation are mediated through IL-12 receptor beta 1. *Journal* of *Immunology*, (171) 6866-6874
- (167) Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C., Tsien, R.Y., (2002), Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*, (296) 913-916
- (168) Suzuki, T., Arai, S., Takeuchi, M., Sakurai, C., Ebana, H., Higashi, T., Hashimoto, H., Hatsuzawa, K., Wada, I., (2012), Development of cysteine-free fluorescent proteins for the oxidative environment. *PloS One*, (7) e37551
- (169) Leibly, D.J., Arbing, M.A., Pashkov, I., DeVore, N., Waldo, G.S., Terwilliger, T.C., Yeates, T.O., (2015), A Suite of Engineered GFP Molecules for Oligomeric Scaffolding. *Structure*, (23) 1754-1768
- (170) Kim, Y.E., Kim, Y.N., Kim, J.A., Kim, H.M., Jung, Y., (2015), Green fluorescent protein nanopolygons as monodisperse supramolecular assemblies of functional proteins with defined valency. *Nature Communications*, (6) 7134
- (171) Kelly, J.D., Haldeman, B.A., Grant, F.J., Murray, M.J., Seifert, R.A., Bowen-Pope, D.F., Cooper, J.A., Kazlauskas, A., (1991), Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit transphosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, (266) 8987-8992
- (172) Lai, C.C., Henningson, C., DiMaio, D., (1998), Bovine papillomavirus E5 protein induces oligomerization and trans-phosphorylation of the platelet-derived growth factor beta receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (95) 15241-15246
- (173) Li, Z., Mei, Y., Liu, X., Zhou, M., (2007), Neuregulin-1 only induces transphosphorylation between ErbB receptor heterodimer partners. *Cellular Signalling*, (19) 466-471
- (174) Qian, X., Dougall, W.C., Fei, Z., Greene, M.I., (1995), Intermolecular association and trans-phosphorylation of different neu-kinase forms permit SH2-dependent signaling and oncogenic transformation. *Oncogene*, (10) 211-219
- (175) Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L., Lenardo, M.J., (2000), A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, (288) 2351-2354
- (176) Fraietta, J.A., Nobles, C.L., Sammons, M.A., Lundh, S., Carty, S.A., Reich, T.J., Cogdill, A.P., Morrissette, J.J.D., DeNizio, J.E., Reddy, S., Hwang, Y., Gohil, M., Kulikovskaya, I., Nazimuddin, F., Gupta, M., Chen, F., Everett, J.K., Alexander, K.A., Lin-Shiao, E., Gee, M.H., Liu, X., Young, R.M., Ambrose, D., Wang, Y., Xu, J., Jordan, M.S., Marcucci, K.T., Levine, B.L., Garcia, K.C., Zhao, Y., Kalos, M., Porter, D.L., Kohli, R.M., Lacey, S.F., Berger, S.L., Bushman, F.D., June, C.H., Melenhorst, J.J., (2018), Disruption of TET2 promotes the therapeutic efficacy of CD19-targeted T cells. *Nature*, (558) 307-312
- (177) Chen, J., Lopez-Moyado, I.F., Seo, H., Lio, C.J., Hempleman, L.J., Sekiya, T., Yoshimura, A., Scott-Browne, J.P., Rao, A., (2019), NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours. *Nature*, (567) 530-534
- (178) Momin, N., Mehta, N.K., Bennett, N.R., Ma, L., Palmeri, J.R., Chinn, M.M., Lutz, E.A., Kang, B., Irvine, D.J., Spranger, S., Wittrup, K.D., (2019), Anchoring of intratumorally administered cytokines to collagen safely potentiates systemic cancer immunotherapy. *Science Translational Medicine*, (11) eaaw2614

- (179) Shum, T., Omer, B., Tashiro, H., Kruse, R.L., Wagner, D.L., Parikh, K., Yi, Z., Sauer, T., Liu, D., Parihar, R., Castillo, P., Liu, H., Brenner, M.K., Metelitsa, L.S., Gottschalk, S., Rooney, C.M., (2017), Constitutive Signaling from an Engineered IL7 Receptor Promotes Durable Tumor Elimination by Tumor-Redirected T Cells. *Cancer Discovery*, (7) 1238-1247
- (180) Ying, Z., Huang, X.F., Xiang, X., Liu, Y., Kang, X., Song, Y., Guo, X., Liu, H., Ding, N., Zhang, T., Duan, P., Lin, Y., Zheng, W., Wang, X., Lin, N., Tu, M., Xie, Y., Zhang, C., Liu, W., Deng, L., Gao, S., Ping, L., Wang, X., Zhou, N., Zhang, J., Wang, Y., Lin, S., Mamuti, M., Yu, X., Fang, L., Wang, S., Song, H., Wang, G., Jones, L., Zhu, J., Chen, S.Y., (2019), A safe and potent anti-CD19 CAR T cell therapy. *Nature Medicine*, (25) 947-953
- (181) Choi, B.D., Yu, X., Castano, A.P., Bouffard, A.A., Schmidts, A., Larson, R.C., Bailey, S.R., Boroughs, A.C., Frigault, M.J., Leick, M.B., Scarfo, I., Cetrulo, C.L., Demehri, S., Nahed, B.V., Cahill, D.P., Wakimoto, H., Curry, W.T., Carter, B.S., Maus, M.V., (2019), CAR-T cells secreting BiTEs circumvent antigen escape without detectable toxicity. *Nature Biotechnology*, (37) 1049-1058
- (182) Ma, L., Dichwalkar, T., Chang, J.Y.H., Cossette, B., Garafola, D., Zhang, A.Q., Fichter, M., Wang, C., Liang, S., Silva, M., Kumari, S., Mehta, N.K., Abraham, W., Thai, N., Li, N., Wittrup, K.D., Irvine, D.J., (2019), Enhanced CAR-T cell activity against solid tumors by vaccine boosting through the chimeric receptor. *Science*, (365) 162-168
- (183) Krause, A., Guo, H.F., Latouche, J.B., Tan, C., Cheung, N.K., Sadelain, M., (1998), Antigen-dependent CD28 signaling selectively enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, (188) 619-626
- (184) Prosser, M.E., Brown, C.E., Shami, A.F., Forman, S.J., Jensen, M.C., (2012), Tumor PD-L1 co-stimulates primary human CD8(+) cytotoxic T cells modified to express a PD1:CD28 chimeric receptor. *Molecular Immunology*, (51) 263-272
- (185) Chang, Z.L., Lorenzini, M.H., Chen, X., Tran, U., Bangayan, N.J., Chen, Y.Y., (2018), Rewiring T-cell responses to soluble factors with chimeric antigen receptors. *Nature Chemical Biology*, (14) 317-324
- (186) Gust, J., Hay, K.A., Hanafi, L.A., Li, D., Myerson, D., Gonzalez-Cuyar, L.F., Yeung, C., Liles, W.C., Wurfel, M., Lopez, J.A., Chen, J., Chung, D., Harju-Baker, S., Ozpolat, T., Fink, K.R., Riddell, S.R., Maloney, D.G., Turtle, C.J., (2017), Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells. *Cancer Discovery*, (7) 1404-1419
- (187) Kochenderfer, J.N., Dudley, M.E., Feldman, S.A., Wilson, W.H., Spaner, D.E., Maric, I., Stetler-Stevenson, M., Phan, G.Q., Hughes, M.S., Sherry, R.M., Yang, J.C., Kammula, U.S., Devillier, L., Carpenter, R., Nathan, D.A., Morgan, R.A., Laurencot, C., Rosenberg, S.A., (2012), B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigenreceptor-transduced T cells. *Blood*, (119) 2709-2720
- (188) Roybal, K.T., Rupp, L.J., Morsut, L., Walker, W.J., McNally, K.A., Park, J.S., Lim, W.A., (2016), Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. *Cell*, (164) 770-779
- (189) Kloss, C.C., Condomines, M., Cartellieri, M., Bachmann, M., Sadelain, M., (2013), Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nature Biotechnology*, (31) 71-75
- (190) Cartellieri, M., Feldmann, A., Koristka, S., Arndt, C., Loff, S., Ehninger, A., von Bonin, M., Bejestani, E.P., Ehninger, G., Bachmann, M.P., (2016), Switching CAR

T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts. *Blood Cancer Journal*, (6) e458

- (191) Viaud, S., Ma, J.S.Y., Hardy, I.R., Hampton, E.N., Benish, B., Sherwood, L., Nunez, V., Ackerman, C.J., Khialeeva, E., Weglarz, M., Lee, S.C., Woods, A.K., Young, T.S., (2018), Switchable control over in vivo CAR T expansion, B cell depletion, and induction of memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (115) E10898-E10906
- (192) Fedorov, V.D., Themeli, M., Sadelain, M., (2013), PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Science Translational Medicine*, (5) 215ra172
- (193) Hay, K.A., Hanafi, L.A., Li, D., Gust, J., Liles, W.C., Wurfel, M.M., Lopez, J.A., Chen, J., Chung, D., Harju-Baker, S., Cherian, S., Chen, X., Riddell, S.R., Maloney, D.G., Turtle, C.J., (2017), Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy. *Blood*, (130) 2295-2306
- (194) Morgan, R.A., Yang, J.C., Kitano, M., Dudley, M.E., Laurencot, C.M., Rosenberg, S.A., (2010), Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular Therapy*, (18) 843-851
- (195) Mestermann, K., Giavridis, T., Weber, J., Rydzek, J., Frenz, S., Nerreter, T., Mades, A., Sadelain, M., Einsele, H., Hudecek, M., (2019), The tyrosine kinase inhibitor dasatinib acts as a pharmacologic on/off switch for CAR T cells. *Science Translational Medicine*, (11) eaau5907
- (196) Weber, E.W., Lynn, R.C., Sotillo, E., Lattin, J., Xu, P., Mackall, C.L., (2019), Pharmacologic control of CAR-T cell function using dasatinib. *Blood Advances*, (3) 711-717
- (197) Cortes, J.E., Saglio, G., Kantarjian, H.M., Baccarani, M., Mayer, J., Boque, C., Shah, N.P., Chuah, C., Casanova, L., Bradley-Garelik, B., Manos, G., Hochhaus, A., (2016), Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naive Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. *Journal of Clinical Oncology*, (34) 2333-2340
- (198) Duong, M.T., Collinson-Pautz, M.R., Morschl, E., Lu, A., Szymanski, S.P., Zhang, M., Brandt, M.E., Chang, W.C., Sharp, K.L., Toler, S.M., Slawin, K.M., Foster, A.E., Spencer, D.M., Bayle, J.H., (2019), Two-Dimensional Regulation of CAR-T Cell Therapy with Orthogonal Switches. *Molecular Therapy Oncolytics*, (12) 124-137
- (199) Priyadharshini, B., Thornley, T.B., Daniels, K.A., Cuthbert, A., Welsh, R.M., Greiner, D.L., Brehm, M.A., (2013), Alloreactive CD8 T cells rescued from apoptosis during co-stimulation blockade by Toll-like receptor stimulation remain susceptible to Fas-induced cell death. *Immunology*, (138) 322-332
- (200) Nguyen, L.S., Vautier, M., Allenbach, Y., Zahr, N., Benveniste, O., Funck-Brentano, C., Salem, J.E., (2019), Sirolimus and mTOR Inhibitors: A Review of Side Effects and Specific Management in Solid Organ Transplantation. *Drug Safety*, (42) 813-825
- (201) Yost, K.E., Satpathy, A.T., Wells, D.K., Qi, Y., Wang, C., Kageyama, R., McNamara, K.L., Granja, J.M., Sarin, K.Y., Brown, R.A., Gupta, R.K., Curtis, C., Bucktrout, S.L., Davis, M.M., Chang, A.L.S., Chang, H.Y., (2019), Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade. *Nature Medicine*, (25) 1251-1259
- (202) Eyquem, J., Mansilla-Soto, J., Giavridis, T., van der Stegen, S.J., Hamieh, M., Cunanan, K.M., Odak, A., Gonen, M., Sadelain, M., (2017), Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*, (543) 113-117

- (203) Stripecke, R., Carmen Villacres, M., Skelton, D., Satake, N., Halene, S., Kohn, D., (1999), Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy. *Gene Therapy*, (6) 1305-1312
- (204) Koelsch, K.A., Wang, Y., Maier-Moore, J.S., Sawalha, A.H., Wren, J.D., (2013), GFP affects human T cell activation and cytokine production following in vitro stimulation. *PloS One*, (8) e50068
- (205) Shemiakina, II, Ermakova, G.V., Cranfill, P.J., Baird, M.A., Evans, R.A., Souslova, E.A., Staroverov, D.B., Gorokhovatsky, A.Y., Putintseva, E.V., Gorodnicheva, T.V., Chepurnykh, T.V., Strukova, L., Lukyanov, S., Zaraisky, A.G., Davidson, M.W., Chudakov, D.M., Shcherbo, D., (2012), A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity. *Nature Communications*, (3) 1204
- (206) Silva, D.A., Yu, S., Ulge, U.Y., Spangler, J.B., Jude, K.M., Labao-Almeida, C., Ali, L.R., Quijano-Rubio, A., Ruterbusch, M., Leung, I., Biary, T., Crowley, S.J., Marcos, E., Walkey, C.D., Weitzner, B.D., Pardo-Avila, F., Castellanos, J., Carter, L., Stewart, L., Riddell, S.R., Pepper, M., Bernardes, G.J.L., Dougan, M., Garcia, K.C., Baker, D., (2019), De novo design of potent and selective mimics of IL-2 and IL-15. *Nature*, (565) 186-191
- (207) Sockolosky, J.T., Trotta, E., Parisi, G., Picton, L., Su, L.L., Le, A.C., Chhabra, A., Silveria, S.L., George, B.M., King, I.C., Tiffany, M.R., Jude, K., Sibener, L.V., Baker, D., Shizuru, J.A., Ribas, A., Bluestone, J.A., Garcia, K.C., (2018), Selective targeting of engineered T cells using orthogonal IL-2 cytokine-receptor complexes. *Science*, (359) 1037-1042

6 Anhang

6.1 Vektorkarten

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Vektorkarten mit pcDNA3.1 *backbone* von Invitrogen aufgeführt. Die Expressionskassetten sind grau und wichtige Restriktionsschnittstellen rot markiert.



Ergänzende Abb. 1: Vektorkarte von pcDNA3.1- GvHH-IL-12Rβ1 (vgl. Abschnitt 3.1.1).



Ergänzende Abb. 2: Vektorkarte von pcDNA3.1-CvHH-IL-23R (vgl. Abschnitt 3.1.2).



Ergänzende Abb. 3: Vektorkarte von pMK-SyCyR(IL-23/2A) (vgl. Abschnitt 3.1.3).



Ergänzende Abb. 4: Vektorkarte von pcDNA3.1-GFP (vgl. Abschnitt 3.2.1).

Danksagung

Mein Dank gebührt in erster Linie meinem Doktorvater, Professor Jürgen Scheller, der mir die Möglichkeit für diese Doktorarbeit gab und mich in die Welt der Wissenschaft einführte. Ich werde ihm für seine hervorragende und geduldige Betreuung ewig dankbar sein.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Doreen Manuela Floss, die meine Begeisterung für die Forschung entfachte und nachhaltig prägte. Ich danke ihr für die einzigartige, jahrelange und bis heute immerwährende Unterstützung, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglichte.

Einen großen Dank möchte ich Dr. Erika Engelowski aussprechen, für ihre wertvolle Hilfe und das unermüdliche, unvergleichbare Vorantreiben des SyCyR-Projekts. Ohne sie wäre dieser Erfolg nicht möglich gewesen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen Beteiligten des Projekts und der damit verbundenen Publikation, vor allem bei Dr. Manuel Franke, Professor Philipp Lang und Dr. Haifeng Xu. Den vielen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II, besonders Petra Oprée-Jeremic, möchte ich an dieser Stelle ebenso für die tolle Zusammenarbeit danken.

Mein letzter, mir persönlich sehr wichtiger Dank geht an meine Familie, meine Eltern und meine Brüder. Für die Liebe, Kraft und Überzeugung, die sie mir jeden Tag geben, um das zu erreichen, was mir sonst unmöglich wäre.