

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

Synthetische Rezeptorbiologie als Werkzeug zur Erforschung von
Zytokin- und Wachstumsfaktorrezeptoren

Entwicklung synthetischer IL-22R, IL-27R, IL-39R und EGFR

Dissertation

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

vorgelegt von
Marcus Kuchner

2023

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Lang

"Alles Leben ist Problemlösen" (Karl Popper)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Mossner S*, **Kuchner M***, Fazel Modares N, Knebel B, Al-Hasani H, Floss DM, Scheller J. Synthetic interleukin 22 (IL-22) signaling reveals biological activity of homodimeric IL-10 receptor 2 and functional cross-talk with the IL-6 receptor gp130. *Journal of Biological Chemistry* 2020 Aug 28;295(35):12378-12397. doi: 10.1074/jbc.RA120.013927

* these authors contributed equally

1 Zusammenfassung

Synthetische Biologie umfasst die Veränderung vorhandener oder neuer biologischer Systeme, um sie in vorhersagbarer Weise nutzbar zu machen. Sie bietet Chancen sowohl für die Grundlagenforschung wie auch den klinischen Einsatz. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einsatz synthetischer Zytokinrezeptoren (*Synthetic Cytokine Receptors* = SyCyRs). Zytokine binden an spezifische Rezeptoren und induzieren dadurch intrazellulär eine Signalgebung. Dies geschieht über assoziierte Januskinasen oder im Falle der Wachstumsfaktoren über eine intrinsische Kinaseaktivität. Eine Aufschlüsselung der Signalwege und Funktionen einzelner Zytokin-Rezeptorkomplexe gestaltet sich schwierig, da manche Zytokine nicht nur an einen Rezeptor binden und ein Rezeptor wiederum von verschiedenen Zytokinen geteilt werden kann. Zytokine haben Einfluss auf nahezu alle biologischen Vorgänge und sind für das Immunsystem von fundamentaler Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein System aus synthetischen Zytokinrezeptoren genutzt werden, um die Problematik der gemeinsam verwendeten Rezeptoren bei der Erforschung von Zytokinen zu umgehen. Hierbei wird ein hochspezifisches, modulares System aus synthetischen Rezeptoren und Liganden verwendet, um Signalwege zu phänokopieren. Die Entwicklung und weitere Etablierung synthetischer Rezeptoren stellen einen wichtigen Schritt für die Optimierung zellulärer Therapien dar. In der klinischen Praxis werden Rezeptoren wie der synthetische *chimeric antigen receptor* (CAR) verwendet, welcher in T-Zellen eingebracht wird, um tumorspezifische Immunantworten zu induzieren. Hierbei stellen teils schwere Nebenwirkungen oder ein mangelndes Überleben der CAR-T-Zellen eine relevante Problematik dar. Die weitere Entwicklung und Verbesserung synthetischer Systeme birgt Potenzial für die Grundlagenforschung zum besseren Verständnis von Zytokinrezeptoren. Sie zeigt darüber hinaus Perspektiven für die Entwicklung moderner, hochspezifischer Therapien auf.

2 Summary

Synthetic biology involves the modification of existing or new biological systems to render them useful in a predictable way. It offers opportunities for both basic research and clinical applications. The following work focuses on the use of synthetic cytokine receptors (SyCyRs). Cytokines bind to specific receptors and thereby induce intracellular signaling. This occurs via associated Janus kinases or in the case of growth factors via intrinsic kinase activity. Since some cytokines do not bind to only one receptor and one receptor in turn can be shared by different cytokines, a breakdown of the signaling pathways and functions of individual cytokine-receptor complexes is difficult. Cytokines influence almost all biological processes and are of fundamental importance for the immune system. In this work, a system of synthetic cytokine receptors will be used to circumvent the problem of shared receptors in cytokine research. Here, a highly specific, modular system of synthetic receptors and ligands will be used to phenocopy signaling pathways. The development and further establishment of synthetic receptors represent an important step in the optimization of cellular therapies. In clinical practice, receptors such as the synthetic chimeric antigen receptor (CAR) are used, which is introduced into T cells to induce tumor-specific immune responses. In this context, sometimes severe side effects or a lack of survival of the CAR T cells represent a relevant problem. The further development and improvement of synthetic systems holds potential for basic research to better understand cytokine receptors. Furthermore, it shows perspectives for the development of modern, highly specific therapies.

3 Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|--------------------------------|--|------------------|--|
| 4-1BB | <i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 9</i> | FACS | <i>fluorescence activated cell sorting</i> |
| AKT | Proteinkinase B | Fc | <i>fragment crystallizable</i> |
| AP | alkalische Phosphatase | FCS | fötales Kälberserum |
| APS | Ammoniumpersulfat | G | GFP |
| AREG | Amphiregulin | GG | 2x-GFP |
| BCA | Bicinchoninsäure | GC | GFP-mCherry |
| bp | Basenpaare | GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| BSA | bovines Serumalbumin | gp130 | Glykoprotein 130 |
| BTC | Betacellulin | G _{VHH} | anti-GFP-VHH |
| C | mCherry | HB-EGF | <i>Heparin-binding-EGF</i> |
| CC | 2x-mCherry | HIL-6 | Hyper-IL-6 |
| CAR | <i>chimeric antigen receptor</i> | Hygro | Hygromycin B |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> | IFN | Interferon |
| CHO-K1 | <i>chinese hamster ovary cell K1</i> | Ig | Immunglobulin |
| C _{VHH} | anti-mCherry-VHH | IL | Interleukin |
| H ₂ O _{dd} | <i>double-distilled water</i> | IL-22BP | <i>IL-22 binding protein</i> |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> | ILC3 | <i>group 3 innate lymphoid cell</i> |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat | Jak | Januskinase |
| EBI3 | <i>Epstein-Barr virus induced gene 3</i> | JNK | <i>c-Jun N-terminal kinase</i> |
| ECD | extrazelluläre Domäne | kDa | Kilodalton |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat | LB | <i>lysogeny broth</i> |
| EGFR | <i>epidermal growth factor receptor</i> | MAPK | <i>mitogen-activated protein kinase</i> |
| EPGN | Epigen | NK-Zelle | natürliche Killerzellen |
| Epo | Erythropoietin | PBS | <i>phosphate-buffered saline</i> |
| ErbB | <i>receptor tyrosine-protein kinase erbB</i> | PCR | Polymerasekettenreaktion |
| EREG | Epiregulin | PD-1 | <i>programmed cell death protein 1</i> |
| ERK | <i>extracellular signal regulated Kinase</i> | PD-L1 | <i>programmed cell death 1 ligand 1</i> |
| | | PEG | Polyethylenglycol |
| | | PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| | | Puro | Puromycin |
| | | PVDF | Polyvinylidenfluorid |

| | | | |
|----------|---|-----------------------|--|
| R | Rezeptor | SyCyR | <i>synthetic cytokine receptor</i> |
| RT | Raumtemperatur | TAE | <i>tris-acetate-EDTA</i> |
| scFv | <i>single chain fragment variable</i> | TBS | <i>tris-buffered saline</i> |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulphate</i> | TBS-T | <i>tris-buffered saline with Tween20</i> |
| SDS-PAA | <i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide</i> | TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| SDS-PAGE | <i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i> | TGF- β | <i>transforming growth factor-β</i> |
| sIL-6R | löslicher IL-6 Rezeptor | T _H -Zelle | T-Helferzelle |
| SOCS | <i>supressor of cytokine signalling</i> | Treg | regulatorische T-Zelle |
| STAT | <i>signal transducer and activator of transcription</i> | Tyk2 | Tyrosinkinase der Janus-Familie |
| | | VHH | <i>variable heavy chain domain</i> |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|------------|
| 1 | Zusammenfassung | I |
| 2 | Summary | II |
| 3 | Abkürzungsverzeichnis | III |
| 4 | Einleitung | 1 |
| 4.1 | Biologie und Physiologie zytokinvermittelter Signalgebung | 1 |
| 4.2 | Synthetische Rezeptorbiologie in der Grundlagenforschung und klinischen Anwendung | 2 |
| 4.3 | Die IL-12-Familie | 6 |
| 4.3.1 | Struktur und Signaltransduktion von IL-27 | 7 |
| 4.3.2 | Biologie und Funktionen von IL-27 | 9 |
| 4.3.3 | IL-39, der jüngste Vertreter der IL-12-Familie | 10 |
| 4.4 | Die IL-10-Familie | 11 |
| 4.5 | IL-22-vermittelte Signalgebung | 13 |
| 4.5.1 | IL-22 <i>in vivo</i> -Funktionen und Bedeutung für Krankheit und Therapie | 13 |
| 4.6 | Epidermal growth factor receptor (EGFR) – Biologie und Signaltransduktion | 14 |
| 4.7 | Ziele der Arbeit | 17 |
| 5 | Material und Methoden | 19 |
| 5.1 | Material | 19 |
| 5.1.1 | Antibiotika | 19 |
| 5.1.2 | Antikörper | 19 |
| 5.1.3 | Chemikalien und Verbrauchsmaterialien | 21 |
| 5.1.4 | Geräte und Kits | 23 |
| 5.1.5 | Kulturmedien, Lösungen und Puffer | 25 |
| 5.1.6 | Oligonukleotide | 27 |
| 5.1.7 | Zelllinien und Bakterienstämme | 28 |
| 5.1.8 | Zytokine und rekombinante Proteine | 29 |
| 5.2 | Molekularbiologische Methoden | 29 |
| 5.2.1 | Herstellung und Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli XL1-Blue</i> | 29 |
| 5.2.2 | Amplifikation und Präparation bakterieller Plasmid-DNA | 30 |
| 5.2.3 | Konzentrationsmessung von Plasmid-DNA | 31 |
| 5.2.4 | Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA | 31 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5.2.5 | Dephosphorylierung der linearisierten Plasmide | 32 |
| 5.2.6 | Polymerasekettenreaktion (PCR)..... | 32 |
| 5.2.7 | Ligation von DNA | 34 |
| 5.2.8 | Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNA | 35 |
| 5.2.9 | DNA-Sequenzierung | 36 |
| 5.3 | Zellbiologische Methoden | 36 |
| 5.3.1 | Kultivierung der Zelllinien | 36 |
| 5.3.2 | Transfektion von Phoenix-Eco Zellen und retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen..... | 37 |
| 5.3.3 | Durchflusszytometrie..... | 38 |
| 5.3.4 | Zellviabilitätsassay | 39 |
| 5.3.5 | Stimulationsassay | 40 |
| 5.4 | Proteinbiochemische Methoden | 40 |
| 5.4.1 | Herstellung von Zelllysaten | 40 |
| 5.4.2 | Bestimmung des Proteingehalts mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay | 41 |
| 5.4.3 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot | 41 |
| 6 | Ergebnisse..... | 44 |
| 6.1 | Konstruktion und Klonierung der SyCyRs | 44 |
| 6.1.1 | Konstruktion eines SyCyRs..... | 44 |
| 6.1.2 | Klonierungsstrategie zur Konstruktion der verschiedenen SyCyRs für den IL-10R2, IL-22R α 1, WSX-1, gp130 und EGFR | 45 |
| 6.2 | IL-22-SyCyR phänokopiert den Wildtyp-IL-22R in Ba/F3-gp130-Zellen..... | 49 |
| 6.2.1 | IL-10R2-Homodimere zeigen biologische Aktivität in Ba/F3-gp130-Zellen, nicht jedoch IL-22R α 1-Homodimere..... | 55 |
| 6.2.2 | Gp130 bildet funktionelle Heterodimere mit IL-10R2 und IL-22R α 1..... | 58 |
| 6.3 | Der synthetische IL-27R führt zu Proliferation in Ba/F3-gp130-Zellen | 63 |
| 6.4 | IL-39-SyCyR ist biologisch aktiv | 65 |
| 6.5 | EGF-SyCyR führt zu Signalgebung im Western Blot, nicht aber zu Proliferation in Ba/F3-gp130-Zellen | 67 |
| 6.6 | EGFR/gp130-Heterodimere zeigen keine biologische Aktivität | 70 |
| 7 | Diskussion..... | 74 |
| 7.1 | Die biologische Aktivität von SyCyRs..... | 74 |
| 7.1.1 | Dimerisierung als kritischer Schritt der Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren..... | 74 |
| 7.1.2 | IL-22R-vermittelte Signalgebung konnte erfolgreich phänokopiert werden..... | 75 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 7.1.3 | IL-10R2-Homodimere zeigen trotz fehlender klassischer Signalmotive eine biologische Aktivität..... | 76 |
| 7.1.4 | Synthetische Rezeptorkomplexe des IL-6R, IL-23R, IL-27R und IL-39R zeigen Aktivität und belegen die breite Anwendbarkeit des SyCyR-Systems | 78 |
| 7.1.5 | SyCyRs weisen <i>cross-talk</i> zwischen Rezeptoren der IL-6- und IL-10-Familie nach | 79 |
| 7.1.6 | SyCyRs von Rezeptor-Tyrosinkinasen zeigen anhand des EGFR Aktivität..... | 79 |
| 7.2 | Synthetische Rezeptoren - personalisierte Immuntherapie | 81 |
| 8 | Literaturverzeichnis..... | 85 |
| 9 | Anhang..... | 93 |
| 9.1 | Plasmidkarten, Aminosäuresequenzen und Klonierungsstrategien..... | 93 |
| 9.1.1 | Plasmidkarte von pcDNA3.1-GFP _{VHH} EGFR und Aminosäuresequenz | 93 |
| 9.1.2 | Klonierungsschema für GFP _{VHH} EGFR | 94 |
| 9.1.3 | Plasmidkarte von pcDNA3.1-GFP _{VHH} IL-10R2 und Aminosäuresequenz | 95 |
| 9.1.4 | Klonierungsschema für GFP _{VHH} IL-10R2 | 96 |
| 9.1.5 | Plasmidkarte von pcDNA3.1-GFP _{VHH} IL-22R α 1 und Aminosäuresequenz | 97 |
| 9.1.6 | Klonierungsschema für GFP _{VHH} IL-22R α 1 | 98 |
| 9.1.7 | Plasmidkarte von pcDNA3.1-GFP _{VHH} gp130 und Aminosäuresequenz (28)..... | 99 |
| 9.1.8 | Plasmidkarte von pcDNA3.1-mCherry _{VHH} EGFR und Aminosäuresequenz..... | 100 |
| 9.1.9 | Klonierungsschema für mCherry _{VHH} EGFR..... | 101 |
| 9.1.10 | Plasmidkarte von pcDNA3.1-mCherry _{VHH} gp130 und Aminosäuresequenz | 102 |
| 9.1.11 | Klonierungsschema für mCherry _{VHH} gp130..... | 103 |
| 9.1.12 | Plasmidkarte von pcDNA3.1-mCherry _{VHH} IL-10R2 und Aminosäuresequenz..... | 104 |
| 9.1.13 | Klonierungsschema für mCherry _{VHH} IL-10R2..... | 105 |
| 9.1.14 | Plasmidkarte von pcDNA3.1-mCherry _{VHH} IL-22R α 1 und Aminosäuresequenz | 106 |
| 9.1.15 | Klonierungsschema für mCherry _{VHH} IL-22R α 1 | 107 |
| 9.1.16 | Plasmidkarte von pcDNA3.1-mCherry _{VHH} WSX-1 und Aminosäuresequenz | 108 |
| 9.1.17 | Klonierungsschema für mCherry _{VHH} WSX-1 | 109 |
| 10 | Danksagung..... | 110 |

4 Einleitung

4.1 Biologie und Physiologie zytokinvermittelter Signalgebung

Zytokine sind zwischen 15-20 kDa große Glykoproteine und für die Homöostase des gesamten Organismus von Bedeutung. Sie regulieren kritische Schritte in der Entwicklung von Immunantworten über proinflammatorische oder antiinflammatorische Effekte. Über vielfältige Rezeptoren ermöglichen Zytokine eine interzelluläre Kommunikation und regulieren Funktionen wie Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. Ihre Wirkung entfalten sie über parakrine, autokrine und juxtakrine Sekretion (1). Prinzipiell können alle Zellarten Zytokine ausschütten. Von besonderer Bedeutung sind sie für Zellen der angeborenen und adaptiven Immunität und orchestrieren komplexe immunologische Antworten auf Reize (1). Bei der Entwicklung einer Immunantwort sind sie entscheidend für die Differenzierung von Immunzellen (2, 3). Auf molekularer Ebene lassen sich Zytokine und deren Rezeptoren anhand ihrer strukturellen und funktionellen Merkmale klassifizieren. Zu dem breiten Spektrum der Zytokinrezeptoren gehören Rezeptor-Tyrosinkinasen mit intrinsischer Kinaseaktivität, Klasse I- und Klasse II-Zytokinrezeptoren mit assoziierten Kinasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (1, 4). Zytokine werden anhand ihrer Funktion in Wachstumsfaktoren, Chemokine, Interleukine (IL) und Interferone (IFN) eingeteilt. Sie treten als monomere, dimere oder multimere Komplexe mit anderen Proteinen auf (5, 6). Zu ihnen zählen die Wachstumsfaktoren und Interleukine. Ihre Funktion erfüllen sie in pico- bis nanomolaren Konzentrationen durch Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche (7, 8). Für die Signaltransduktion induzieren Interleukine und Wachstumsfaktoren häufig eine Dimerisierung ihrer Rezeptoren und führen zu einer Aktivierung von Kinasen, welche intrazelluläre Tyrosinreste der Rezeptoren phosphorylieren. Dies kann entweder durch intrinsische Kinaseaktivität des Rezeptors oder im Falle vieler Interleukine durch assoziierte Januskinasen (Jak) geschehen. Die Tyrosinreste dienen als Bindemotive für eine Vielzahl von weiteren Signalmolekülen. So können

grundlegende Signalkaskaden über Jaks und *signal transducer and activator of transcription* (STAT), *extracellular-signal regulated Kinase* (ERK)1/2, p38, *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) und Proteinkinase B (AKT) aktiviert werden (9, 10). Mechanistisch gesehen aktiviert ein Zytokin einen Rezeptor und löst ein spezifisches Muster von Signalwegen aus. Häufig binden sie jedoch mehrere Rezeptoren und üben darüber unterschiedliche Funktionen aus (6, 11). Der Zelltyp, die co-exprimierten Rezeptoren und auch weitere zytokinvermittelte Signale führen zu einer komplexen Integration aller Signale. Dieser sogenannte *cross-talk* erschwert die Untersuchung einzelner Zytokin-Rezeptorpaare enorm (12). Eine isolierte Aktivierung wäre notwendig, um eine genauere Erforschung zuzulassen. Synthetische Modelle, die Hintergrundeffekte ausschalten, spezifisch für einen Rezeptorkomplex und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* anwendbar sind, stellen eine Lösung für diese Problematik dar. Dies ermöglicht, die Signalgebung besser zu verstehen, um beispielsweise tumorfördernde und -inhibierende Mechanismen oder Pharmakoresistenz bestimmter Rezeptoren zu beleuchten. In Zeiten zunehmend personalisierter Medizin und zielgerichteter Therapien birgt synthetische Rezeptorbiologie zudem eine Möglichkeit, innovative Therapien zu entwickeln (3, 13).

4.2 Synthetische Rezeptorbiologie in der Grundlagenforschung und klinischen Anwendung

Synthetische Biologie beschäftigt sich mit der Veränderung und Konstruktion biologischer Systeme, um diese in einer vorhersagbaren Weise nutzbar zu machen (3). Viele Zytokine haben die Fähigkeit, an mehrere Rezeptoren binden zu können. Im Umkehrschluss besitzen manche Rezeptoren mehrere Zytokine als Liganden (12). *Gen-Knockout*-Modelle führen daher stets zu einer Beeinflussung weiterer geteilter Rezeptoren und Zytokine. Um eine spezifischere Erforschung zu ermöglichen, wurden in der Vergangenheit verschiedene Systeme der synthetischen Biologie etabliert (s. Abb. 1). Bereits 1996 verwendeten Hemmann *et al.* synthetische Rezeptoren, um die Signaltransduktion von Glykoprotein130 (gp130), ein Teil des IL-6-Rezeptorkomplexes, zu beleuchten (14). Die

extrazelluläre Domäne von gp130 wurde durch die extrazelluläre Domäne des Erythropoietin- (Epo)R ausgetauscht. Nach Bindung von Epo dimerisieren die Rezeptoren und induzieren intrazellulär eine gp130-vermittelte Signalgebung. Dennoch treten potenziell Hintergrundeffekte auf, da Epo auch an natürliche EpoR binden kann. Zudem ist über dieses System ausschließlich eine Homodimerisierung von Rezeptoren möglich.

Ein weiteres System wurde von Floss *et al.* entwickelt, um Signalwege von IL-35 und IL-39 zu erforschen. Beide Zytokine standen bisher nicht als aktive rekombinante Proteine zur Verfügung. Sogenannte Rezeptor-Chimären dienten als Hilfsmittel zur Analyse ihrer Signalwege. Hierbei erfolgte der Austausch von extrazellulären Domänen (ECD) bisher beschriebener IL-35- und IL-39-Rezeptorkomplexe durch die ECD des IL-23- bzw. IL-12-Rezeptorkomplexes, sodass über IL-12 oder IL-23 eine intrazelluläre IL-35- oder IL-39-Signalgebung phänokopiert und analysiert werden konnte (11, 15, 16).

Syntheticines stellen ein weiteres Modell synthetischer Rezeptoraktivierung dar. Ein Zytokin weist in der Regel zwei Bindestellen für Rezeptoren auf. Wird eine dieser Bindestellen mutiert, sodass sie nicht mehr an ihren Rezeptor binden kann, wird das Zytokin als dominant negativ bezeichnet. Die Fusion zweier dominant negativer Zytokine lässt ein *Syntheticine* entstehen, welches die Assoziation neuartiger Rezeptorkombinationen ermöglicht. Hierüber lassen sich Zytokine entwickeln, deren Zellspezifität und Funktionen sich von ihren natürlichen Gegenstücken unterscheiden (17). Dies eröffnet ein breites Feld, spezifische Funktionen von synthetischen Zytokinen zu erforschen und klinisch nutzbar zu machen.

Neben diesen Systemen aus der Grundlagenforschung gibt es auch synthetische Rezeptoren in der klinischen Anwendung. Hierzu zählt die *chimeric antigen receptor-* (CAR)-T-Zell-Therapie. Aus dem Blut des Patienten/der Patientin werden T-Zellen isoliert und mittels retroviraler Transduktion oder Elektroporation der CAR eingebracht (18, 19). Die extrazelluläre Domäne beinhaltet in der Regel ein gegen Oberflächenantigene gerichtetes *single chain fragment variable* (scFv) aus dem variablen Anteil der schweren und leichten Kette eines Antikörpers. Dem Fragment folgen ein flexibler *spacer*, die Transmembrandomäne und eine intrazelluläre *cluster of differentiation* (CD)3ζ-Kette und kostimulatorische Moleküle, welche die

Aktivierung der CAR-T-Zellen vermitteln (20). Nach Bindung des Antigens können CAR-T-Zellen Cluster bilden, werden aktiviert und führen so über T-Zell-vermittelte Zytotoxizität zum Untergang der Tumorzellen (3, 21). Von der *U.S. Food and Drug Administration* wurde mit Tisagenlecleucel 2017 die erste zelluläre Therapie mit CAR für die Behandlung der akuten lymphatischen B-Zell-Leukämie und dem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom zugelassen (22, 23). Herausforderungen der CAR-T-Zell-Therapie stellen die teils lebensbedrohlichen Nebenwirkungen dar, darunter Neurotoxizität und das sogenannte *cytokine release syndrome*, welches bei bis zu 77% der Patienten auftritt (22, 24). Diverse Ansätze wurden entwickelt, um die teils schweren Nebenwirkungen zu behandeln oder die CAR-T-Zellen zu modifizieren. Darunter fanden sich viele weitere synthetische Ansätze, die als molekulare Schalter CAR-T-Zellen inhibieren oder zur Apoptose zwingen können (25, 26).

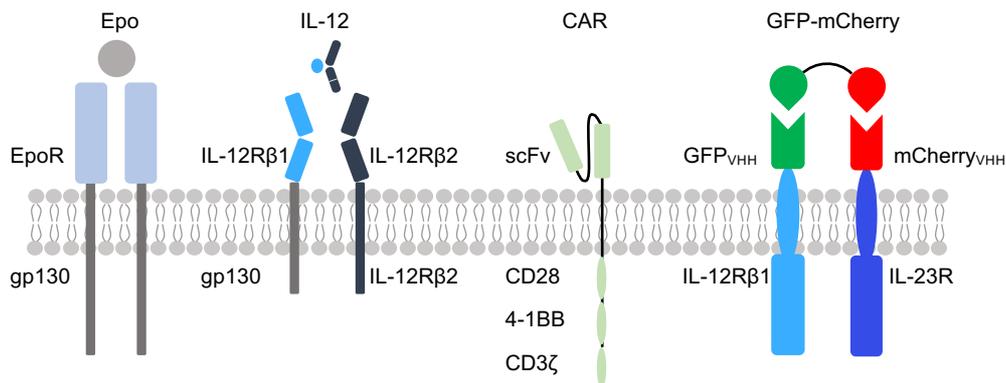


Abbildung 1: Übersicht über synthetische Rezeptoren.

Von links nach rechts: Der extrazelluläre Teil des EpoR wurde an gp130 fusioniert, um gp130-Signalgebung zu vermitteln (14). Die extrazelluläre Domäne des IL-12Rβ1 wurde an gp130 (grau) fusioniert, um intrazelluläre IL-35-Signalgebung zu untersuchen (11). Der CAR besteht aus einem extrazellulären antigenbindenden scFv. Intrazellulär befinden sich je nach Rezeptor verschiedene aktivierende Domänen wie CD28, 4-1BB und CD3ζ (27). Beim SyCyR-System wurden die extrazellulären Domänen des IL-12Rβ1 und IL-23R jeweils durch antigenspezifische nanobodies/VHH gegen GFP und mCherry ausgetauscht. Über Bindung des dimeren Fusionsproteins GFP-mCherry kann so intrazellulär IL-23-Signalgebung phänokopiert werden (28). Die Abbildung wurde mit Microsoft PowerPoint generiert.

Ein Rezeptorsystem, welches durch synthetische Liganden aktiviert und inhibiert werden kann, wurde von Engelowski *et al.* entwickelt. Es ermöglicht zytokinabhängige Signalgebung *in vitro* und *in vivo* zu phänokopieren. Hierbei wurde die extrazelluläre Domäne der Rezeptoren durch einen *nanobody*

ausgetauscht (28). Kamele und Knorpelfische sind in der Lage, besonders kleine dimere Antikörper aus zwei identischen schweren Ketten zu bilden (s. Abb. 2) (29, 30). Anders als herkömmliche Antikörper besteht ihre variable, antigenbindende Domäne nicht aus einem Dimer, sondern einem Monomer, dem sogenannten *nanobody* oder *variable heavy chain domain* (VHH) (31).

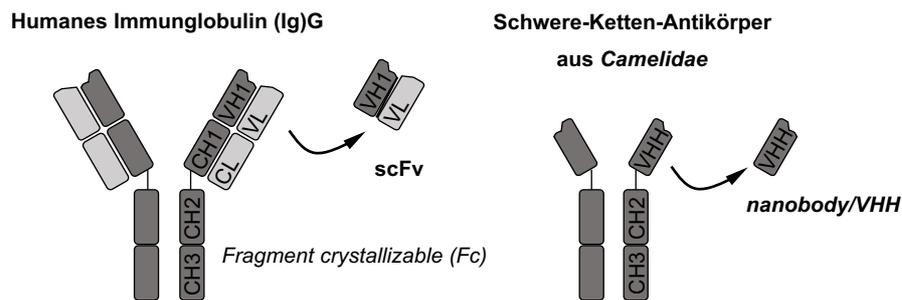


Abbildung 2: Vergleich zwischen dem Aufbau eines humanen IgG und eines schweren-Ketten-Antikörpers aus *Camelidae* (Kamelen), von welchem sich die *nanobodies*/VHH ableiten. Die Abbildung wurde mit PowerPoint erstellt und modifiziert nach Zhang et al. (19).

Bei dem vorliegenden SyCyR-System werden die extrazellulären Domänen der Rezeptoren durch je einen *nanobody* ausgetauscht. Dieser richtet sich gegen mCherry oder grün fluoreszierendes Protein (GFP) (32, 33). Letztere sind häufige in der Molekularbiologie eingesetzte kleine Polypeptide, die sich durch ihre Fluoreszenz auszeichnen (34, 35). GFP und mCherry wurden mittels Aminosäurelinker verbunden und konnten eine Dimerisierung der Rezeptoren auslösen. Die intrazellulären Teile der zu untersuchenden Zytokinrezeptoren vermitteln anschließend die Signalgebung (28). Dieses System nutzt als einziges sowohl synthetische Rezeptoren als auch synthetische Liganden. Hierdurch besitzt es eine hohe Spezifität und praktisch keine Hintergrundaktivität. Die verwendeten Liganden binden nur an ihre spezifischen Rezeptoren und sind nicht-toxisch (36, 37). Über dieses System konnte sowohl *trans*-Phosphorylierung von Jak-assoziierten Rezeptoren nachgewiesen werden als auch neue aktive Rezeptorkomplexe entdeckt werden (28). Funktionen von Zytokinen können zellspezifisch untersucht werden und Hintergrundeffekte von anderen Zytokinen oder *cross-talk* als potenzielle Störfaktoren ausgeschaltet werden.

Für die CAR-T-Zell-Therapie ist das synthetische System von Engelowski *et al.* von Interesse, da hiermit ein Prinzip etabliert wurde, mit dem Zellen auch *in vivo* hochspezifisch aktiviert oder inhibiert werden, ohne Auswirkungen auf andere Zellen zu haben. Dies kann als *on/off*-Schalter für CAR-T-Zellen dienen, mit dem ein verlängertes Überleben induziert wird oder aber über Inhibition Nebenwirkungen wie das *cytokine release syndrome* begrenzt werden.

Die synthetische Biologie eröffnet zahlreiche Möglichkeiten, die über die Grundlagenforschung hinausreichen und innovative Ansätze für klinische Anwendung zellulärer Therapien bieten. Im Rahmen dieser Arbeit soll dieses Potenzial weiter ausgeschöpft und synthetische Rezeptorbiologie für verschiedene Familien von Interleukinen sowie von Wachstumsfaktoren etabliert werden.

4.3 Die IL-12-Familie

Interleukine werden anhand ihrer Struktur und der verwendeten Rezeptoren in Familien eingeteilt. Dies erleichtert den Überblick über die Vielzahl an Liganden und Rezeptoren. Funktionell gesehen können innerhalb der Familie jedoch diametrale Unterschiede zwischen den Vertretern bestehen. Im Folgenden wird sich mit der IL-12-Familie und im Besonderen mit IL-27 und IL-39 befasst, welche von Bedeutung für Inflammation, Tumorigenese und T-Zell-Entwicklung sind (2, 38).

Gemeinsames strukturelles Merkmal der Zytokine der IL-12-Familie ist die Bildung von Heterodimeren. Sie bestehen aus einer α -Untereinheit und einer β -Untereinheit, die im Falle von IL-12 und IL-23 über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die α -Untereinheiten dieser Familie sind IL-12p35, IL-23p19 oder IL-27p28, die β -Untereinheiten IL-12p40 oder *Epstein-Barr virus induced gene 3* (EBI3). Bisherige Vertreter dieser Familie sind IL-12 (IL-12p35/IL-12p40), IL-23 (IL-23p19/IL-12p40), IL-27 (IL-27p28/EBI3), IL-35 (IL-12p35/EBI3) und IL-39 (IL-23p19/EBI3) und das bisher nur synthetisch konstruierte IL-Y (IL-12p40/IL-27p28) (5, 15, 16, 39, 40). Die Rezeptoren dieser Familie bestehen aus IL-12R β 1, IL-12R β 2, IL-23R, WSX-1 sowie gp130. Durch die Verwendung von gp130, auch als *interleukin-6 signal transducer* bezeichnet, besteht eine Überschneidung mit der IL-6-Familie, weswegen in der Literatur gelegentlich von der IL-6/IL-12-(Super)Familie gesprochen wird (6). Ihre

Rezeptoren gehören zu den sogenannten Klasse I-Zytokinrezeptoren. Sie besitzen im Unterschied zu Klasse II-Zytokinrezeptoren extrazellulär ein konserviertes WSXWS-Aminosäuremotiv (41).

Mitglieder der IL-12 Familie sind von besonderem klinischem Interesse, da sie pathophysiologisch in einer Reihe immunvermittelter Erkrankungen eine Rolle spielen. IL-12 und IL-23 sind Ziel der Antikörper Ustekinumab und Risankizumab, die sowohl für die Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen als auch der Psoriasis vulgaris bedeutsam sind (42-45).

Bisher fand IL-27 in der Erforschung der IL-12-Familie weniger Beachtung, obwohl es Potenzial für die Anwendung bei Tumorthapien und Autoimmunerkrankungen birgt. Die Funktionen von IL-39, des jüngsten Vertreters der IL-12-Familie, sind bisher kaum bekannt. Bisherige Daten deuten auf eine Rolle in der Pathogenese des Lupus erythematodes hin (16). Bisher beschränken sich die Daten jedoch auf murine Modelle (46, 47). Aus funktioneller Sicht ist die IL-12-Familie sehr heterogen, obwohl zahlreiche Rezeptoren und Zytokinuntereinheiten untereinander geteilt werden.

4.3.1 Struktur und Signaltransduktion von IL-27

IL-27 und IL-39 unterscheiden sich von den übrigen Mitgliedern der IL-12 Familie, da sie gp130 als Untereinheit ihrer Rezeptorkomplexe verwenden (16, 48). Dies ist der bis auf wenige Ausnahmen gemeinsam verwendete Rezeptor von Zytokinen der IL-6-Familie (6).

IL-27 besteht, wie die übrigen Mitglieder der IL-12-Familie, aus zwei Untereinheiten (s. Abb. 3). Die α -Untereinheit IL-27p28 ist strukturell dem IL-6 ähnlich, die β -Untereinheit EBI3 dem löslichen IL-6 Rezeptor (sIL-6R) (49-51). IL-27 bindet an die beiden membranständigen Rezeptoren WSX-1 und gp130 (48). Nach Bindung von IL-27 an WSX-1 wird gp130 rekrutiert und es erfolgt über intrazellulär assoziierte Jaks eine Phosphorylierung von Tyrosinresten (52-54). Diese dienen als Bindestellen für STAT-Moleküle, die ebenfalls phosphoryliert werden und als Transkriptionsfaktoren wirken. IL-27-Signalgebung geschieht vornehmlich über STAT1, STAT3, wurde aber auch für STAT5 und STAT6 beschrieben (55-57).

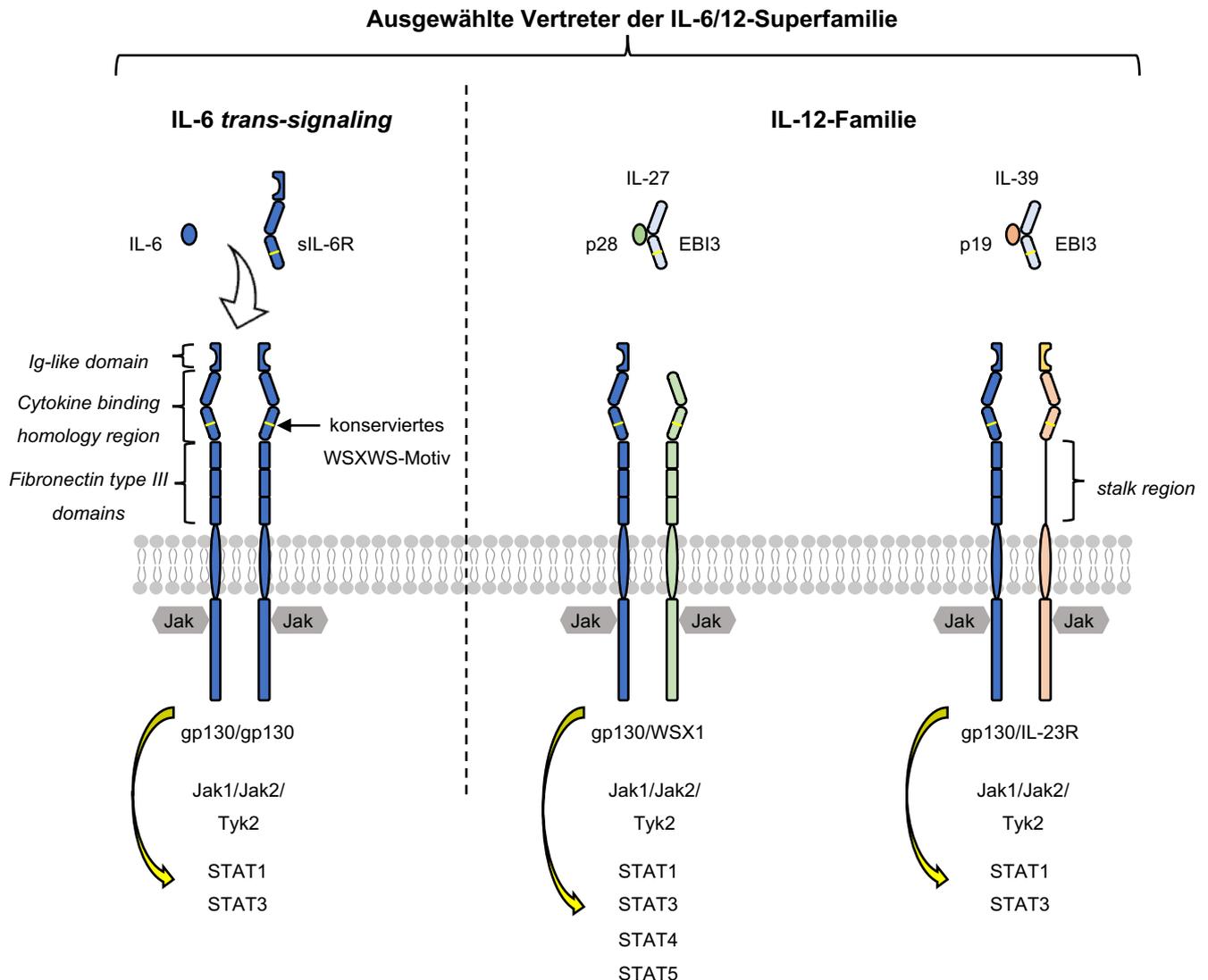


Abbildung 3: IL-6 trans-signaling und IL-27 sowie IL-39 als Vertreter der IL-12-Familie.

Schematische Darstellung von IL-6 trans-signaling im Vergleich zur Signalgebung von IL-27 und IL-39. Gemeinsame strukturelle Merkmale zeigen sich im Aufbau der extrazellulären Domänen sowie dem konservierten WSXWS-Aminosäuremotiv der Rezeptoren.

Beim IL-6 trans-signaling bindet IL-6 an den sIL-6R. Anschließend werden von IL-6/sIL-6R membranständige gp130 gebunden. Letztere bewirken über die assoziierten Jaks eine Phosphorylierung von STAT-Molekülen und aktivieren zahlreiche weitere Signalkaskaden (hier nicht dargestellt). Gemeinsames Merkmal von IL-27 und IL-39 als Vertreter der IL-12-Familie ist die dimere Zusammensetzung aus einem sIL-6R-ähnlichen Molekül, dem EBI3. Beide sind nichtkovalent entweder mit p19 oder p28 verbunden. IL-27 bindet den heterodimeren Rezeptor aus gp130/WSX-1, während IL-39 den heterodimeren Rezeptor aus gp130/IL-23R bindet. Die Überschneidung dieser Mitglieder mit der IL-6-Familie wird über die gemeinsame Verwendung von gp130 in deren Rezeptorkomplexen und dem ähnlichen Aufbau der Zytokine deutlich. Häufig wird darum auch von der IL-6/IL-12-(Super)Familie gesprochen.

Die Abbildung wurde mit Microsoft PowerPoint generiert und modifiziert nach Fabbi *et al.* (58).

Neben STAT-Molekülen kann IL-27 ebenfalls p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-, ERK- und AKT-Signalwege aktivieren (57). Da gp130 ubiquitär vorkommt,

ist die Expression von WSX-1 entscheidend, damit Zelltypen IL-27-Signalgebung vermitteln können (59, 60). WSX-1 wird vor allem von Immunzellen wie T- und B-Lymphozyten, Monozyten, Mastzellen, natürlichen Killer (NK)-Zellen, dendritischen Zellen und Neutrophilen exprimiert. Allerdings zeigen gastrointestinale Epithelzellen und Endothelzellen ebenso eine Expression von WSX-1 (48, 57). Zelluläre Ziele von IL-27 sind demnach bei Immunzellen und teils gastrointestinal zu verorten. Als Quelle von IL-27 gelten ebenso Immunzellen wie aktivierte dendritische Zellen oder Makrophagen (61-63).

4.3.2 Biologie und Funktionen von IL-27

IL-27 besitzt funktionell in vielerlei Hinsicht eine ambivalente Rolle. Initial wurde es als proinflammatorisches Zytokin beschrieben, welches vor allem T_H1 -gewichtete Immunantworten begünstigt. Gleichzeitig inhibiert es die Differenzierung von T_H2 - und T_H17 -Zellen (50, 64-66). T_H1 -Immunantworten sind bei der Abwehr intrazellulärer Erreger und Viren von fundamentaler Bedeutung und stimulieren über Interferon- γ (IFN- γ) die Aktivität von Makrophagen (67). Die inhibitorische Funktion von IL-27 auf T_H17 -Zellen ist von Interesse, da T_H17 -Zellen gehäuft in pathologischen Prozessen wie Autoimmunität und -inflammation involviert sind. Sie spielen in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, multipler Sklerose und Psoriasis eine pathophysiologisch relevante Rolle (68, 69). Erwähnenswert ist, dass IL-27 nicht nur die Differenzierung inhibiert, sondern auch die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 fördern kann. IL-27 scheint protektiv gegen Ausbildung pathologischer T_H17 -Antworten zu wirken und überschießende Inflammation zu begrenzen (70, 71). In Mausmodellen zeigten sich positive Effekte von IL-27 auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen und multiple Sklerose (72-77). Im Einklang hiermit steht, dass aus Risikomutationen im IL-27 Gen (Untereinheit p28) eine verminderte Expression von IL-27 resultiert und eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht, an Morbus Crohn zu erkranken (78).

Neben diesen pro- und antiinflammatorischen Effekten nimmt IL-27 ebenso Einfluss auf Tumore. Es inhibiert über direkte Mechanismen die Zellproliferation, Invasion und Migration bestimmter Tumorzellen ebenso wie die Angiogenese (79-83). Es fördert die Entwicklung von tumorspezifischen $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen und

verstärkt so eine Antitumorantwort (84, 85). Dies wird durch Förderung der Zytotoxizität von NK-Zellen weiter verstärkt und sorgt in vielen präklinischen Tumormodellen für eine effektive Tumorzellelimination (86-89). Gleichzeitig hemmt IL-27 die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen), die diese Anti-Tumorantworten verhindern (90, 91). Dennoch zeigten sich in einigen Tumormodellen ambivalente Effekte. Ovarial-, hepatozelluläre Karzinome sowie maligne Melanome exprimieren auf IL-27 Signalgebung hin vermehrt *programmed cell death 1 ligand 1* (PD-L1) (92-94). PD-L1 Expression der Tumorzellen inhibiert über den Rezeptor *programmed cell death protein 1* (PD-1) die T-Zell-vermittelte Tumorantwort, die für die Tumorelimination von Bedeutung ist (95). In diesem Kontext erscheint IL-27 demnach tumorfördernd.

Die Erforschung insbesondere von Mitgliedern der IL-12-Familie erweist sich aufgrund der geteilten Rezeptoren und Zytokinuntereinheiten als schwierig. Insbesondere *Gen-Knockout*-Modelle müssen differenziert betrachtet werden. Sie betreffen im Falle von IL-27 entweder gp130, WSX-1 oder eine Untereinheit des Zytokins (p28 oder EBI3) und haben damit stets Einfluss auf die Funktionen anderer Zytokine, die diese überlappend verwenden. Es können hieraus keine eindeutigen Rückschlüsse auf Funktionen von IL-27 gezogen werden. Zur weiteren Analyse braucht es eine selektive, hochspezifische Möglichkeit der Aktivierung des Rezeptorkomplexes.

4.3.3 IL-39, der jüngste Vertreter der IL-12-Familie

IL-39 ist analog zu IL-27 aus zwei verschiedenen Untereinheiten (p19/EBI3) aufgebaut und teilt durch Verwendung von gp130 ebenfalls die Überschneidung zur IL-6-Familie (s. Abb. 3). Es bindet an den heterodimeren Rezeptor aus gp130 und IL-23R und löst eine Phosphorylierung von STAT1, STAT3 und ERK1/2 aus (11, 16).

Produziert wird IL-39 hauptsächlich von aktivierten B-Zellen und bewirkt über die Stimulation von Neutrophilen eine Aktivierung ebendieser (96, 97). In murinen Lupus-Modellen zeigte sich ein vornehmlich proinflammatorischer Effekt von IL-39 (96). Zudem könnte es in Wundheilungsprozessen eine relevante Rolle spielen (98).

Bisher mangelt es noch an verfügbarem aktiven, rekombinanten IL-39. IL-39Fc, ein chimäres Protein, welches über Fc-Teile verbunden wurde, zeigte bis dato keinen relevanten Effekt auf humane Leukozyten (47). Wenn auch die Teilrezeptoren gp130 und IL-23R lange bekannt sind, ist die Datenlage zu IL-39 und seinem Rezeptor noch dünn. Es bedarf weiterer Analysen, um seine Bedeutung für den Menschen in physiologischen wie pathologischen Prozessen zu verstehen. Bisher konnte eine Aktivität dieses Zytokins nur in Mäusen nachgewiesen werden (47). Auch dieser Vertreter zeigt, dass ein selektives, hochspezifisches System zur weiteren Analyse nützlich sein kann, insbesondere vor dem Hintergrund des nicht-verfügbaren aktiven, rekombinanten IL-39.

4.4 Die IL-10-Familie

Die IL-10-Familie beinhaltet eine weitere große Gruppe von Zytokinen (s. Abb. 4). Sie verwenden, im Gegensatz zur IL-12-Familie, Klasse II-Zytokinrezeptoren, die kein konserviertes WSXWS-Aminosäuremotiv und eine andere Anzahl und Anordnung von Disulfidbrücken in ihrer extrazellulären Domäne aufweisen (41, 99, 100). Die Zytokine dieser Familie binden zunächst an einen α -Rezeptor mit hoher Affinität. Im Anschluss wird ein β -Rezeptor mit geringerer Affinität rekrutiert und eine Jak/STAT-Signalgebung induziert (101, 102). Diese wird für allem über die Jak1 und Tyrosinkinase 2 (Tyk2) vermittelt (100). Die β -Rezeptoreinheit IL-10R2 fungiert als gemeinsame Rezeptoruntereinheit für viele Mitglieder der IL-10-Familie. Der IL-10R2 wird ubiquitär exprimiert (103). Die Expression des α -Rezeptors entscheidet demnach über die Fähigkeit, eine Signaltransduktion für das entsprechende Zytokin zu vermitteln.

Die IL-10-Familie besteht aus den neun Mitgliedern IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28A, IL-28B und IL-29 (104). In der Regel bilden sie Monomere. Lediglich für IL-10 und IL-26 sind auch funktionelle Dimere beschrieben (105, 106). Anhand ihrer Struktur, der verwendeten Rezeptoren, der Signalwege und biologischen Funktionen lassen sich drei weitere Subgruppen unterteilen (104). Die IL-10-Subgruppe enthält lediglich das gleichnamige Zytokin. Es erfüllt vor allem antiinflammatorische Funktionen zur Reduktion überschießender Immunantworten

(107). Die IL-20-Subgruppe besteht aus IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 und IL-26. Sie wirken hauptsächlich auf barrierebildende Organe. Hier spielen sie eine essenzielle Rolle für die Integrität des Epithels und sind unter anderem in Wundheilungsprozesse involviert (108, 109). Die dritte Subgruppe der IL-10-Familie besteht aus IL-28A, IL-28B und IL-29, die auch als Typ III oder λ -Interferone bezeichnet werden und unter anderem antivirale Funktionen in Epithelien ausüben (110). Die IL-10-Familie stellt eine heterogene Gruppe verschiedener Zytokine dar, die pleiotrope Effekte im Rahmen von Immunantworten ausüben.

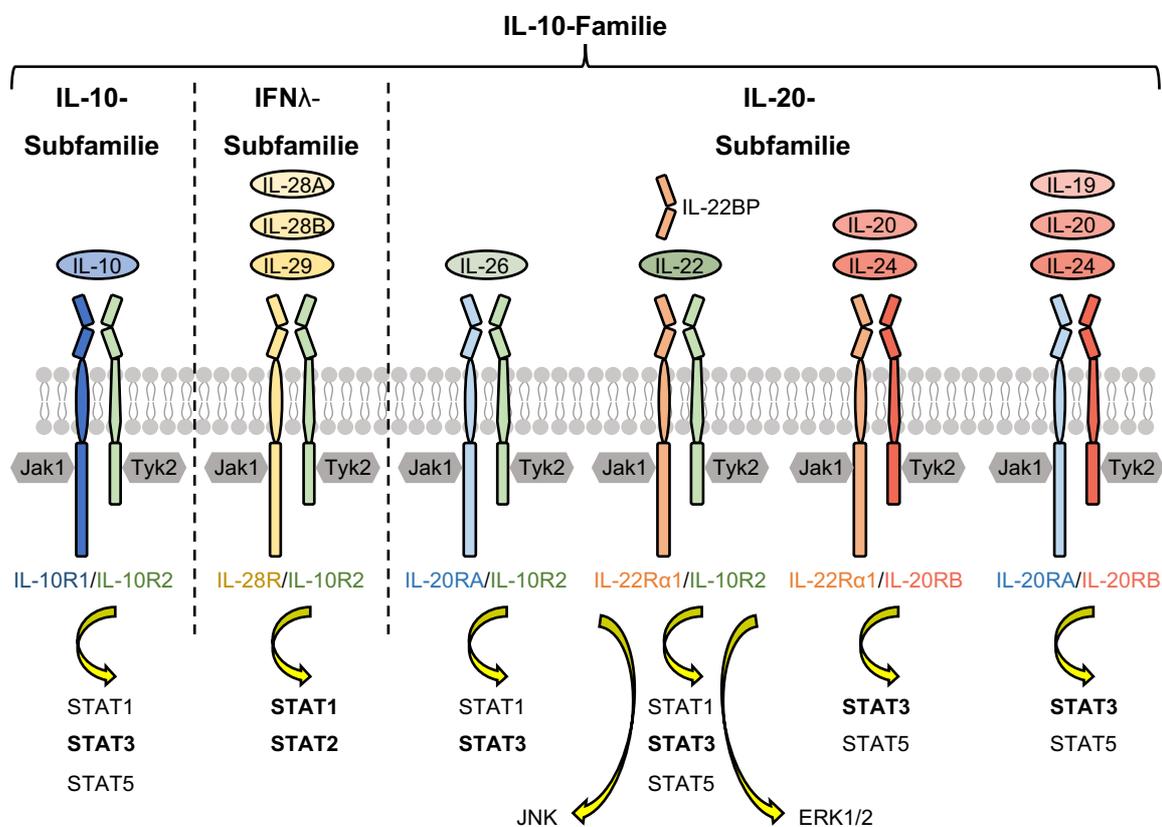


Abbildung 4: Die IL-10-Familie und ihre Subfamilien.

Schematisch dargestellt sind die verschiedenen Mitglieder der IL-10-Familie und ihrer Rezeptorkomplexe. Sie werden weiter in verschiedene Subfamilien unterteilt. Die Zytokine binden mit hoher Affinität an den längeren α -Rezeptor, wodurch die Affinität für den kürzeren β -Rezeptor erhöht wird. Diese heterodimerisieren und es erfolgt eine Phosphorylierung von intrazellulären Tyrosinresten der Rezeptoren und Aktivierung von STAT-Molekülen. Die längeren α -Rezeptoren sind mit Jak1 assoziiert, während die kürzeren β -Rezeptoren mit Tyk2 assoziiert sind. Andere Signalwege wie JNK oder ERK1/2 können ebenso aktiviert werden und sind der Übersicht halber nur für den IL-22R, mit dem sich näher beschäftigt wurde, dargestellt. Die β -Rezeptoren IL-10R2 und IL-20RB werden unter zahlreichen Rezeptorkomplexen geteilt. Dies trifft ebenso für den α -Rezeptor IL-22R α 1 zu. Zudem können einige der Zytokine an mehrere Komplexe binden. Für IL-22 wurde der natürliche Inhibitor, das IL-22 binding protein (IL-22BP oder IL-22R α 2) abgebildet. Die Abbildung wurde mit Power Point generiert und ist nach Ouyang *et al.* modifiziert worden (111).

4.5 IL-22-vermittelte Signalgebung

IL-22 ist der bisher bestuntersuchte Vertreter der IL-10-Familie. Es verwendet den heterodimeren Rezeptor aus IL-10R2 und IL-22R α 1 (112, 113). Der IL-22R α 1 stellt hierbei den *high-affinity* oder α -Rezeptor dar und bestimmt somit die Ligandenspezifität. Da der IL-22R α 1 vor allem auf epithelialen Zellen exprimiert wird, determiniert er zusätzlich die Zellspezifität (103, 114).

Nach Bindung von IL-22 werden Jak/STAT-vermittelte Signalwege aktiviert. Bisher wurden für den IL-22R α 1 eine Assoziation mit der Jak1 und des IL-10R2 mit der Tyk2 beschrieben (115). Nach Phosphorylierung von intrazellulären Tyrosinresten der Rezeptoren durch die Jaks binden STAT-Moleküle an diese und werden ebenfalls phosphoryliert und somit aktiviert. STAT3 scheint der bedeutsamste Weg für die IL-22-Signalgebung zu sein, auch wenn STAT1- und STAT5-Aktivierung ebenso beschrieben wurden (112, 115). Weitere aktivierte Signalwege sind der ERK1/2-, JNK- und p38-MAPK-Weg (115-117).

Das lösliche IL-22BP (auch: IL-22R α 2) scheint ein negativer Regulator der IL-22-vermittelten Signalgebung zu sein (114, 118, 119). Es besitzt mit 34% eine hohe Homologie zu dem extrazellulären Teil des IL-22R α 1 und verhindert die Assoziation von IL-22 mit dem membrangebundenen Rezeptor (118). Möglicherweise könnten auch sogenannte *suppressor of cytokine signaling*- (SOCS)-Moleküle, die auf die Phosphorylierung von STAT-Molekülen wirken, ebenso einen negativen Feedback-Mechanismus darstellen. Hierzu zählen vor allem SOCS1 und SOCS3 (120). Die Bedeutung dieser Moleküle scheint am ehesten überschießende IL-22-vermittelte Reaktionen zu verhindern.

4.5.1 IL-22 *in vivo*-Funktionen und Bedeutung für Krankheit und Therapie

IL-22 stellt ein wichtiges Bindeglied zwischen Immunzellen und Epithelien dar. Produziert wird es von Lymphozyten wie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen, NK-Zellen und *group 3 innate lymphoid cells* (ILC3s) (121-124). Seine Wirkung entfaltet es auf Zelltypen, die den IL-22R α 1 exprimieren. Darunter fallen Keratinozyten, Alveolar-, Kolonepithel- und Tubuluszellen der Niere, aber auch Hepatozyten (103). Es induziert verschiedene Chemokine und antimikrobielle Peptide wie β -Defensive,

S100A7, S100A8 und S100A9 (103, 125-127). IL-22 ist für die Entwicklung von T_H17-Zellen und die Abwehr von Infektionen mit extrazellulären Bakterien und Pilzen relevant. Zahlreiche Untersuchungen liegen zu Mausmodellen mit *Citrobacter rodentium* induzierten bakteriellen Darminfektionen vor. Hierbei zeigt sich, dass IL-22 zentral für die Bewältigung der Infektion ist und IL-22-defiziente Mäuse schwerere Verläufe und eine stärkere Schädigung des Epithels erleiden (128). In einem anderem Infektionsmodell mit *Klebsiella pneumoniae* induzierter Pneumonie konnten ebenfalls protektive Effekte von IL-22 gefunden werden (129). Es scheint über STAT3-vermittelte Effekte wie Zellproliferation regenerativ auf Epithelien zu wirken und die Barrierefunktion zu fördern. IL-22 reguliert ebenso Matrix-Metalloproteasen 1 und 3, Kallikreine und den *platelet-derived growth factor* und ist hierüber in Reorganisationsprozesse von Geweben involviert (125, 127). In präklinischen Modellen zeigte eine topische Applikation des dimeren Fusionsproteins IL-22Fc eine beschleunigende Wirkung auf Wundheilungsprozesse (130). Eine Kehrseite dieser Effekte ist, dass STAT3 in vielen Karzinomen eine tumorfördernde Wirkung entfaltet. IL-22-induzierte STAT3-Phosphorylierung erscheint jedoch nicht ausreichend zur Tumorbildung zu sein und kann kontextabhängig tumorfördernde aber auch -inhibierende Effekte zeigen (131). Synthetische Modelle zur hochspezifischen Simulation der IL-22-Signalgebung können die Funktionen exakter aufschlüsseln, um kontextabhängige Effekte besser zu untersuchen. Insbesondere ist es von Interesse, ob das synthetische Zytokinrezeptorsystem von Engelowski *et al.* auf die IL-10-Familie übertragbar ist und breit anwendbar für die Grundlagenforschung zur Verfügung steht (28). Jüngst wurde gezeigt, dass auch IFN-Signalgebung mittels SyCyRs phänokopiert werden kann. IFNR gehören ebenfalls den Klasse II-Zytokinrezeptoren an (132).

4.6 Epidermal growth factor receptor (EGFR) – Biologie und Signaltransduktion

Neben den Interleukinen, die di- oder multimeren Rezeptorkomplexe zur Signaltransduktion bilden, stellen Rezeptor-Tyrosinkinase eine weitere große Familie von Zytokinrezeptoren dar. Diese werden unter anderem von

Wachstumsfaktoren verwendet. Hierzu zählt die ErbB-Familie, die neben den weitbekannten EGFR, den ErbB2/Her2/Neu, ErbB3/Her3 und ErbB4/Her4 umfasst (133). Rezeptor-Tyrosinkinasen vermitteln ihre Signaltransduktion durch Bildung von di- oder oligomeren Komplexen (133, 134). Im Unterschied zu Jak/STAT-vermittelter Signalgebung besitzen sie jedoch keine assoziierte Kinase, sondern eine intrazelluläre Kinasedomäne (135).

Der EGFR als der bekannteste Vertreter dieser Familie besitzt vom N-Terminus (extrazellulär) zum C-Terminus (intrazellulär) einen Ligandenbindungs- und Dimerisierungsarm. Nachfolgend kommt eine Transmembrandomäne sowie eine intrazelluläre Domäne, welche aus einer Kinasedomäne und C-terminalen Schwanzdomänen besteht (135). Ebenso wie bei den Interleukinen können Rezeptoren mehrere Liganden binden und umgekehrt (136). Diese Pleiotropie macht diese Familie zu einem interessanten Casus im Hinblick auf vorhandenen *cross-talk*. Bisher wurden allein sieben Liganden für den EGFR festgestellt, namentlich EGF, *transforming growth factor* (TGF)- β , *epiregulin* (EREG), heparin-binding (HB)-EGF, *epigen* (EPGN), *betacellulin* (BTC) und *amphiregulin* (AREG). Zu den aktivierten *downstream*-Signalwegen gehören MAPK-, Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-AKT-, aber auch Jak/STAT-Wege (133, 137). Mitglieder der ErbB-Familie werden ubiquitär exprimiert, was ihre fundamentale biologische Bedeutung unterstreicht (10). Sie sind essenziell für eine normale Embryogenese, spielen aber auch eine große Rolle für Zellproliferation, Wachstum, Hemmung der Apoptose, Differenzierung und Migration, aber auch der Adhäsion und Metastasierung von Tumorzellen. Mutationen lassen sich häufig in verschiedenen Tumoren wie dem Mamma-, dem Lungen- und auch den kolorektalen Karzinomen finden. Häufig bestehen hier eine erhöhte Expression oder konstitutiv aktive Varianten des EGFR (4). Dies führte zu Therapien, die gezielt in diese Prozesse eingreifen, wie den Tyrosinkinaseinhibitoren oder der antikörperbasierten Inhibition von ErbB-Rezeptoren (138). Auch fast 60 Jahre nach der Entdeckung des EGFR lassen sich in diesem Bereich noch Fortschritte erzielen. Ein weiteres Verständnis der Funktionsweise dieser Rezeptoren kann letztlich Nutzen für die Tumorthherapie hervorbringen. Insbesondere die Analyse der intrazellulären Signaltransduktion ist von Interesse, um aktivierende Mutationen im Rahmen von Tumoren besser zu

verstehen. Ein synthetisches System zur spezifischen Aktivierung *in vitro* und *in vivo* kann dazu dienen, dass diese Mechanismen aufgedeckt werden. Die von Engelowski *et al.* entwickelten SyCyRs wurden bisher für Zytokin-, nicht jedoch für Wachstumsfaktorrezeptoren verwendet (28). Dies könnte eine Methode sein, welche für die Erforschung der Biologie der Wachstumsfaktoren hilfreich ist und zu einem tiefergehenden Verständnis von Tumorerkrankungen beiträgt.

4.7 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen synthetische Rezeptoren für verschiedene Interleukinrezeptoren sowie dem EGFR entwickelt werden. Dies soll Rückschlüsse über deren Signaltransduktionsmechanismen zulassen. Die *Synthetic Cytokine Receptors* (SyCyRs) von Engelowski *et al.* sollen dabei als Matrize zur Entwicklung und Etablierung des Systems für weitere Rezeptorklassen dienen (28). Es wurden aus verschiedenen Interleukin-Familien ausgewählte Vertreter verwendet, um eine breite Anwendbarkeit des Systems aufzuzeigen. Hierzu zählen der IL-27- und IL-22-Rezeptor, aber auch der IL-39-Rezeptor. Letzterer ist von besonderem Interesse, da aktuell kein aktives, rekombinantes IL-39 vorhanden ist und ein synthetisches System eine Möglichkeit darstellt, die Biologie von IL-39 dennoch hochspezifisch zu erforschen. Ebenso wurde der EGFR zur Entwicklung synthetischer Rezeptoren ausgewählt, um eine Übertragbarkeit der SyCyRs auf Wachstumsfaktoren zu erweitern.

Die cDNAs der entsprechenden synthetischen Rezeptoren werden in Plasmiden kloniert. Die extrazellulären Domänen der Rezeptoren sollen durch antigenspezifische *nanobodies* ausgetauscht werden. Diese sind gegen die Fluoreszenzproteine GFP oder mCherry gerichtet. Anschließend werden Ba/F3-gp130-Zellen retroviral transfiziert und die Expression der entsprechenden SyCyRs mittels Durchflusszytometrie und Western Blot nachgewiesen. Homo- oder heterodimere Fusionsproteine aus GFP und mCherry dienen als synthetische, hochspezifische Zytokine und sollen eine stöchiometrisch bekannte Rezeptordimerisierung herbeiführen. Anschließend erfolgt die Analyse der intrazellulären Signale mittels Western Blot und die Messung der Zellproliferation durch Zellviabilitätsassays. Neben der Analyse von synthetischen IL-22-, IL-27-, IL-39- und EGFR-Komplexen sollen weitere, bisher nicht bekannte aktive Rezeptorkomplexe über spezifische Dimerisierung gefunden werden, um einen möglichen *cross-talk* auf Rezeptorebene aufzuzeigen.

Das Spektrum der SyCyRs soll auf Rezeptor-Tyrosinkinasen erweitert werden, um deren breite Anwendbarkeit aufzuzeigen. Perspektivisch soll dies bei der Erforschung von Signaltransduktionsmechanismen helfen. Zudem können SyCyRs

als hochspezifischer molekularer *on/off*-Schalter dienen, um zelluläre Therapien, wie die CAR-T-Zell-Therapie, zu optimieren.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Antibiotika

In Tabelle 1 werden alle verwendeten Antibiotika gelistet.

Tabelle 1: Antibiotika

| Antibiotikum | Stammkonzentration | Arbeitskonzentration | Hersteller |
|-------------------------|---------------------------|---|--|
| Ampicillin | 100 mg/ml | Agarplatten: 200 µg/ml Flüssigmedium: 100 µg/ml | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Hygromycin B (Hygro) | 50 mg/ml | 1 mg/ml | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Penicillin G | 10000 U/ml | 100 U/ml | Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland |
| Puromycin (Puro) | 1 mg/ml | 1,5 µg/ml | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Streptomycin | 10 mg/ml | 100 mg/l | Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland |

5.1.2 Antikörper

Für diese Arbeit eingesetzte Antikörper sind in Tabelle 2 erfasst.

Tabelle 2: Antikörper mit anwendungsbezogener Verdünnung und jeweiliger Hersteller

| Antikörper | Verdünnung | Hersteller |
|--|--------------------------|--|
| Durchflusszytometrie | | |
| F(ab') ₂ -Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488, # A11070 | 1:100 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| HA-tag (C29F4) Rabbit mAb #3724 | 1:1000 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| Myc-tag (71D10) Rabbit mAb #2278 | 1:100 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| Western Blot | | |
| AKT Antibody Rabbit mAb #9272 | 1:1000 in 5% BSA TBS-T | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| Anti-Human CIS/SOCS3 (C204) Rabbit IgG (C-terminal), #JP18391 | 1:1000 in 5% BSA TBS-T | Immuno-Biological Laboratories, Fujioka, Japan |
| Anti-γ-Tubulin Mouse mAb #T5326 | 1:5000 in 5% BSA TBS-T | Sigma Aldrich, München, Deutschland |
| Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed secondary Antibody, HRP #31432 | 1:2000 in 5% Milch TBS-T | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed secondary Antibody, HRP #31462 | 1:2000 in 5% Milch TBS-T | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| HA-tag (C29F4) Rabbit mAb #3724 | 1:1000 in 5% BSA TBS-T | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| Myc-tag (71D10) Rabbit mAb #2278 | 1:1000 in 5% BSA TBS-T | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| p44/42 MAPK (ERK1/2) Antibody #9102 | 1:1000 in 5% Milch TBS-T | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| Phospho-AKT (Ser473) (D9E) XP [®] Rabbit mAb #4060 | 1:1000 in 5% BSA TBS-T | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) | 1:1000 in 5% BSA TBS-T | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |

| Antikörper | Verdünnung | Hersteller |
|--|--------------------------|--|
| (D13.14.4E) XP [®] Rabbit mAb #4370 | | |
| Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP [®] Rabbit mAb #9145 | 1:1000 in 5% BSA TBS-T | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| Phospho-STAT5 (Tyr694) (C11C5) Rabbit mAb #9359 | 1:1000 in 5% BSA TBS-T | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| STAT3 (124H6) Mouse mAb #9139 | 1:1000 in 5% Milch TBS-T | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| STAT5 (D2O6Y) Rabbit mAb #94205 | 1:1000 in 5% BSA TBS-T | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |

5.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Nachfolgend werden alle verwendeten Chemikalien (Tabelle 3) und Verbrauchsmaterialien (Tabelle 4) aufgeführt.

Tabelle 3: Chemikalien und jeweilige Hersteller

| Chemikalie | Hersteller |
|---|---|
| Agar-Agar | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| Biozym LE Agarose | Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Bromphenolblau | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail | Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| dNTP Mix (25 µM) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Essigsäure | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| GeneRuler 1 kb DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| GeneRuler Express DNA Ladder 100-5000 bp | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |

Material und Methoden

| Chemikalie | Hersteller |
|---|---|
| GIBCO® Fötale Kälberserum (FCS) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Glucose | VWR International, Darmstadt, Deutschland |
| Glycerin | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Glycin | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| HD-Green DNA Stain | Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland |
| Immobilon® Western HRP-Substrat | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Isopropanol (2-Propanol) | AppliChem, Darmstadt, Deutschland |
| Kaliumacetat | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Kaliumchlorid (KCl) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Magermilchpulver | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Methanol | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumchlorid | AppliChem, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumhydroxid | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄) | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| NP-40 (Tergitol™-Solution, Type NP-40) | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Polybrene Infection/Transfection Reagent | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Salzsäure, Rotipuran® 37% rauchend | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| Tris | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Trypan Blue Dye, 0,4% solution | Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland |
| Turbofect™ Transfection Reagent | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Tween®20 (Polysorbat 20) | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien und jeweilige Hersteller

| Verbrauchsmaterial | Hersteller |
|-------------------------------------|---|
| 15 ml CELLSTAR® Polypropylen Röhren | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |
| 50 ml CELLSTAR® Polypropylen Röhren | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |
| Counting Slides, Einmal-Zählkammern | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |

| Verbrauchsmaterial | Hersteller |
|--|--|
| Nitrilhandschuhe, Micro Touch® | Ansell, Brüssel, Belgien |
| Nunc™, CryoTube™ (1,8 ml) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| PCR Gefäßstreifen (0,2 mL) | Starlab International, Hamburg, Deutschland |
| PCR-Deckelstreifen | Starlab International, Hamburg, Deutschland |
| Petrischale (92x16 mm) | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Pipettenspitzen | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Reagiergefäße, SafeSeal (1,5 ml) | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Serologische Pipette (10 ml), Stripette®, | Corning Inc., Corning, NY, USA |
| Serologische Pipette (25 ml), Stripette® | Corning Inc., Corning, NY, USA |
| Transfermembran Roti® PVDF | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Whatman™ Chromatography Paper | GE Healthcare, Chicago, IL, USA |
| Zellkulturschale (9,2 cm ²) (adhärent) | TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz |
| Zellkulturschale, 12-well CytoOne® | StarLab International, Hamburg, Deutschland |
| Zellkulturschale, 6-well (adhärent) | TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz |
| Zellkulturschale, 6-well CytoOne® | StarLab International, Hamburg, Deutschland |

5.1.4 Geräte und Kits

Der folgende Abschnitt enthält tabellarisch alle verwendeten Geräte (Tabelle 5) und Kits (Tabelle 6).

Tabelle 5: Verwendete Geräte und entsprechende Hersteller

| Gerät | Hersteller |
|--|---|
| Analysenwaage Precisa 100M-300C | Precisa Gravimetrics, Dietikon, Schweiz |
| Autoklav Laboklav 25 | SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle, Deutschland |
| BD FACSCanto II | Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| ChemoCam Imager | Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland |
| CO ₂ -Inkubator HERAcCell® 150i | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Geldokumentationssystem Gel iX20 Imager | INTAS, Göttingen, Deutschland |
| Infinite® M200 PRO plate reader | Tecan Group, Männedorf, Schweiz |

Material und Methoden

| Gerät | Hersteller |
|--|--|
| Kühlschrank | Liebherr-MCCtec Rostock GmbH, Rostock, Deutschland |
| Kühlzentrifuge 5417 R | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Kühlzentrifuge 5810 R | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Magnetrührer mit Heizfunktion | Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland |
| Mikropipetten Research® plus | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Mikrowelle Optiquick | Moulinex (Krupps), Solingen, Deutschland |
| Mikrozentrifuge, Zentrifuge 5424R | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Mini Micro-Zentrifuge | Axon Labortechnik, Kaiserslautern, Deutschland |
| Mini-Sub Cell GT Horizontal Electrophoresis System | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| peqSTAR 2X Thermocycler | Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland |
| pH-Meter PB-11 | Sartorius, Göttingen, Deutschland |
| Pipetus® Akku-betriebene Pipettierhilfe | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland |
| Power Pac™ Basic Power Supply | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| Rollenmischer SRT 9D | Bibby Scientific, Stone, Staffordshire, UK |
| Rotator mit Vortexer | neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland |
| TC10 Automated Cell Counter | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| Thermo Scientific™ Safe 2020 biologische Sicherheitswerkbank | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Thermomixer Compact (Inkubationsschüttler) | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Trans-Blot® Turbo Transfersystem | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| Ultratiefkühlschrank Forma® 900 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| UV-Leuchttisch | Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland |
| Vakuum-Sicherheits-Absaugsystem | Science Services, München, Deutschland |
| Vortexer D-6012 | neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland |
| Wasserbad Julabo sw21 | Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland |

Tabelle 6: Herstellerbezogene Kits

| Kit | Hersteller |
|--------------------------------------|--|
| Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay | Thermo Fisher Scientific, MA, Waltham, USA |
| CellTiter-Blue® Cell Viability Assay | Promega GmbH, Mannheim, Deutschland |
| NucleoBond® Xtra Midi/Maxi | Macherey-Nagel, Düren, Deutschland |
| NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up | Macherey-Nagel, Düren, Deutschland |

5.1.5 Kulturmedien, Lösungen und Puffer

Nachfolgend werden die Kulturmedien (Tabelle 7) der Bakterienstämme und Zelllinien aufgeführt. Lösungen und Puffer (Tabelle 8) werden im Verlauf mit Angaben zu deren Zusammensetzung oder Hersteller angegeben.

Tabelle 7: Kulturmedien und deren Zusammensetzung

| Kulturmedium | Zusammensetzung | Hersteller |
|---------------------|---|--|
| DMEM ^{-/-} | Dulbecco's Modified Eagle Medium, high Glucose (4,5 g/L) with stable Glutamine | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| DMEM ^{+/+} | Dulbecco's Modified Eagle Medium, high Glucose (4,5 g/L) with stable Glutamine, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| LB-Agar | 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 15 g/l Agar-Agar, pH 7,0 ±0,2 | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| LB-Medium | 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, pH 7,0 ±0,2 | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |

Tabelle 8: Lösungen und Puffer mit jeweiliger Zusammensetzung bzw. Herstellerangabe. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Lösungen und Puffer in H₂O angesetzt.

| Lösung/Puffer | Zusammensetzung |
|---------------------------------|---|
| 10x Standard Restriktionspuffer | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| 10x T4-DNA-Ligase-Puffer | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| 5 x Lämmli (reduzierend) | 125 mM Tris-HCl 50% (m/V) Glycerol 10% (m/V) SDS 5% (m/V) β-Mercaptoethanol 1 Spatelspitze Bromphenolblau |
| Ammoniumpersulfat (APS) | 10% APS in H ₂ O |
| Blockierlösung | 5% Magermilchpulver in TBS-T |

Material und Methoden

| Lösung/Puffer | Zusammensetzung |
|--|--|
| BSA-Lösung | 5% BSA in TBS-T |
| Essigsäure | 11,5% Essigsäure (99,9%) |
| FACS-Puffer | 0,5% BSA in PBS |
| Lysepuffer | 10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 1 mM Na ₃ VO ₄ 0,5% NAP-50 10 mM MgCl ₂ cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, 1 Tablette auf 50 ml |
| Orange G Ladepuffer | 30% Glycerin 50 mM EDTA 0,25% Orange G |
| <i>phosphate-buffered saline (PBS)</i> | 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 137 mM NaCl, pH 7,4 |
| Sammelgelpuffer | 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4% SDS |
| SDS Laufpuffer | 0,4 M Tris-HCl, pH 8,25 0,1 M Glycin 0,1% SDS |
| <i>solution 1 (S1) für DNA-Minipräparation</i> | 1 M Tris-HCl, pH 7,4 0,5 M EDTA 4 M NaOH 10% SDS 1:1000 RNase |
| <i>solution 2 (S2) für DNA-Minipräparation</i> | 4 M NaOH 10% SDS |
| <i>solution 3 (S3) für DNA-Minipräparation</i> | 3 M Kaliumacetat 11,5% Essigsäure |
| <i>stripping Puffer</i> | 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 2% SDS 0,1% β-Mercaptoethanol |
| TBS-T | 5 M NaCl |

| Lösung/Puffer | Zusammensetzung |
|---------------------------------------|---|
| | 200 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,05% Tween20 |
| Transferpuffer | 250 mM Tris-HCl, pH 8,0 2 M Glycerin 0,01% SDS 5% Methanol |
| Trenngelpuffer | 1,5 M tris-HCl, pH 8,8 0,4% SDS |
| <i>tris-buffered saline</i> (TBS) | 5 M NaCl 200 mM tris-HCl, pH 7,5 |
| <i>tris-acetate-EDTA</i> (TAE)-Puffer | 0,4 M tris-HCl, pH 8,8 0,01 M EDTA 0,2 M Essigsäure |

5.1.6 Oligonukleotide

Nachfolgend sind die verwendeten Oligonukleotide, deren Sequenz und Verwendung (Tabelle 9) angegeben.

Tabelle 9: Oligonukleotide, DNA-Sequenz und jeweilige Verwendung

| Oligonukleotid | 5'-3' -> Sequenz | Verwendung |
|----------------|--|---------------------------------------|
| IL-10R2 fw | GATCGAATTCCGGACAGGCAATGACG AA | <i>forward</i> -Primer, Klonierung |
| IL-10R2 re | GATCGCGGCCGCTCATACTTCTGAGG TCGACGTG | <i>reverse</i> -Primer, Klonierung |
| IL-22Ra1 fw | GATCGAATTCACGCTGCCCGATCGGA | <i>forward</i> -Primer, Klonierung |
| IL-22Ra1 re | GATCGCGGCCGCTCAGGATCCCACT GCACAGTC | <i>reverse</i> -Primer, Klonierung |
| WSX-1 fw | GATCGAATTCCGAC | <i>forward</i> -Primer, Klonierung |
| WSX-1 re | GATCGCGGCCGCTCACACCAGCAGTC CCAGCTC | <i>reverse</i> -Primer, Klonierung |
| DF85 | AGCCCTTTGTACACCCTAAGC | <i>forward</i> -Primer, Sequenzierung |
| DF86 | AGCAATAGCATGATACAAAGG | <i>reverse</i> -Primer, Sequenzierung |
| T7 fw | TAATACGACTCACTATAGGG | <i>forward</i> -Primer, Sequenzierung |
| T7 re | TAGAAGGCACAGTCGAGG | <i>reverse</i> -Primer, Sequenzierung |

5.1.7 Zelllinien und Bakterienstämme

Zur Klonierung wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* XL1-Blue (*endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [: TN10 proAB+ lacIqΔ(lacZ)M15] hsdR17(rk-mK+)*) verwendet, durch den eine Amplifikation der Plasmid-DNA gewährleistet wurde. Tabelle 10 zeigt die jeweiligen Zelllinien, die im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden und Tabelle 11 listet die Ausgangsplasmide, die für die Klonierung und teils auch retrovirale Transduktion verwendet wurden.

Tabelle 10: Zelllinien

| Zelllinie | Herkunft | Zellart | Hersteller/Quelle |
|--|--------------------------------|-------------------|---|
| Ba/F3-gp130 | Murine prä-B-Zelllinie | Suspensionszellen | Immunex, Seattle, WA, USA (139) |
| Ba/F3-gp130 G _{VHH} gp130 | Murine prä-B-Zelllinie | Suspensionszellen | AG Scheller (28) |
| Ba/F3-gp130 G _{VHH} IL-23R | Murine prä-B-Zelllinie | Suspensionszellen | AG Scheller (28) |
| CHO-K1 | Hamster Ovarzellen | Adhärente Zellen | DSMZ ACC110, Braunschweig, Deutschland |
| Phoenix-Eco | Humane embryonale Nierenzellen | Adhärente Zellen | DKFZ, Ursula Klingmüller, Heidelberg, Deutschland |

Tabelle 11: Ausgangsplasmide

| Plasmide | Resistenz | Quelle |
|------------------------------------|------------|--|
| pcDNA3.1 | Ampicillin | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| pcDNA3.1-C _{VHH} IL-12Rβ1 | Ampicillin | (28) |
| pcDNA3.1-IL-10R2 | Ampicillin | AG Scheller |
| pcDNA3.1-IL-22Rα1 | Ampicillin | AG Scheller |
| pcDNA3.1-WSX-1 | Ampicillin | AG Scheller |
| pMA-T-EGFR | Ampicillin | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| pMOWS-hygro | Ampicillin | (140) |
| pMOWS-puro | Ampicillin | (141) |
| pMOWS-puro-G _{VHH} gp130 | Ampicillin | (28) |

| Plasmide | Resistenz | Quelle |
|------------------------------------|------------|--------|
| pMOWS-puro-G _{VHH} IL-23R | Ampicillin | (28) |

5.1.8 Zytokine und rekombinante Proteine

Die im Rahmen dieser Arbeit genutzten Zytokine und rekombinanten Proteine werden in Tabelle 12 vollständig aufgeführt.

Tabelle 12: Zytokine und rekombinante Proteine mit jeweiliger Stammkonzentration und Herkunft

| Endogene Zytokine (rekombinant, gereinigt) | Stammkonzentration [µg/mL] | Herkunft |
|---|-------------------------------|-------------|
| 2x-GFP | 42 | AG Scheller |
| 2x-mCherry | 3 | AG Scheller |
| GFP | 27 | AG Scheller |
| GFP-mCherry | 1 | AG Scheller |
| Hyper-IL-6 (HIL-6) | 5 | AG Scheller |
| IL-22Fc | 100 | AG Scheller |
| IL-27 | 100 | AG Scheller |
| mCherry | 20 | AG Scheller |

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Herstellung und Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*

XL1-Blue

Für die Klonierung wurde die jeweilige Plasmid-DNA in *Escherichia coli*-Kulturen amplifiziert. Hierzu wurden chemisch kompetente *E. coli*-Zellen hergestellt, welche in der Lage sind, die gewünschten Plasmide aufzunehmen.

Zunächst wurde der in der Arbeitsgruppe vorliegende Bakterienstamm *Escherichia coli XL1-Blue* (endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::TN10 proAB+ lacIqΔ(lacZ)M15] hsdR17(rk-mK+)) in *lysogeny broth*- (LB-) Medium bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,6 bei 600 nm kultiviert. Anschließend erfolgte

eine Zentrifugation für 15 min bei 4000 g und 4°C. Die folgenden Schritte fanden im Kühlraum statt. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 50 mM CaCl_2 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet in 50 mM CaCl_2 + 10% Glycerin resuspendiert und aliquotiert. Anschließend wurden diese vor der weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff gefroren.

Vor der Transformation wurde ein Aliquot für 5 min auf Eis inkubiert, um die Lagertemperatur von -80°C zu erhöhen. Anschließend sollte das gewünschte Plasmid, welches mit einer Antibiotikaresistenz gekoppelt ist, in die *E. coli*-Zellen eingebracht werden. Es wurde 1 μl Plasmid-DNA oder im Falle einer vorangegangenen Ligation (s. Abschnitt 5.2.7) der gesamte Reaktionsansatz hinzugegeben. Nach weiteren 5 min Inkubation auf Eis folgte eine Inkubation bei 42°C für 60 s. Hierdurch wird die Zellwand der Bakterien für das zugegebene Plasmid durchlässig. Nachfolgend wurde der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert, bevor 500 μl vorgewärmtes LB-Medium hinzugegeben wurde. Die Zellsuspension wurde bei 37°C und 1200 rpm für 1 h im Inkubationsschüttler bebrütet, anschließend auf einer LB-Agarplatte mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.2.2 Amplifikation und Präparation bakterieller Plasmid-DNA

Für die weiteren molekularbiologischen Methoden wurden größere Mengen der Plasmid-DNA benötigt, daher wurde je eine Zellkolonie von der Agarplatte in 2 ml vorgewärmtes LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum überführt. Eine Inkubation erfolgte bei 37°C und 1200 rpm über Nacht im Inkubationsschüttler. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA des selektierten Klons mittels Mini-Präparation gereinigt. Von der Zellsuspension wurden zuvor 100 μl abgenommen und bei 4°C gelagert, um später eine größere Kultur beimpfen zu können. Anschließend wurden die übrigen 1900 μl der Zellsuspension zentrifugiert (15000 g , 5 min, Raumtemperatur (RT)). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 μl gekühltem S1-Puffer resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 200 μl S2-Puffer. Dieser enthält Natriumhydroxid sowie Natriumdodecylsulfat (SDS), welche eine Lyse der bakteriellen Membran und eine Denaturierung der Proteine

bewirken (142). Nach 5 min Inkubationszeit wurde 150 µl kalter S3-Puffer zugegeben, um diesen Vorgang über eine Normalisierung des pH-Werts zu stoppen. Anschließend wurde die Suspension nach 10 min Inkubation auf Eis erneut zentrifugiert (18000 g, 15 min, 4°C). Die Plasmid-DNA befand sich nun im Überstand und der Zelldetritus, bestehend aus chromosomaler DNA, Zellwandbestandteilen und Proteinen, als Pellet am Boden des Gefäßes. Nach Überführen des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß wurde dieser mit 900 µl 100%-igen Ethanol gemischt und erneut zentrifugiert (18000 g, 15 min, 4°C). Hierdurch bildet sich ein Pellet am Boden des Gefäßes, welches die Plasmid-DNA enthält. Der Überstand wurde verworfen und der Schritt mit 70%-igen Ethanol wiederholt. In einem letzten Schritt wurde das Pellet in 30 µl Wasser gelöst.

Um die Korrektheit der klonierten Plasmid-DNA zu überprüfen, wurde diese mittels Restriktionsenzymen geschnitten und die Größe der DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese analysiert (s. Abschnitt 5.2.4 und Abschnitt 5.2.8).

Aus den zuvor abgenommenen 100 µl der Bakterienkultur wurde nun eine größere Kultur in circa 100 ml LB-Medium mit jeweiligem Selektionsantibiotikum bei 37°C angesetzt und über Nacht inkubiert. Für die Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde die Zellsuspension entsprechend der Herstellerangaben mittels NUCLEOBOND® XTRA MIDI/MAXI KIT aufgereinigt.

5.2.3 Konzentrationsmessung von Plasmid-DNA

Um die Konzentration der aufgereinigten in Wasser gelösten DNA zu messen, wurde gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz photometrisch die Absorption bei 260 nm bestimmt. Diese wurde mittels NanoDrop® ND-1000 gemessen.

Die Reinheit des DNA-Gemischs wurde durch die photometrisch bestimmte Absorption bei 280 nm (Detektion von Proteinen) und 230 nm (Detektion organischer Substanzen) und anschließender Bildung von Quotienten bestimmt.

5.2.4 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen und spalten hydrolytisch die Phosphodiesterbindung an spezifischen palindromischen Sequenzen der DNA. Nach restriktiver Spaltung der DNA können *sticky-ends* mit einem Überhang aus

Einzelstrang-DNA oder *blunt-ends* ohne Überhang entstehen. Nach jeder Amplifikation der DNA und Reinigung über Mini- und Midi-Präparationen erfolgte eine Restriktionsspaltung, um die Größe der DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese zu überprüfen. Die Größe der DNA-Fragmente wurde vor der Spaltung mittels pDRAW32-Software ermittelt. Für den Restriktionsverdau wurden Endonukleasen der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Es erfolgte die Spaltung von 10 µg Vektor-DNA nach Zugabe von 10 U des Restriktionsenzym und Puffer gemäß Herstellerangaben auf 20 µl Gesamtvolumen. Die Reaktion wurde nach 2 h Inkubation bei 37°C durch Zugabe von 2 µl Orange G-Ladepuffer gestoppt. Im Anschluss wurde das Gemisch zur Analyse auf Agarosegel zur Elektrophorese aufgetragen. Sofern eine weitere Verarbeitung erfolgte, wurde die DNA aus dem Gel extrahiert und gereinigt (s. Abschnitt 5.2.8).

5.2.5 Dephosphorylierung der linearisierten Plasmide

Durch die restriktionsenzymatische Spaltung entstehen linearisierte Plasmide. Um eine Religation zu verhindern, wurden die 5'-Enden dephosphoryliert. Hierzu wurde nach Inaktivierung der Restriktionsenzyme 1 U FAST-AP (Alkalische Phosphatase) hinzugegeben und der Ansatz für 30 min, bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Vektor über das NUCLEOSPIN® GEL AND PCR CLEAN-UP KIT gemäß Herstellerangaben gereinigt.

5.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient zur Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte *in vitro*. Hierzu werden kurze Oligonukleotid-Sequenzen, sogenannte Primer, benötigt. Diese binden an eine spezifische Sequenz der DNA-Vorlage (*template*) vor und hinter der zu amplifizierenden Sequenz. DNA-Polymerasen sind in der Lage, an das 3'-OH-Ende der vorhandenen Primer weitere Nukleotide anzufügen und so eine Replikation des gewünschten Abschnitts zu gewährleisten. Für eine PCR werden die entsprechenden Primer, eine hitzestabile DNA-Polymerase, Puffer, ein DNA *template* und Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) benötigt.

Im Folgenden wird beispielhaft ein verwendeter PCR-Ansatz mit Plasmiden gezeigt:

| | |
|----------|--|
| 1 µl | Plasmid-DNA (ca. 0,5 pg DNA) |
| 0,4 µl | <i>forward</i> Primer (100 pmol) |
| 0,4 µl | <i>reverse</i> Primer (100 pmol) |
| 1 µl | dNTP-Mix (10 mM) |
| 10 µl | herstellerspezifischer Puffer |
| 1 µl | DNA-Polymerase (Pfu oder Phusion® High Fidelity) |
| ad 50 µl | H ₂ O _{dd} |

Es wurden die Pfu-Polymerase oder die Phusion® High Fidelity verwendet. Beide besitzen eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, die eine Korrektur nicht-komplementär synthetisierter Nukleotide ermöglicht. Hierdurch kommt es seltener zu Mutationen im PCR-Produkt. Für die Reaktion erfolgte im *ThermoCycler* eine Trennung der Doppelstrang-DNA mittels hitzeinduzierter Denaturierung der Doppelstränge bei 95°C, damit im folgenden Schritt die Primer an das *template* binden können. Nach Absenken der Temperatur sind die Primer in der Lage, an die Vorlage sequenzspezifisch zu binden (*annealing*). Die DNA-Synthese (*elongation*) erfolgte daraufhin bei 72°C, welches dem Temperaturoptimum der verwendeten DNA-Polymerasen entspricht. Die Dauer des letzten Schritts wurde an die Synthesegeschwindigkeit der Polymerase und Größe des PCR-Produkts in Basenpaaren angepasst. Der Zyklus wurde 35x wiederholt, um entsprechend hohe Mengen spezifisch amplifizierter DNA-Fragmente zu synthetisieren. Am Ende der Reaktion wurde die Temperatur auf 4°C gesenkt. Im Anschluss erfolgten eine Gelelektrophorese und Reinigung, um die Größe der DNA-Fragmente zu überprüfen.

Im Folgenden wird schematisch der genutzte PCR-Ablauf zur besseren Darstellung wiedergegeben (Tabellen 13-14).

Tabelle 13: Beispielhafter Ablauf des verwendeten PCR-Programms (Pfu-Polymerase)

| Funktion | Temperatur | Dauer | Wiederholung |
|-------------------------|------------|--------------------|--------------|
| Initiale Denaturierung | 95°C | 3 min | |
| Denaturierung | 95°C | 30 sec | |
| Annealing | 60°C | 1 min | 35 x |
| Elongation | 72°C | 1-2 min (2 min/kb) | |
| Finale Elongation | 72°C | 5 min | |
| Lagerung/Reaktionsstopp | 4°C | ∞ | |

Tabelle 14: Ablauf des verwendeten PCR-Programms (Phusion® High Fidelity)

| Funktion | Temperatur | Dauer | Wiederholung |
|-------------------------|------------|-----------------------------|--------------|
| Initiale Denaturierung | 98°C | 30 sec | |
| Denaturierung | 98°C | 5 sec | |
| Annealing | 55°C | 30 sec | 35 x |
| Elongation | 72°C | 15-30 sec (15-30 sec/kb) | |
| Finale Elongation | 72°C | 5 min | |
| Lagerung/Reaktionsstopp | 4°C | ∞ | |

5.2.7 Ligation von DNA

Im Rahmen der Klonierung war es nötig, DNA-Fragmente in Vektoren einzubringen. Die verwendeten Vektoren (pcDNA3.1, pMOWS-puro, pMOWS-hygro) waren in der AG Scheller vorhanden. Die einzusetzende DNA (*inserts*) und Plasmid-Vektoren wurden hierzu gemäß Herstellerangaben mit den gleichen Restriktionsenzymen gespalten oder im Falle der pMOWS-Vektoren kompatible Enden erzeugt. Bei Letzteren wurde hierfür zusätzlich das Klenow-Fragment verwendet. Es handelt sich um ein Proteinfragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*, welches 5'-überhängende einzelsträngige DNA mit Nukleotiden auffüllen kann. Somit entstand ein linearisierter pMOWS-Vektor mit *blunt-ends*.

Für die Ligation wurden 100 ng linearisierter Vektor verwendet. Die Menge des *inserts* wurde mittels folgender Formel bestimmt:

$$\text{insert (ng)} = \frac{5 \times \text{Vektor (ng)} \times \text{insert (Anzahl der Basenpaare)}}{\text{Vektor (Anzahl der Basenpaare)}}$$

Im Allgemeinen wurde folgender Reaktionsansatz zur Ligation bei *sticky-ends* genutzt:

| | | |
|----------|--------------------------------|-----------|
| 100 ng | Vektor | 37°C, 2 h |
| 2 µl | T4-Ligase Puffer | |
| variabel | <i>insert</i> | |
| 1 µl | T4-Ligase (5 U/µl) | |
| ad 20 µl | H ₂ O _{dd} | |

Bei vorhandenen *blunt-ends* wurde dem Reaktionsansatz 2 µl Polyethylenglykol (PEG)-4000 zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss an die Ligation wurde eine Transformation von *E. coli XL1-Blue* mit dem Ansatz durchgeführt (gemäß Abschnitt 5.2.1) und es erfolgte eine Amplifikation und Selektion gemäß oben aufgeführten Methoden.

5.2.8 Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNA

Um die Korrektheit der Produkte der restriktiven Spaltung oder PCR zu kontrollieren und größenabhängig zu isolieren, wurde die Gelelektrophorese angewandt. Hierzu wurden Gele aus 1%-iger Agarose in TRIS-Acetat-EDTA- (TAE-)Puffer und 0,0002% HD-Green[®] verwendet. Letzteres sorgt über eine Fluoreszenz der DNA unter UV-Licht für die Sichtbarkeit der DNA-Fragmente. Zum Reaktionsansatz wurde Orange G Ladepuffer hinzugegeben. Die Gele wurden in TAE-Puffer gelegt und mit den DNA-Proben beladen. Als Referenz für die Größe der DNA-Fragmente wurden GeneRuler Express DNA oder GeneRuler 1 kb DNA Ladder aufgetragen. Eine Spannung von 110 mV zwischen Anode und Kathode wurde angebracht. Aufgrund der negativen Ladung der DNA wandert diese spannungsabhängig und größenabhängig in Richtung Anode. Das Agarosegel erfüllt den Zweck eines Filters, der kürzere DNA-Fragmente schneller zur Anode wandern lässt. Der Orange G-Ladepuffer enthält Farbstoff, der ungefähr auf Höhe von circa 50 Basenpaaren entsprechenden Fragmenten im Gel wandert. Hierdurch wurde sichtbar, wann die

Proben das Gel durchwandert hatten. Die Dokumentation erfolgte am Gel Jet Imager der Firma Intas unter Verwendung der Gel iX Imager-Software.

Falls eine Isolierung eines bestimmten DNA-Fragments erforderlich war, wurde diese unter UV-Licht mittels Skalpellexzision entnommen. Im Anschluss wurde das NUCLEOSPIN® GEL AND PCR CLEAN-UP KIT verwendet, um gemäß Herstellerangaben die DNA zu isolieren.

5.2.9 DNA-Sequenzierung

Um eine weitere Kontrolle der klonierten Plasmide zu erhalten, wurden diese sequenziert. Dies geschah durch Microsynth® Seqlab (Göttingen, Deutschland). Als Primer wurden eigene Oligonukleotide genutzt.

5.3 Zellbiologische Methoden

5.3.1 Kultivierung der Zelllinien

Die für diese Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium, high Glucose (4,5 g/L) with stable Glutamine* und 10% FCS sowie 1% Penicillin/Streptomycin (DMEM^{+/+}) in 10 cm großen Petrischalen kultiviert. Die verwendeten Ba/F3-gp130-Zellen sind eine murine prä-B-Zelllinie, die den humanen Rezeptor gp130 enthält. Die Proliferation dieser Zellen ist zytokinabhängig. Das Medium wurde daher mit 0,2% konditioniertem CHO-K1-Zellüberstand versetzt, welcher 5 µg/ml HIL-6 enthielt (entspricht einer finalen Konzentration im Medium von 10 ng/ml HIL-6).

Das Medium der retroviral transduzierten Zellen wurde mit den zytotoxischen Stoffen Hygromycin B (2% bzw. 1 mg/ml) und/oder Puromycin (0,2% bzw. 1,5 µg/ml) versetzt. Das transduzierte Plasmid enthielt eine entsprechende Resistenz, sodass eine Selektion erfolgte. Ba/F3-gp130-Zellen wurden einmal wöchentlich im Verhältnis 1:25000 passagiert.

Weiterhin wurden Phoenix-Eco-Zellen verwendet, eine humane embryonale Nierenzelllinie, welche die HIV-Gene *gag*, *pol*, *env* in ihrem Genom besitzen. Dadurch sind sie befähigt, Retroviren zu produzieren. Dies diente zur Transduktion

von Ba/F3-gp130-Zellen mit den klonierten synthetischen Rezeptoren (s. Abschnitt 5.3.2). Phoenix-Eco-Zellen sind adhärenente Zellen. Zwei Mal wöchentlich wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit *phosphate-buffered saline* (PBS) versetzt und von der Zellkulturschale abgelöst. Anschließend wurden diese für 5 min bei 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 2 ml DMEM^{+/+} resuspendiert. Von der Suspension wurde 1/10 in das neue Medium überführt, um die Zellen in Kultur zu halten.

5.3.2 Transfektion von Phoenix-Eco Zellen und retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit war es nötig, eine stabile Rezeptorexpression der SyCyRs in Ba/F3-gp130-Zellen zu erreichen. Dies geschah durch retrovirale Transduktion. Dazu mussten zunächst Phoenix-Eco-Zellen mit den retroviralen pMOWS-Vektoren transfiziert werden, welche die cDNA für die entsprechenden SyCyRs enthalten. Hierzu wurden 1 µg Plasmid-DNA mit 2 µl TURBOFECT™ in 200 µl DMEM^{-/-} gelöst und für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde dieses Gemisch auf die Phoenix-Eco-Zellen gegeben und diese für 6 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 4-6 h erfolgte ein Mediumwechsel. Das neue Medium enthielt statt 10% nun 30% fötales Kälberserum (FCS). Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen. Dieser enthält die retroviralen Partikel mit den entsprechenden Sequenzen für die SyCyRs und wurde zunächst zentrifugiert (5 min, RT, 1500 g), um Verunreinigungen mit Phoenix-Eco-Zellen im Überstand zu verhindern. Anschließend wurden 500 µl des Überstands mit 2 µl Polybrene und 5 x 10⁶ Ba/F3-gp130-Zellen zentrifugiert (3 h, 1500 g, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml DMEM^{+/+} mit HIL-6 resuspendiert und für 2 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden je nach enthaltener Resistenz 5 µl Puromycin oder 100 µl Hygromycin B zugegeben. Es sollten somit nur die Ba/F3-gp130-Zellen überleben, die die entsprechenden Plasmide mit den SyCyRs und der jeweiligen Resistenz aufgenommen haben. Am fünften Tag nach der retroviralen Transduktion der Ba/F3-gp130-Zellen wurden diese im Verhältnis 1:5 in neues Medium überführt. Anschließend wurden diese, wie in Abschnitt 5.3.1 beschrieben, passagiert.

5.3.3 Durchflusszytometrie

Im weiteren Verlauf wurde die Oberflächenexpression der SyCyRs auf den Ba/F3-gp130-Zellen geprüft. Dies geschah mittels BD FACSCanto II Durchflusszytometer. Rezeptoren, die mit dem GFP_{VHH} gekoppelt wurden, enthalten im extrazellulären Teil ein myc-tag (EQKLISEEDL). Die ist eine Polypeptid-Sequenz des *c-myc* Gens, welche mittels Antikörper spezifisch nachgewiesen werden kann. Für mCherry_{VHH} gekoppelte Rezeptoren wurde der HA-tag (YPYDVPDYA) verwendet, welches eine Sequenz des Hämagglutinins des Influenza A Virus enthält (143). An diese Sequenzen binden die spezifischen Primärantikörper und in einem zweiten Schritt fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper. Diese enthalten ein Fluorophor, welches bei einer spezifischen Wellenlänge angeregt werden kann. Die Zellen werden einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Dieser regt den Fluoreszenzfarbstoff an und führt zu einer spezifischen Emission, welche detektiert wird. Hierüber kann Rückschluss auf die Oberflächenexpression der gewünschten Rezeptoren geschlossen werden.

Hierzu wurden die zu analysierenden Ba/F3-gp130-Zellen zentrifugiert (RT, 300 g, 5 min), in sterilem PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Dann wurden 5×10^5 Zellen in ein neues Reaktionsgefäß überführt, erneut zentrifugiert (4°C, 300 g, 5 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden den Zellen 100 µl FACS-Puffer und anschließend der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung zugegeben. Für GFP_{VHH}-gekoppelte Zelllinien wurde der myc-Antikörper und für mChery_{VHH}-gekoppelte Zelllinien der HA-Antikörper verwendet. Im Anschluss erfolgte eine zweistündige Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden erneut, wie oben beschrieben, in FACS-Puffer gewaschen. Dies sollte nicht gebundenen Primärantikörper im Überstand entfernen. Nachfolgend wurde das Zellpellet in 100 µl FACS-Puffer mit zugegebenem Sekundärantikörper resuspendiert und für 1 h auf Eis unter Lichtschutz inkubiert. Vor der eigentlichen Messung mittels BD FACS Canto II wurden die Zellen ein letztes Mal in FACS-Puffer gewaschen, um nicht-gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Das Zellpellet wurde für die Analyse in 500 µl FACS-Puffer gelöst. Die Analyse und Auswertung

der Daten wurde mittels FCS Express 4 Flow Cytometry Software von De Novo Software (Los Angeles, CA, USA) vorgenommen.

5.3.4 Zellviabilitätsassay

Ba/F3-gp130-Zellen können nur in Abhängigkeit von Zytokinen überleben und proliferieren. Der CELLTITER-BLUE[®] CELL VIABILITY ASSAY enthielt violettfarbenes, nicht-fluoreszierendes Resazurin, welches in Anwesenheit von vitalen Zellen zu rosafarbenen, fluoreszierenden Resorufin reduziert wird. Dieser Prozess geschieht proportional zur Anzahl der vitalen Zellen. Anschließend erfolgt eine Messung der Fluoreszenz des Resorufin mittels Tecan Infinite M200 PRO Reader. Dies wurde genutzt, um die Zellviabilität in Abhängigkeit des zugegebenen Zytokins konzentrationsabhängig zu messen.

Hierzu wurden die Ba/F3-gp130-Zellen zunächst zentrifugiert (300 g, 5 min, RT) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml vorgewärmten PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert. Die Schritte wurden wiederholt, bis die Zellen insgesamt drei Mal in PBS resuspendiert wurden. Dies soll gewährleisten, dass im Medium vorhandene Zytokine so weit verdünnt werden, dass sie keinen Effekt mehr auf die Zellviabilität haben. Anschließend wurden die Zellen in 3-5 ml DMEM^{+/+} resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine Konzentration von 10⁵ Zellen/ml verdünnt und die jeweiligen Zytokine oder fluoreszierenden Proteine hinzugegeben. Von dieser Suspension wurden pro Bedingung jeweils 100 µl in je drei Vertiefungen einer 96-well-Platte (Triplikate) gegeben. Anschließend wurden die Zellen für zwei Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Um nun die Viabilität zu bestimmen, wurden pro well 20 µl des Resazurin-enthaltenden CELLTITER-BLUE[®]-Reagenz zugegeben. Die Exzitation bei 560 nm und die Emission bei 590 nm wurden mittels Tecan Infinite M200 PRO Reader ermittelt. Messungen fanden zum Zeitpunkt 0 und alle 20 min für insgesamt 2 h statt. In der Zwischenzeit wurden die Zellen bei 37°C inkubiert. Zur Auswertung wurden die Messwerte zum Zeitpunkt 0 von den auszuwertenden Messwerten subtrahiert, um eine Normierung zu gewährleisten. Da für jede Bedingung drei wells gemessen wurden, wurde anschließend der Mittelwert mit Standardabweichung bestimmt. Die Varianzanalyse erfolgte mit der

Statistiksoftware GraphPad Prism 6.0. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ gewählt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

5.3.5 Stimulationsassay

Zur Untersuchung, welche Zytokine bzw. fluoreszierenden Moleküle einen Effekt auf die jeweilige Zelllinie haben, wurde unter anderem der Stimulationsassay verwendet. Es sollte im Western Blot untersucht werden, ob Jak/STAT-, MAPK/ERK1/2- oder PI3K/AKT-Signalwege aktiviert werden. Hierzu wurde die entsprechende Zelllinie fünf Mal in sterilem PBS (gemäß Abschnitt 5.2.4) gewaschen. Es wurden eineinhalb volle Petrischalen verwendet, um später eine ausreichende Ausbeute zu generieren. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml DMEM^{-/-} resuspendiert und in eine Vertiefung einer 6-well-Platte gegeben. Durch diese Vorgänge werden verbliebene Zytokine und Wachstumsfaktoren aus dem Medium entfernt. Dies bewirkt, dass die Zellen die verbliebenen Energieträger im Medium rasch aufbrauchen und die Signalkaskaden für deren Wachstum weniger aktiviert werden (*starving*). Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ für mindestens 6 h inkubiert und anschließend durch Zugabe der jeweiligen Zytokine bzw. fluoreszierenden Proteine stimuliert. Nach einer Inkubation von 1 h wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1500 g, 5 min, 4°C), der Überstand verworfen und die Zellpellets in flüssigem Stickstoff gefroren oder direkt zur Weiterverarbeitung gemäß 5.4.1 in Lysepuffer resuspendiert. Für die zeitabhängige Analyse im Längsschnitt wurde die Inkubationszeit nach Zugabe der Zytokine entsprechend angepasst.

5.4 Proteinbiochemische Methoden

5.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Um unter Abschnitt 5.3.5 zentrifugierten Zellpellets weiter zu analysieren, wurden diese in 200 µl Lysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 2 h bei 4°C unter Rotation wurden die Zellen erneut zentrifugiert (10000 g, 15 min, 4°C) und der Überstand zur weiteren Verarbeitung in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

5.4.2 Bestimmung des Proteingehalts mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay

Im Anschluss an die Lyse der Zellen wurde der Proteingehalt des Gemischs über ein BCA Protein Assay Kit bestimmt. Cu^{2+} -Ionen binden an Peptidbindungen und werden bei alkalischem pH-Wert zu Cu^+ -Ionen reduziert. Diese wiederum führen in Anwesenheit von BCA zu einer violetten Färbung der Lösung. Diese Farbänderung der Lösung ist proportional zum Proteingehalt des Gemischs und kann über eine Absorption bei 562 nm bestimmt werden. Es wurde eine 1:20 Verdünnung der Zelllysate in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ hergestellt und jeweils doppelt auf eine 96-well-Platte aufgebracht. Als Referenz wurden bekannte Konzentrationen von BSA verwendet und ebenfalls doppelt aufgetragen, um eine Standardgerade mit Geradengleichung als Referenz zu erstellen. Die beiden Reagenzien des Kits wurden gemäß Herstellerangaben zu den Lysaten gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 30 min bei 37°C. Die Absorptionsmessung bei 562 nm erfolgte mittels Tecan Infinite M200 PRO Reader.

5.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Um mittels Antikörper die Rezeptorexpression oder Phosphorylierung von Signalmolekülen nachweisen zu können, wurde der Western Blot verwendet. Hierbei wurden 10% SDS-Polyacrylamid-Gele mit einer Stärke von 1,5 mm zur Gelelektrophorese genutzt. Diese bestanden aus einem Sammelgel, in welchem sich die Taschen für die Probenbeladung befanden und einem Trenngel. Letzteres dient im Verlauf der Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 15 gezeigt.

Tabelle 15: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngelen für SDS-PAGE (144)

| Sammelgel | Trenngel | |
|------------------|-----------------|-------------------------------------|
| 0,67 ml | 4 ml | Acrylamid 30%-ig |
| 1 ml | | Sammelgelpuffer |
| | 2,6 ml | Trenngelpuffer |
| 40 µl | 100 µl | 10% APS |
| 4 µl | 4 µl | Tetramethylethylendiamin (TEMED) |
| 2,28 ml | 3,3 ml | H ₂ O _{dd} |

Die Gele wurden, wenn nicht anders angegeben, mit je 50 µg Gesamtproteinmenge beladen. Zu den zuvor hergestellten Zellysaten wurde Lämmli-Puffer zugegeben. Dieser enthält β-Mercaptoethanol, wodurch Disulfidbrücken gelöst werden. Das Gemisch wurde zudem für 10 min bei 98°C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufzubrechen. Diese Schritte sollen eine Linearisierung der Proteine bewirken. Zudem befindet sich im Puffer SDS, welches sich proportional zu der Proteingröße an die Peptidbindungen anlagert. Hierdurch entstehen negativ geladene Komplexe aus SDS und Proteinen, die eine Wanderung zur Anode gewährleisten. Die Gele wurden in eine Kammer mit SDS-Laufpuffer gegeben. Je Probe wurde Lysat mit 50 µg Protein in Lämmli-Puffer auf das Gel geladen. Als Referenzgröße wurde PageRuler™ Prestained Protein Ladder verwendet. Durch Anbringen einer Spannung von 90 V trennen sich die Proteine gemäß ihrer Größe im Polyacrylamid-Gel auf. Anschließend wurde das Gel entnommen, um die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran zu übertragen. Es wurden je vier Lagen Whatman-Papier mit SDS-Laufpuffer durchtränkt. Darauf folgte die PVDF-Membran, welche zuvor 2 min in Methanol aktiviert und 2 min in Transferpuffer gewaschen wurde. Auf diese wurde das SDS-Gel gelegt und von weiteren vier Lagen durchtränktem Whatman-Papier bedeckt. Es wurde das Trans-Blot® Turbo Transfer System verwendet, um eine Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran zu erreichen. Hierzu wurde eine Spannung von 90 V über 90 min verwendet. Die PVDF-Membran wurde anschließend in TBS-T mit 5% Magermilchpulver für 3 h bei Raumtemperatur unter Rotation in einem

50 ml-Reaktionsgefäß inkubiert. Dies sollte freie Proteinbindestellen blockieren. Anschließend wurde die Flüssigkeit verworfen und die Membran für 5 min in TBS-T unter Rotation inkubiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt drei Mal wiederholt. Anschließend wurde der zu detektierende Antikörper in 5 ml Medium und entsprechender Verdünnung hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C und Rotation. Die Membran wurde anschließend erneut drei Mal in TBS-T für 5 min gewaschen. Im Anschluss wurde ein passender Sekundärantikörper in 5 ml TBS-T-Milch zugegeben und die Membran über Nacht inkubiert. Die Membran wurde erneut wie oben zwei Mal in TBS-T gewaschen. Anschließend wurde TBS zugegeben.

Zur Detektion wurde der ChemoCam Imager und die ChemoStar Professional Software der Firma Intas verwendet. Hierzu wurde die Membran gemäß Herstellerangaben mit Immobilon® Western HRP-Substrat bedeckt. Das enthaltene Luminol und Wasserstoffperoxid, führen zu einer Chemilumineszenz bei Bindung an den Sekundärantikörper. Da dieser an den Primärantikörper und letzterer spezifisch an das nachzuweisende Protein bindet, kann über die Chemilumineszenz das gewünschte Antigen detektiert werden. Als Referenz für die Proteingröße wurde PageRuler™ Prestained Protein Ladder aufgetragen.

Um die Bindung des Primär- und Sekundärantikörpers von der PVDF-Membran zu lösen, wurde diese in 50 ml *stripping* Puffer für 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde der Puffer verworfen und die Membran drei Mal in TBS-T gewaschen und für 3 h in TBS-T mit 5% Magermilchpulver inkubiert. Hierdurch kann ein zweiter Primärantikörper eingesetzt werden und wie oben weiterverfahren werden. Zur Bildbearbeitung wurde für die Western Blots die Software ImageJ der *National Institutes of Health* (Bethesda, MD, USA) verwendet.

6 Ergebnisse

Die im Folgenden genannten Ergebnisse wurden zu Teilen bereits am 28.08.2020 im *Journal of Biological Chemistry* (J. Biol. Chem.) veröffentlicht (145).

6.1 Konstruktion und Klonierung der SyCyRs

6.1.1 Konstruktion eines SyCyRs

Ziel der Konstruktion eines SyCyRs ist es, gleiche Signalwege wie der natürliche Rezeptor zu aktivieren und somit zu phänokopieren. Hierzu wurde die cDNA der entsprechenden Zytokinrezeptoren molekularbiologisch mittels Klonierung modifiziert. Die relevanten Domänen für die Signalgebung befinden sich in der Regel intrazellulär und blieben unberührt. Die extrazellulären Domänen binden die Liganden und sorgen für eine Annäherung zweier Rezeptoren und zur Bildung eines Rezeptorkomplexes. Diese extrazellulären Domänen wurden durch hochaffine *nanobodies* (VHH) ersetzt, welche gegen die Fluoreszenzproteine GFP oder mCherry gerichtet sind. Die künstlichen Rezeptoren binden somit nicht mehr die ursprünglichen, natürlichen Liganden, sondern oben genannte Fluoreszenzproteine. Um jedoch eine Dimerisierung der Rezeptoren zu ermöglichen, wie sie bei natürlicher Signalgebung stattfindet, bedarf es dimerer Fluoreszenzproteine. Diese wurden als synthetische Zytokine verwendet und waren rekombinant und gereinigt in der AG Scheller vorhanden. GFP und/oder mCherry waren mittels eines Aminosäurelinkers verbunden. Die verwendeten Fluoreszenzproteine waren GFP-mCherry, 2x-GFP und 2x-mCherry (s. Abb. 5). Diese wurden bakteriell in *E. coli* exprimiert und über ein Poly-Histidin-tag mittels Nickelsäule aufgereinigt und in PBS gelöst.

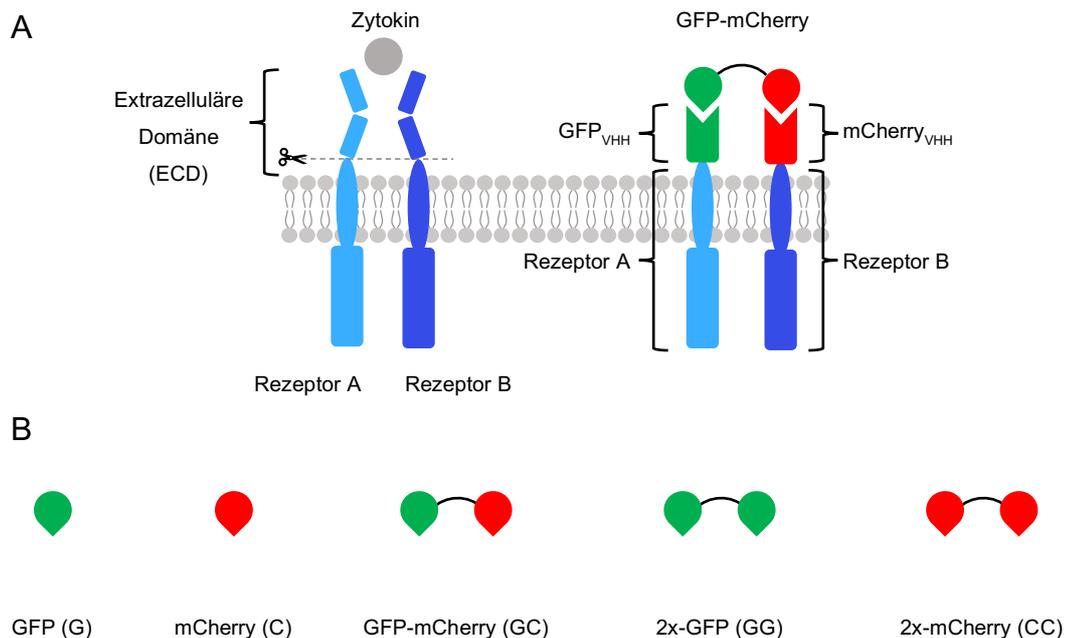


Abbildung 5: Schematischer Aufbau und Konstruktion eines SyCyRs sowie entsprechende Liganden.

Die extrazelluläre Domäne der zu untersuchenden Rezeptoren wurde durch hochspezifische *nanobodies* (VHH) gegen GFP oder mCherry ausgetauscht, die dann die synthetischen Fluoreszenzproteine binden.

6.1.2 Klonierungsstrategie zur Konstruktion der verschiedenen SyCyRs für den IL-10R2, IL-22R α 1, WSX-1, gp130 und EGFR

Ein SyCyR setzte sich aus den Aminosäuresequenzen für den myc- oder HA-*tag*, dem entsprechenden *nanobody* und den transmembranären und intrazellulären Sequenzen eines Zytokinrezeptors zusammen (s. Abb. 6).

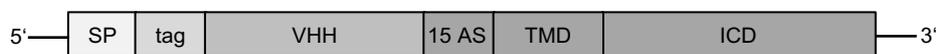


Abbildung 6: Beispielhafte Expressionskassette eines SyCyRs.

Von 5' nach 3' zeigen sich das IL-11R-Signalpeptid (SP), welches dazu dient, dass der jeweilige Rezeptor membranständig exprimiert wird. Dieses wird im Zytoplasma abgespalten. Anschließend folgt ein spezifischer *tag*, welcher zur Detektion im Western Blot oder der Durchflusszytometrie benötigt wird. Weiterhin sind ein spezifischer *nanobody* (VHH) und ein kurzer Abschnitt aus 15 AS dargestellt, der den extrazellulären Teil des SyCyRs mit der Transmembrandomäne (TMD) und dem intrazellulären Teil eines gewünschten Zytokinrezeptors verbindet (ICD).

Die Konstruktion erfolgte über restriktionsenzymatische Spaltungen und Ligationen von verschiedenen Plasmiden und PCR-Produkten (s. Abb. 7). Die jeweiligen Strategien zur Klonierung einzelner Rezeptoren sowie die Aminosäuresequenzen sind im Anhang gelistet.

Als Ausgangsplasmide dienten pcDNA3.1-G_{VHH}gp130 und pcDNA3.1-C_{VHH}L-12Rβ1, welche in der AG Scheller vorlagen (28). Diese wurden mittels der Enzyme EcoRI und NotI gespalten, um die Sequenz für den transmembranären und intrazellulären Teil des Zytokinrezeptors zu entfernen. Der kodierende Teil für die extrazelluläre Domäne eines SyCyRs verblieb im geöffneten Vektor, sodass hier anschließend die Sequenzen für die gewünschten Rezeptoren mittels Ligation eingefügt werden konnten. Diese Sequenzen der intrazellulären Teile der Rezeptoren wurden aus anderen bereits vorhandenen Plasmiden mittels PCR oder restriktionsenzymatischer Spaltung isoliert. Über dieses Schema konnten so mittels Klonierung die zu untersuchenden Rezeptoren ausgetauscht werden.

Die cDNA des SyCyRs wurde aus pcDNA3.1 nach restriktionsenzymatischer Spaltung mit PmeI isoliert. Anschließend wurde diese in pMOWS-Vektoren ligiert. Dies sind retrovirale Vektoren, die für die Transfektion von Phoenix-Eco-Zellen benötigt werden, um so Viruspartikel für eine retrovirale Transduktion einer weiteren Zelllinie herzustellen. Da durch die PmeI *blunt ends* in der einzufügenden Sequenz (*insert*) entstanden sind, werden auch *blunt ends* im pMOWS-Vektor für die Ligation benötigt. Zuvor wurde dieser mit den Restriktionsenzymen EcoNI und BamHI gespalten. Anschließend wurden die entstandenen *sticky ends* mit dem Klenow-Fragment komplementär aufgefüllt, um den Vektor für die Ligation vorzubereiten. Die pMOWS-Vektoren enthalten eine gekoppelte Resistenz gegen Hygromycin B oder Puromycin, um eine Selektion der retroviral transduzierten Zellen zu ermöglichen. Dabei wurden G_{VHH}-gekoppelte SyCyRs mit einer Puromycin-Resistenz und C_{VHH}-gekoppelte SyCyRs mit einer Hygromycin B-Resistenz versehen.

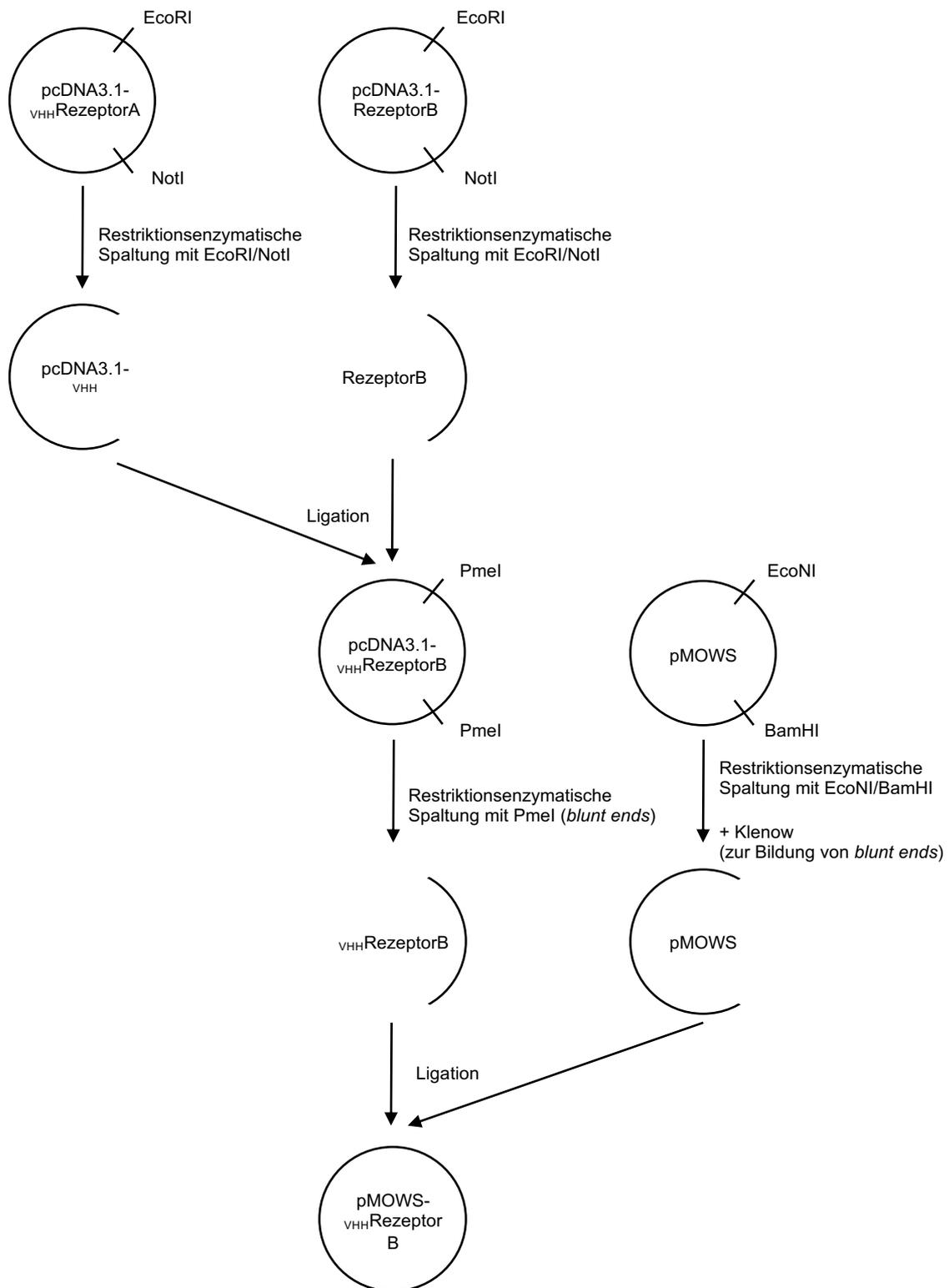


Abbildung 7: Allgemeine Klonierungsstrategie der SyCyRs.

Über Restriktionsenzymatische Spaltungen und anschließende Ligationen werden zunächst die SyCyRs in pcDNA3.1-Vektoren zusammengesetzt und anschließend in retrovirale pMOWS-Vektoren eingebracht. Die spezifischen Klonierungsstrategien einzelner Rezeptoren sind im Anhang gelistet.

Ergebnisse

Nach erfolgreicher Klonierung wurden Ba/F3-gp130-Zellen mit den SyCyRs retroviral transduziert. Eine genaue Übersicht über die klonierten Plasmide und hergestellten Zelllinien findet sich in Tabelle 16 und Tabelle 17.

Tabelle 16: Klonierte Plasmide

| Klonierte Plasmide | Resistenz |
|---------------------------------------|------------------|
| pcDNA3.1-C _{VHH} EGFR | Ampicillin |
| pcDNA3.1-C _{VHH} gp130 | Ampicillin |
| pcDNA3.1-C _{VHH} IL-10R2 | Ampicillin |
| pcDNA3.1-C _{VHH} IL-22Ra1 | Ampicillin |
| pcDNA3.1-C _{VHH} WSX-1 | Ampicillin |
| pcDNA3.1-G _{VHH} EGFR | Ampicillin |
| pcDNA3.1-G _{VHH} IL-10R2 | Ampicillin |
| pcDNA3.1-G _{VHH} IL-22Ra1 | Ampicillin |
| pMOWS-hygro-C _{VHH} EGFR | Ampicillin |
| pMOWS-hygro-C _{VHH} gp130 | Ampicillin |
| pMOWS-hygro-C _{VHH} IL-10R2 | Ampicillin |
| pMOWS-hygro-C _{VHH} IL-22Ra1 | Ampicillin |
| pMOWS-hygro-C _{VHH} WSX-1 | Ampicillin |
| pMOWS-puro-G _{VHH} EGFR | Ampicillin |
| pMOWS-puro-G _{VHH} IL-10R2 | Ampicillin |
| pMOWS-puro-G _{VHH} IL-22Ra1 | Ampicillin |

Tabelle 17: Retroviral transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen

| Transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen | Resistenz |
|--|------------------------|
| G _{VHH} IL-10R2 | Puromycin |
| G _{VHH} gp130 | Puromycin |
| G _{VHH} EGFR | Puromycin |
| G _{VHH} IL-23R | Puromycin |
| C _{VHH} IL-10R2 | Hygromycin B |
| C _{VHH} WSX-1 | Hygromycin B |
| C _{VHH} gp130 | Hygromycin B |
| C _{VHH} IL-22Ra1 | Hygromycin B |
| C _{VHH} EGFR | Hygromycin B |
| G _{VHH} IL-10R2/C _{VHH} IL-22Ra1 | Puromycin/Hygromycin B |

| Transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen | Resistenz |
|---|------------------------|
| G _{VHH} gp130/C _{VHH} IL-22R α 1 | Puromycin/Hygromycin B |
| G _{VHH} EGFR/C _{VHH} gp130 | Puromycin/Hygromycin B |
| G _{VHH} IL-23R/C _{VHH} gp130 | Puromycin/Hygromycin B |
| G _{VHH} IL-10R2/C _{VHH} gp130 | Puromycin/Hygromycin B |
| G _{VHH} gp130/C _{VHH} WSX-1 | Puromycin/Hygromycin B |
| G _{VHH} IL-10R2/C _{VHH} gp130 | Puromycin/Hygromycin B |

6.2 IL-22-SyCyR phänokopiert den Wildtyp-IL-22R in Ba/F3-gp130-Zellen

Nach der Klonierung lagen die SyCyRs in Plasmiden für die retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen vor. Ba/F3-Zellen sind murine prä-B-Zellen, die zytokinabhängig unter Zugabe von IL-3 proliferieren. Die im Rahmen dieser Arbeit genutzten Zellen exprimierten zusätzlich stabil den humanen Rezeptor gp130, welcher für IL-6-abhängige Signalgebung relevant ist. Da Ba/F3-Zellen jedoch keinen membrangebunden IL-6R besitzen, der im Komplex mit gp130 Signalgebung ermöglicht, können sie nicht mittels IL-6 allein stimuliert werden. Daher wurde für die Kultivierung der Ba/F3-gp130-Zellen sowie als Positivkontrolle für Proliferationsassays und Zellstimulationen Hyper-IL-6 (HIL-6) verwendet. Dies ist ein synthetisches Hyper-Zytokin, welches aus dem sIL-6R und über einen Aminosäure-Linker verbundenen IL-6 besteht (146). Hierdurch kann in Ba/F3-gp130-Zellen IL-6 *trans-signaling* auch ohne membrangebundenen IL-6R ausgelöst werden. Das verwendete rekombinante HIL-6 wurde in aufgereinigter Form von der AG Scheller bereitgestellt.

Zunächst sollte die IL-22-vermittelte Signalgebung phänokopiert werden. IL-22 bindet an einen heterodimeren Rezeptor aus dem langkettigen IL-22R α 1 und den kurzkettigen IL-10R2. Für den IL-22-SyCyR wurde die extrazelluläre Domäne des IL-10R2 durch einen *nanobody* gegen GFP (G_{VHH}) ersetzt. Für den IL-22R α 1 wurde analog mit einem gegen mCherry gerichteten *nanobody* (C_{VHH}) verfahren. Eine schematische Darstellung zeigt sich in Abbildung 8. Für den Vergleich der Signaltransduktion des Wildtyp-IL-22R und des IL-22-SyCyRs wurden von der AG

Scheller Ba/F3-gp130/IL-10R2/IL-22R α 1 bereitgestellt, welche konstitutiv die beiden Untereinheiten des natürlichen, murinen IL-22R exprimieren.

Nach sukzessiver retroviraler Transduktion der Ba/F3-gp130-Zellen mit den synthetischen Konstrukten G_{VHH}IL-10R2 und C_{VHH}IL-22R α 1 erfolgte eine Analyse der Expression mittels Western Blot und der Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie. Die beiden *nanobodies* waren hierzu mit zwei verschiedenen *tags* versehen. Dies sind kurze Peptidsequenzen, die mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden können. Für den mCherry_{VHH} wurde der sogenannte HA-*tag* verwendet, welcher eine Peptidsequenz des Hämagglutinins des Influenzavirus beinhaltet. Für den GFP_{VHH} wurde der myc-*tag*, eine Peptidsequenz des Proteins c-myc, genutzt. Die Anti-HA- und Anti-myc-Primärantikörper konnten an den jeweiligen *nanobody* binden. Anschließend erfolgte eine Untersuchung mittels Western Blot hinsichtlich der Expression (s. Abb. 8B). Zudem wurde mittels fluoreszierender Sekundärantikörper in der Durchflusszytometrie eine Oberflächenexpression nachweisen. Dies zeigt sich in einer Rechtsverschiebung der Histogramme (s. Abb. 8C). Die Expression der SyCyRs konnte in der gewünschten Zelllinie so vor Durchführung weiterer Versuche sichergestellt werden.

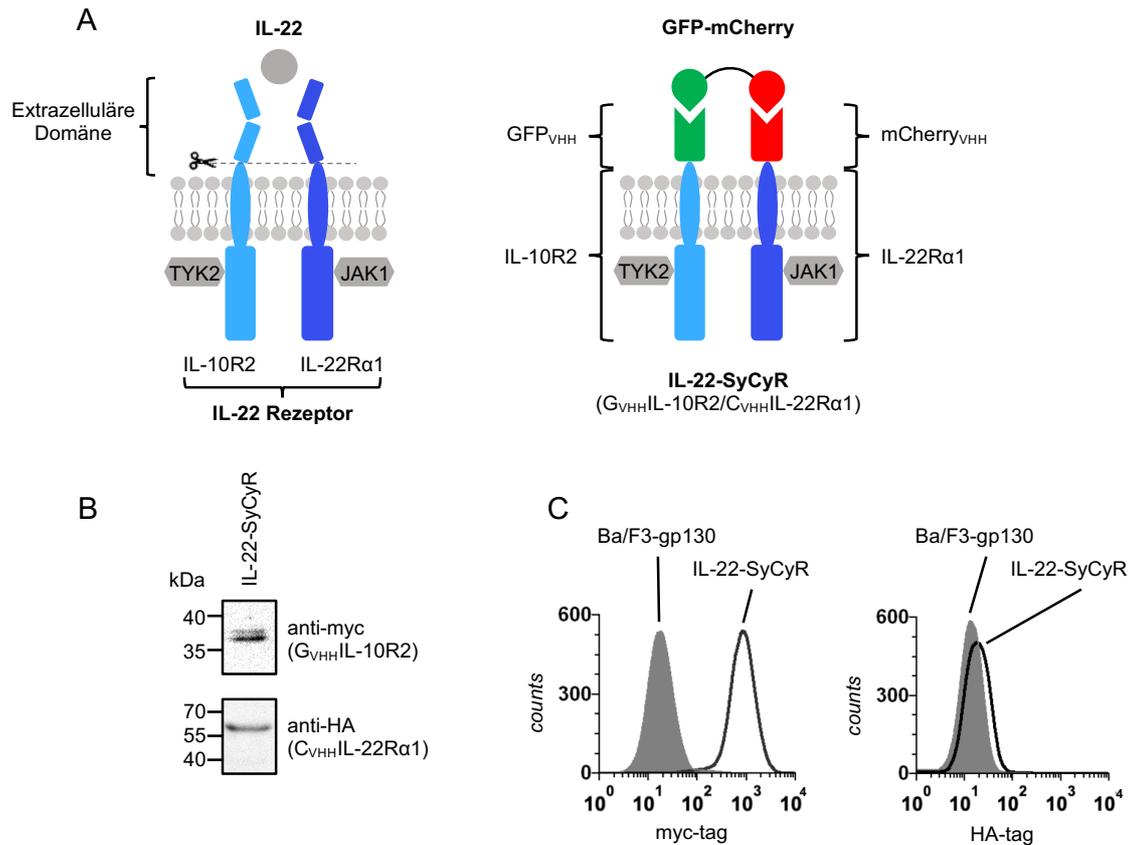


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Wildtyp-IL-22R und des IL-22-SyCyR sowie Expressionsanalyse der beiden Rezeptoren mittels Durchflusszytometrie und Western Blot.

A: Der IL-22-SyCyR besteht aus der GFP-bindenden Untereinheit $G_{VHH}IL-10R2$ und der mCherry-bindenden Untereinheit $C_{VHH}IL-22R\alpha1$. Bei beiden Rezeptoren wurden die jeweiligen extrazellulären Domänen des natürlichen Rezeptors durch *nanobodies* gegen Fluoreszenzproteine (G_{VHH}/C_{VHH}) ausgetauscht, um so eine Dimerisierung über das heterodimere GFP-mCherry zu bewirken.

B: Expressionsanalyse im Western Blot mit Anti-myc- und Anti-HA-Antikörpern. Der Anti-myc-Antikörper bindet an den G_{VHH} , der Anti-HA-Antikörper an den C_{VHH} . Es wurden 50 µg Gesamtprotein pro Bedingung auf das SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gel geladen.

C: Durchflusszytometrie zur Expressionsanalyse der Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Das grau gefüllte Histogramm stellt die Ergebnisse mit untransduzierten Ba/F3-gp130-Zellen als Negativkontrolle dar. Die weiß gefüllten Histogramme zeigen die $G_{VHH}IL-10R2/C_{VHH}IL-22R\alpha1$ -Zellen. Der Anti-myc-Antikörper bindet an den G_{VHH} , der Anti-HA-Antikörper an den C_{VHH} .

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die Rezeptoren in Ba/F3-gp130-Zellen biologisch aktiv sind. Hierzu wurde unter Zugabe von GFP-mCherry das Proliferationsverhalten von $G_{VHH}IL-10R2/C_{VHH}IL-22R\alpha1$ -Zellen (IL-22-SyCyR) untersucht. Als Kontrollen wurden hierzu die IL-10R2/IL-22Rα1- und untransduzierte Ba/F3-gp130-Zellen verwendet. Untransduzierte Ba/F3-gp130-Zellen sollten weder den natürlichen IL-22R noch den SyCyR exprimieren und somit nicht IL-22Fc- oder GFP-mCherry-responsiv sein. Die untransduzierten Ba/F3-gp130-Zellen zeigten, wie erwartet, nur bei HIL-6 eine Proliferation und die Zelllinie,

welche den natürlichen IL-22R bilden kann, proliferierte mit IL-22Fc und HIL-6. Die Zelllinie mit dem synthetischen IL-22-SyCyR zeigte bei Zugabe des Fluoreszenzproteins GFP-mCherry signifikante Proliferation und konnte somit erfolgreich stimuliert werden (s. Abb. 9A).

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die halbmaximale effektorische Konzentration (EC_{50}) zur Proliferation von GFP-mCherry und IL-22Fc in den jeweiligen Zelllinien vergleichbar ist. Für die mit GFP-mCherry stimulierten IL-22-SyCyR-Zellen wurde eine halbmaximale effektorische Konzentration (EC_{50}) von 7,48 ng/ml berechnet. Für IL-22Fc in Wildtyp-IL-22R-Zellen betrug diese 33,45 ng/ml. Zudem zeigte sich, dass auch bei hohen Konzentrationen von GFP-mCherry kein unspezifischer Proliferationsreiz auf Wildtyp-IL-22R-Zellen auftrat (s. Abb. 9B). Die Effekte von GFP-mCherry sind demnach auf die Komplexbildung der synthetischen Rezeptoren zurückzuführen.

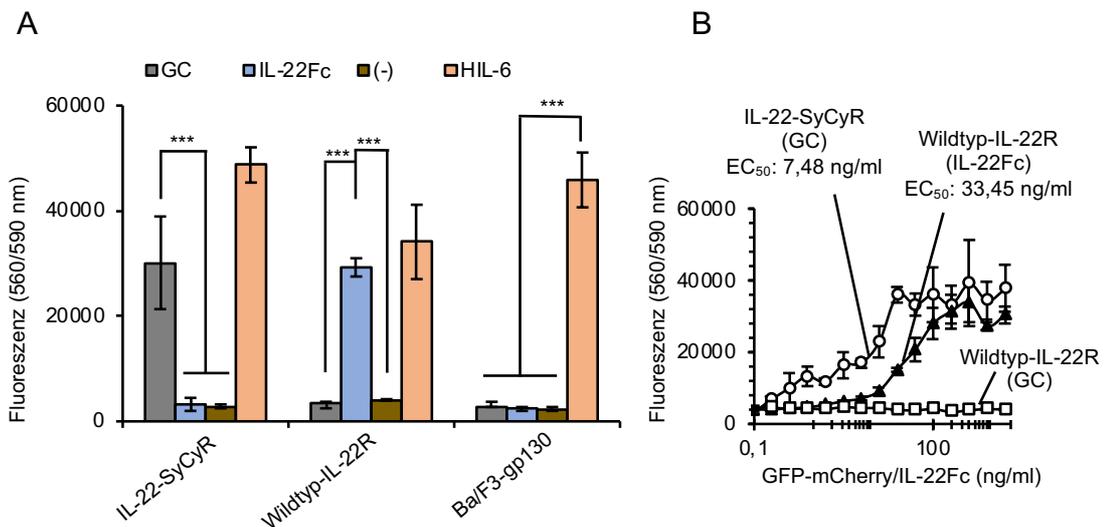


Abbildung 9: Proliferation von IL-22-SyCyR-Zellen sowie Wildtyp-IL-22R-Zellen.

A: Ba/F3-gp130-Zellen mit IL-22-SyCyR ($G_{VHH}IL-10R2/C_{VHH}IL-22R\alpha1$) und mit Wildtyp-IL-22R ($IL-10R2/IL-22R\alpha1$) sowie untransduzierte Zellen wurden mit jeweils 100 ng/ml GFP-mCherry, IL-22Fc oder HIL-6 stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei gleichzeitigen, verschiedenen Messungen. Es ist ein repräsentatives Experiment von $n=3$ dargestellt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

B: Ba/F3-gp130-Zellen mit IL-22-SyCyR wurden mit steigenden Konzentrationen GFP-mCherry stimuliert. Ba/F3-gp130-Zellen mit natürlichem IL-22R wurden mit steigenden Konzentrationen GFP-mCherry sowie mit IL-22Fc stimuliert. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation bei 560 nm, Emission bei 590 nm) diente als Parameter für die Proliferation. Es ist jeweils ein repräsentatives Experiment von $n=3$ dargestellt.

Nicht nur das Proliferationsverhalten, sondern auch die aktivierten Signalwege waren bei der Analyse der SyCyRs von Interesse. IL-22 löst unter anderem eine Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges aus. In einem Stimulationsassay wurde die Signalgebung in IL-22-SyCyR-Zellen sowie in Wildtyp-IL-22R-Zellen untersucht. Hierzu wurde im Western Blot die Phosphorylierung von STAT3 unter Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen (s. Abb. 10). Die Zellen wurden mittels GFP-mCherry stimuliert. Als Positivkontrollen dienten IL-22Fc und HIL-6. Als Negativkontrollen wurden monomeres GFP und mCherry verwendet. Ferner wurden auch 2x-GFP und 2x-mCherry verwendet. Die Monomere hatten keinerlei Einfluss auf beide Zelllinien. Dimeres GFP-mCherry konnte erfolgreich die Aktivierung von STAT3 des natürlichen IL-22-Rezeptors phänokopieren. Bei 2x-GFP zeigte sich jedoch ebenfalls eine Phosphorylierung von STAT3, was zu der Annahme führte, dass homodimere GFP_{VHH}IL-10R2-Komplexe ebenfalls biologisch aktiv sind. Hierauf wird in Abschnitt 6.2.1 eingegangen.

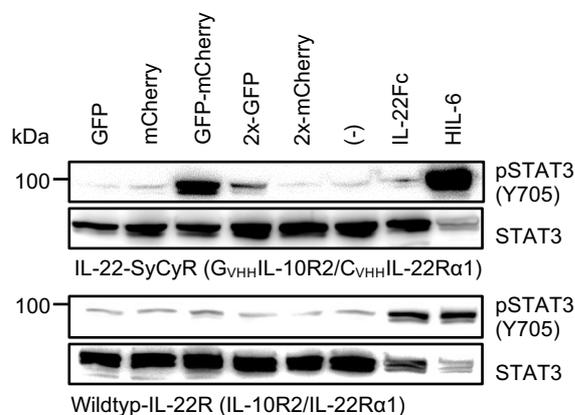


Abbildung 10: Ba/F3-gp130-Zellen mit IL-22-SyCyR aktivieren STAT3 nach GFP-mCherry Stimulation.

Ba/F3-gp130-Zellen mit IL-22-SyCyR und Ba/F3-gp130-Zellen mit Wildtyp-IL-22R wurden mit 100 ng/ml Fluoreszenzproteinen, IL-22Fc oder HIL-6 für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Anschließend wurden pSTAT3 und STAT3 im Western Blot nachgewiesen. Für das SDS-PAA-Gel wurden 50 µg Gesamtprotein (25 µg für die Kontrolle mit HIL-6) aufgetragen. Es ist ein repräsentatives Experiment von n=3 gezeigt.

IL-22-vermittelte Jak/STAT-Signalgebung induziert die Expression von SOCS3, welches als möglicher negativer Feedbackmechanismus über die Inhibition von STAT3 dienen kann (120). In einer zeitabhängigen Stimulation mit IL-22Fc und

GFP-mCherry wurde der Verlauf der Phosphorylierung von STAT3 und der parallelen Expression von SOCS3 untersucht (s. Abb. 11). Es zeigte sich für die Wildtyp-IL-22R-Zellen nach Gabe von IL-22Fc ein kontinuierlicher Anstieg der pSTAT3-Signalstärke im Western Blot. Eine deutliche Expression von SOCS3 zeigte sich zu den Zeitpunkten nach 120 und 240 min, während bei 480 min die Signalintensität wieder abzunehmen scheint. Für den IL-22-SyCyR ließ sich unter Stimulation mit GFP-mCherry ein ähnlicher Verlauf der Signale zeigen. Die SOCS3-Expression war hier jedoch noch zum Zeitpunkt 480 min deutlich zu detektieren. Als Negativkontrollen wurde die Zelllinie mit dem Wildtyp-IL-22R ebenfalls mit GFP-mCherry und die Zelllinie mit IL-22-SyCyR mit IL-22Fc stimuliert. Eine klare Abnahme der Signalintensität von pSTAT3 und somit eine Rückkopplung über SOCS3 zeigt sich im vorliegenden Experiment weder für den synthetischen noch den Wildtyp-IL-22R.

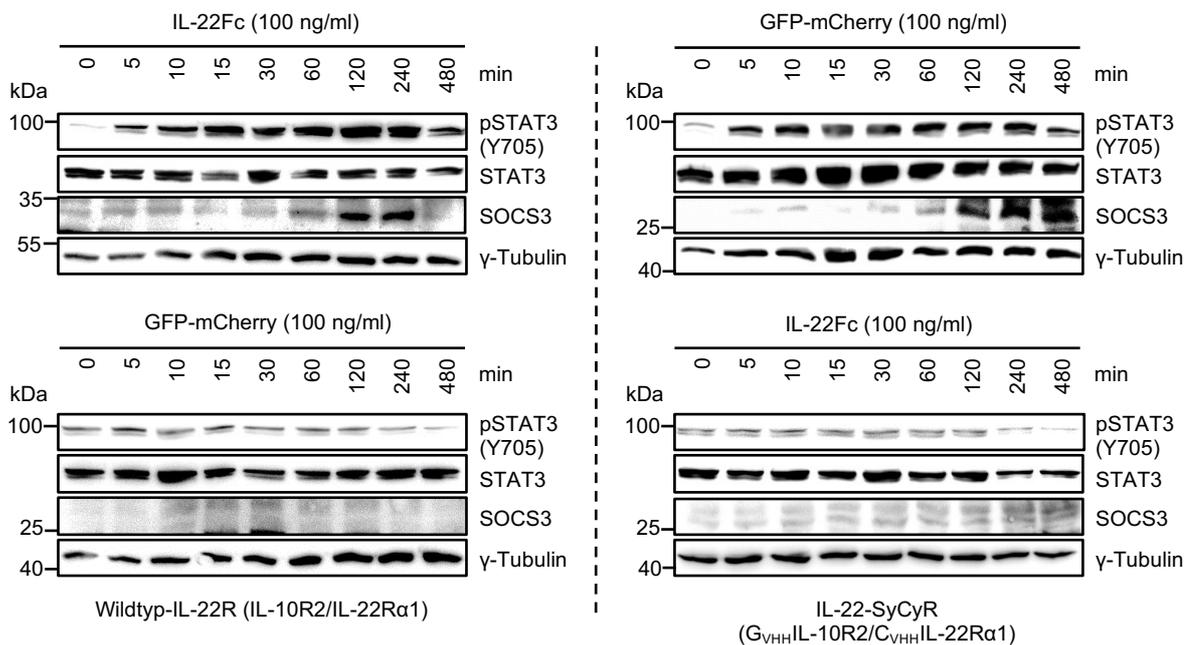


Abbildung 11: Zeitabhängige Stimulation der Ba/F3-gp130-Zellen mit Wildtyp-IL-22R und IL-22-SyCyR. Der IL-22-SyCyR phänokopiert die pSTAT3- und SOCS3-Signaltransduktion des Wildtyp-IL-22R.

Ba/F3-gp130-Zellen mit IL-22-SyCyR (G_{VHH}IL-10R2/C_{VHH}IL-22Rα1) und mit Wildtyp-IL-22R (IL-10R2/IL-22Rα1) wurden jeweils mit 100 ng/ml GFP-mCherry oder IL-22Fc stimuliert. Zeitpunkt 0 wurde nicht stimuliert. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert. Anschließend wurden unter Verwendung spezifischer Antikörper pSTAT3, STAT3, SOCS3 und γ-Tubulin im Western Blot nachgewiesen. Für das SDS-PAA-Gel wurden 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Es ist ein repräsentatives Experiment von n=3 gezeigt.

6.2.1 IL-10R2-Homodimere zeigen biologische Aktivität in Ba/F3-gp130-Zellen, nicht jedoch IL-22R α 1-Homodimere

Zuvor wurde bereits beschrieben, dass 2x-GFP in IL-22-SyCyR-Zellen zu einer Phosphorylierung von STAT3 führte. Daraus ergab sich die Annahme, dass homodimere IL-10R2-Komplexe aktiv sein könnten. Um einen Einfluss des C_{VHH}IL-22R α 1 auszuschließen, wurden Zellen, die lediglich den G_{VHH}IL-10R2 exprimieren, untersucht. Eine schematische Abbildung verdeutlicht erneut das Prinzip (s. Abb. 12A). Ebenso wurde mittels Durchflusszytometrie die Oberflächenexpression des SyCyRs nachgewiesen (s. Abb. 12B).

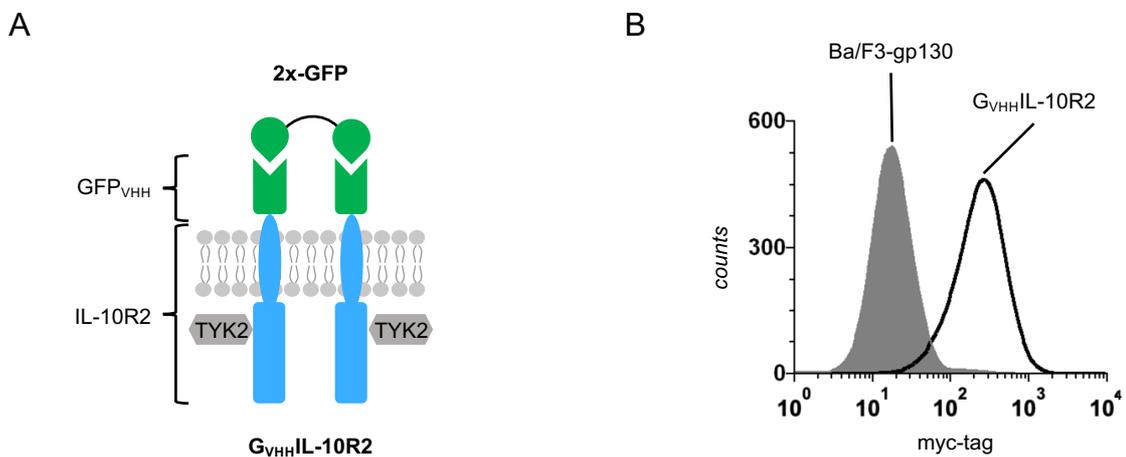


Abbildung 12: Darstellung des G_{VHH}IL-10R2-Homodimers und Durchflusszytometrie zur Untersuchung der Oberflächenexpression.

A: Schematische Darstellung des synthetischen G_{VHH}IL-10R2-Homodimers mit gebundenem 2x-GFP. Die extrazelluläre Domäne des IL-10R2 wurden durch einen spezifischen *nanobody* gegen GFP ausgetauscht.

B: Durchflusszytometrie der Ba/F3-gp130-Zellen mit Anti-myc-Antikörpern und sekundärem Fluoreszenzantikörper. Der Anti-myc-Antikörper bindet an den G_{VHH}. Das grau gefüllte Histogramm stellt die Ergebnisse mit untransduzierten Ba/F3-gp130-Zellen als Negativkontrolle dar. Die durchgezogene Linie stellt die G_{VHH}IL-10R2-Zellen dar.

Ba/F3-gp130-Zellen mit G_{VHH}IL-10R2 wurden mit 100 ng/ml der vorhandenen Fluoreszenzproteine inkubiert und deren Proliferation nach drei Tagen gemessen. Hierbei wurde eine signifikante Proliferation der Zelllinie unter Zugabe von 2x-GFP gemessen (s. Abb. 13A). Monomere Fluoreszenzproteine bewirkten hierbei keine Proliferation. Dies passt zu den Ergebnissen der IL-22-SyCyR-Zellen (s. Abb. 10). Ein konzentrationsabhängiger Proliferationsassay zeigte eine halbmaximale

effektorische Konzentration (EC_{50}) von 44,95 ng/ml für die Stimulation dieser Zellen mit 2x-GFP (s. Abb. 13B).

Da die meisten Zytokinrezeptoren über Jak/STAT eine Signalgebung vermitteln, wurde eine Zellstimulation vorgenommen, um eine Aktivierung von STAT3 zu detektieren (s. Abb. 13C). Zudem zeigte sich eine Phosphorylierung von ERK1/2, was Hinweise auf weitere aktivierte Signalwege liefert, die die Proliferation der Zelllinie erklären können. Somit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass der IL-10R2 in der Lage ist, durch Homodimerisierung eine Signalgebung und Proliferation zu induzieren.

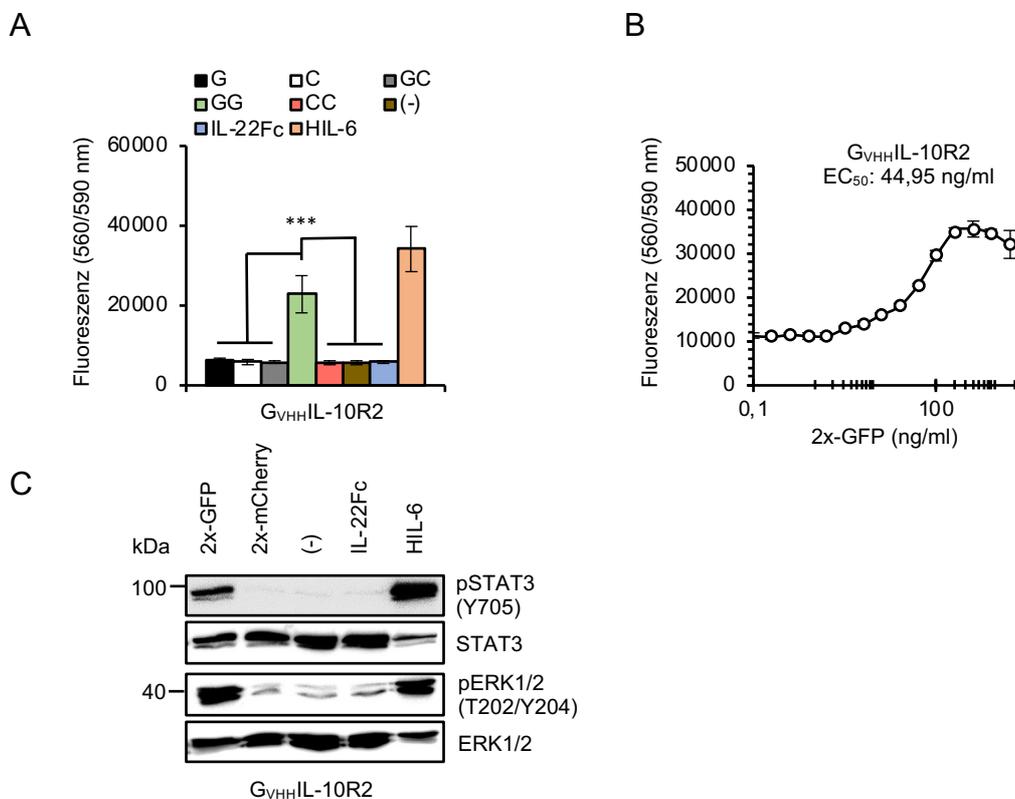


Abbildung 13: Synthetische IL-10R2-Homodimere führen zu Proliferation in Ba/F3-gp130-Zellen.

A: $G_{VHH}IL-10R2$ -Zellen wurden mit 100 ng/ml Fluoreszenzproteinen sowie IL-22Fc und HIL-6 stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation bei 560 nm, Emission bei 590 nm) diente als Parameter für die Proliferation (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). Es ist ein repräsentatives Experiment von $n=3$ gezeigt.

B: $G_{VHH}IL-10R2$ -Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an 2x-GFP stimuliert. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation bei 560 nm, Emission bei 590 nm) diente als Parameter für die Proliferation. Es ist ein repräsentatives Experiment von $n=3$ gezeigt.

C: $G_{VHH}IL-10R2$ -Zellen wurden mit 100 ng/ml Fluoreszenzproteinen für 1 h stimuliert. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert. Für das SDS-PAA-Gel wurden 50 μg Gesamtprotein (25 μg für die Kontrolle mit HIL-6) aufgetragen und pSTAT3, STAT3, pERK1/2 und ERK1/2 mittels spezifischer Antikörper im Western Blot detektiert. Es ist ein repräsentatives Experiment von $n=3$ gezeigt.

Interessanterweise ist die intrazelluläre Domäne des IL-10R2 weitaus kleiner (76 Aminosäurereste) als die des IL-22R α 1 (346 Aminosäurereste). Nach Erzeugung einer weiteren Ba/F3-gp130-Zelllinie, die nur den C_{VHH}IL-22R α 1 enthält, nicht jedoch den G_{VHH}IL-10R2, wurde untersucht, ob 2x-mCherry eine Signalgebung über zwei dimerisierte IL-22R α 1 auslösen kann. Die Oberflächenexpression der synthetischen Rezeptoren wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Anschließend wurden die Zellen mit den Fluoreszenzproteinen stimuliert (s. Abb. 14). Zum einen zeigte sich keinerlei Proliferation unter 2x-mCherry, zum anderen konnte hier auch keine Phosphorylierung von STAT3 festgestellt werden. Dies legt nahe, dass Komplexe aus homodimeren IL-10R2 aktiv sind, nicht jedoch aus IL-22R α 1.

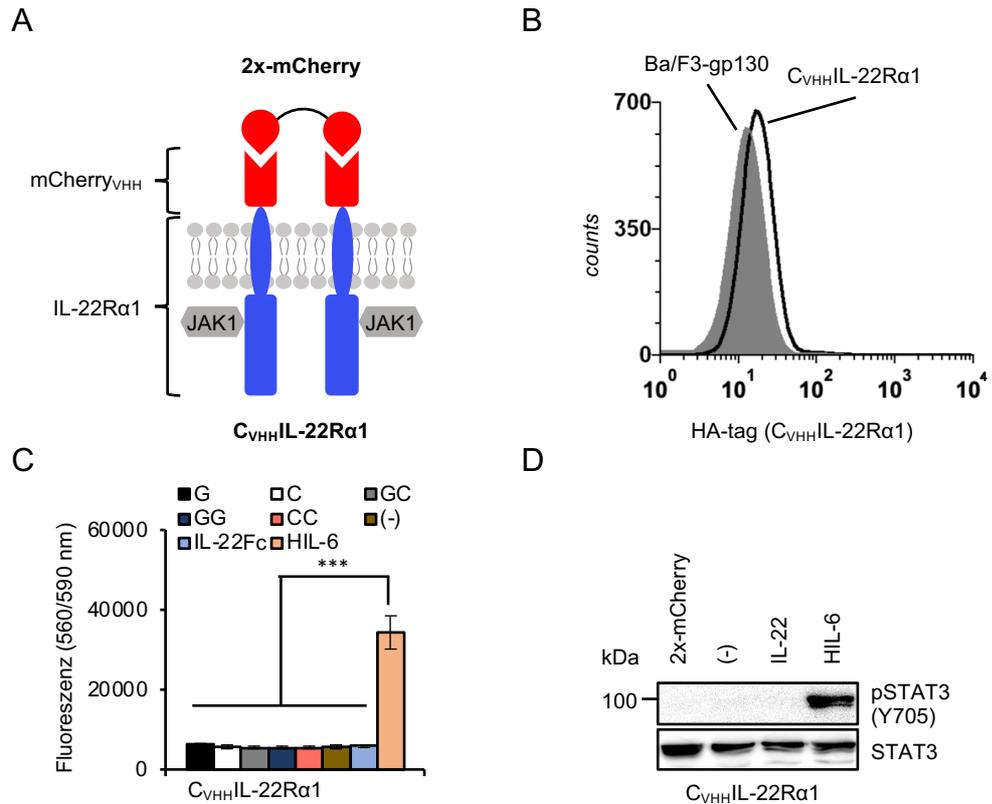


Abbildung 14: Der C_{VHH}IL-22R α 1-SyCyR induziert keine Zellproliferation oder Aktivierung von STAT3.

A: Schematische Darstellung des synthetischen C_{VHH}IL-22R α 1 mit Liganden.

B: Durchflusszytometrie der C_{VHH}IL-22R α 1-Zellen mit Anti-HA-Antikörper und sekundärem Fluoreszenzantikörper. Das grau gefüllte Histogramm stellt die Ergebnisse mit untransduzierten Ba/F3-gp130-Zellen als Negativkontrolle dar. Die durchgezogene Linie repräsentiert die C_{VHH}IL-22R α 1-Zellen.

C: C_{VHH}IL-22R α 1-Zellen wurden mit 100 ng/ml Fluoreszenzproteinen sowie IL-22Fc als Negativ- und HIL-6 als Positivkontrolle stimuliert. Als weitere Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation bei 560 nm, Emission bei 590 nm) diente als Parameter für die Proliferation. Es ist ein repräsentatives Experiment von n=2 gezeigt (* p \leq 0,05, ** p \leq 0,01, *** p \leq 0,001).

D: C_{VHH}IL-22R α 1-Zellen wurden mit 100 ng/ml 2x-mCherry, IL-22Fc oder HIL-6 für 1 h stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert. Für das SDS-PAA-Gel wurden 50 μ g Gesamtprotein (25 μ g für die Kontrolle mit HIL-6) aufgetragen und pSTAT3 und STAT3 mittels spezifischer Antikörper im Western Blot detektiert. Es ist ein repräsentatives Experiment von n=2 gezeigt.

6.2.2 Gp130 bildet funktionelle Heterodimere mit IL-10R2 und IL-22R α 1

Um das kombinatorische Potential der SyCyRs zu erweitern, sollte in einem weiteren Schritt untersucht werden, ob Rezeptoren der IL-10-Familie aktive Komplexe mit gp130, einem Vertreter der IL-6-Familie, bilden können.

Ba/F3-gp130-Zellen wurden mit dem $G_{VHH}IL-10R2$ und $C_{VHH}gp130$ transduziert. Hierbei erfolgte die Selektion einer stabilen Zelllinie, welche beide synthetischen Rezeptoren an der Zelloberfläche exprimiert (s. Abb. 15).

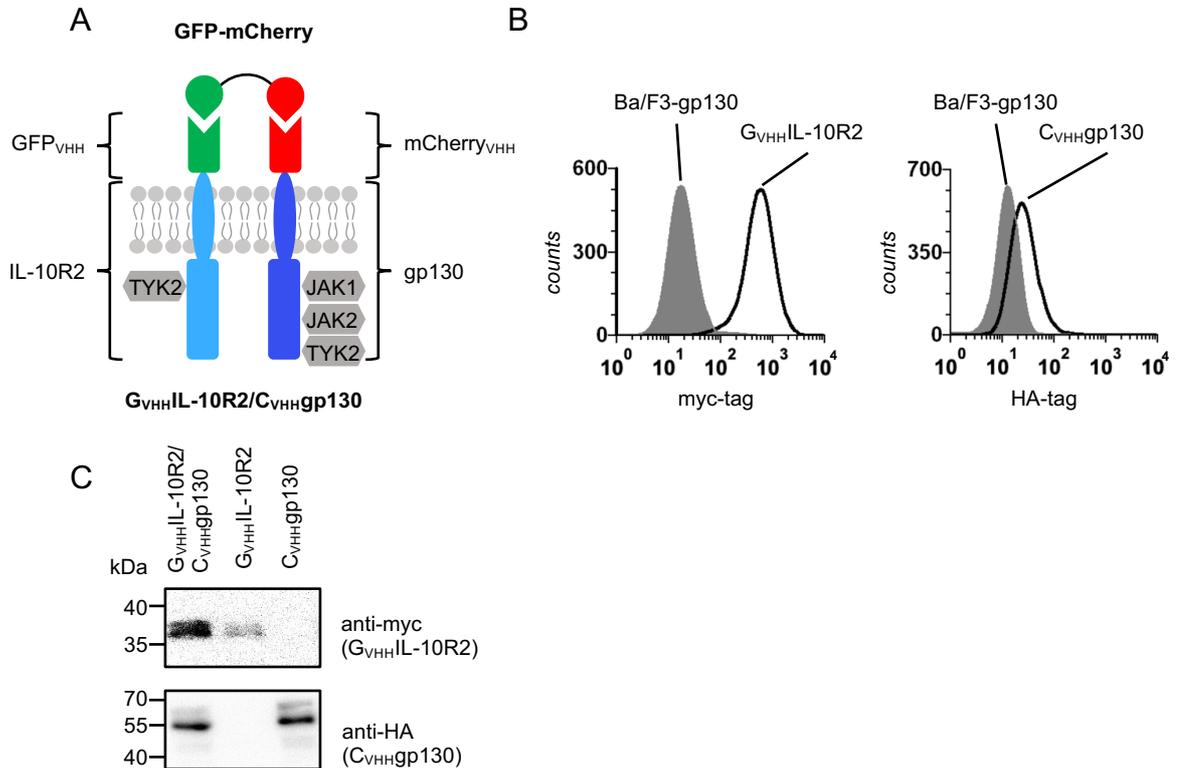


Abbildung 15: Darstellung des synthetischen IL-10R2/gp130-Komplex und Untersuchung der Rezeptorexpression.

A: Schematische Darstellung des synthetischen, heterodimeren Rezeptorkomplexes aus $G_{VHH}IL-10R2$ und $C_{VHH}gp130$. Die extrazellulären Domänen wurden durch *nanobodies* gegen GFP und mCherry ausgetauscht.

B: Durchflusszytometrie der Zellen mit Anti-myc- und Anti-HA-Antikörpern und sekundärem Fluoreszenzantikörper. Der Anti-myc-Antikörper bindet an den G_{VHH} , der Anti-HA-Antikörper an den C_{VHH} . Das grau gefüllte Histogramm stellt die Ergebnisse mit untransduzierten Ba/F3-gp130-Zellen als Negativkontrolle dar.

C: Expressionsanalyse der Rezeptoren mittels Anti-myc-Antikörpern (Nachweis des G_{VHH}) und Anti-HA-Antikörpern (Nachweis des C_{VHH}) im Western Blot. Es wurden 50 μ g Gesamtprotein pro Bedingung auf SDS-PAA-Gel geladen.

Wie in den zuvor genannten Abschnitten wurden die $G_{VHH}IL-10R2/C_{VHH}gp130$ -Zellen mit den Fluoreszenzproteinen stimuliert (s. Abb. 16 A-C). Hierbei zeigte sich wie erwartet, dass ohne Zytokinzugabe sowie mit monomerem GFP und mCherry keine Proliferation gemessen wurde. Zudem zeigte die Zelllinie unter 2x-mCherry eine Proliferation, welche durch die Homodimerisierung der beiden $C_{VHH}gp130$ als

Phänokopie des IL-6-Rezeptors erklärbar ist. Dies wurde bereits durch Engelowski *et al.* für den $G_{VHH}gp130$ nachgewiesen und konnte nun mit dem $mCherry_{VHH}$ reproduziert werden (28). Der Ligand 2x-GFP löste eine Dimerisierung des $G_{VHH}IL-10R2$ aus, weshalb, wie bereits zuvor (s. Abb. 13), eine Zellproliferation ausgelöst wird.

Nach Stimulation mit GFP-mCherry wurde durch Dimerisierung des $G_{VHH}IL-10R2$ mit $C_{VHH}gp130$ ebenfalls eine Zellproliferation ausgelöst. Hierdurch wurde erstmals nachgewiesen, dass der IL-10R2 funktionell aktive Komplexe mit gp130 bilden kann. Bestätigt wird dies durch die Untersuchung des Jak/STAT-Signalweges im Western Blot. Nach Stimulation mit GFP-mCherry erfolgte eine STAT3-Aktivierung (s. Abb. 16A).

Ein konzentrationsabhängiger Proliferationsassay ergab hierbei eine halbmaximale effektorische Konzentration (EC_{50}) von 64,01 ng/ml. Somit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl homodimere IL-10R2-Dimere als auch heterodimere IL-10R2/gp130-Rezeptorkomplexe biologisch aktiv sind und Rezeptoren verschiedener Zytokinfamilien untereinander aktive Komplexe bilden können.

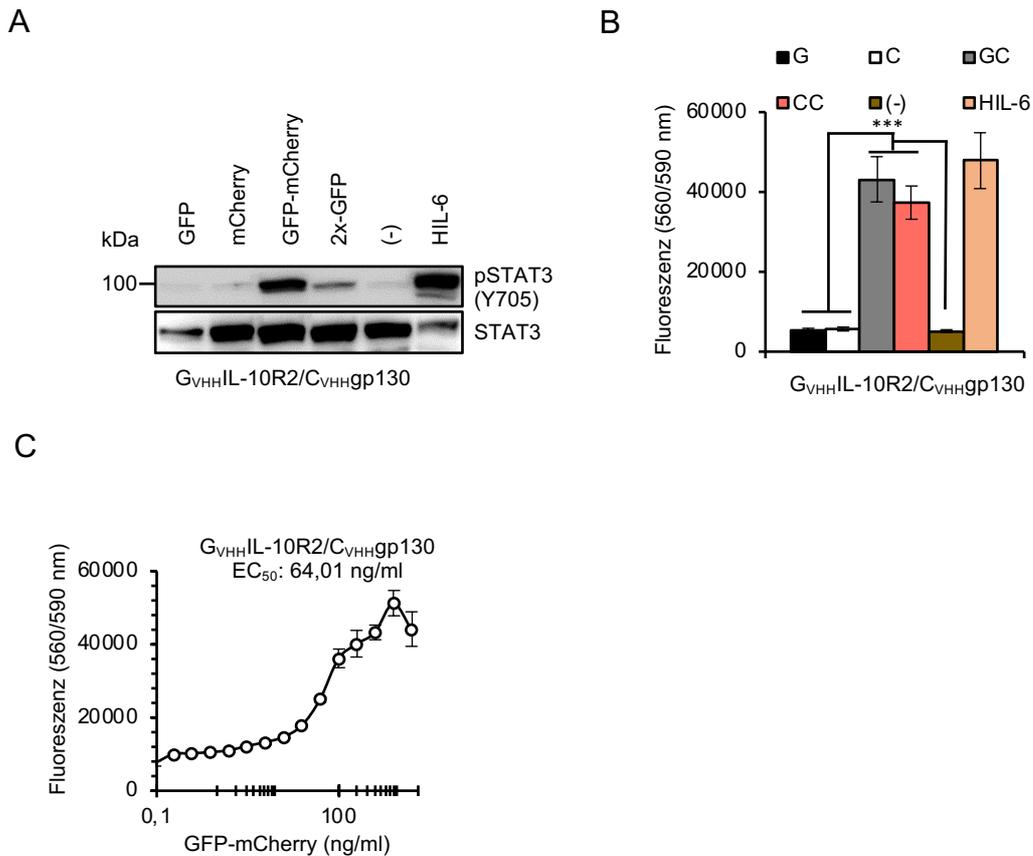


Abbildung 16: Der synthetische IL-10R2/gp130-Komplex zeigt biologische Aktivität in Ba/F3-gp130-Zellen.

A: G_{VHH}IL-10R2/C_{VHH}gp130-Zellen wurden mit 100 ng/ml Fluoreszenzproteinen sowie HIL-6 für 1h bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert. Anschließend wurden pSTAT3 und STAT3 im Western Blot detektiert. Es wurden 50 µg Protein (25 µg für die Kontrolle mit HIL-6) auf das SDS-PAA-Gel geladen. Es ist ein repräsentatives Experiment von n=2 gezeigt.

B: G_{VHH}IL-10R2/C_{VHH}gp130-Zellen wurden mit 100 ng/ml Fluoreszenzproteinen sowie HIL-6 als Positivkontrolle stimuliert. Als weitere Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation bei 560 nm, Emission bei 590 nm) diente als Parameter für die Proliferation. Es ist ein repräsentatives Experiment von n=4 gezeigt. (* p≤ 0,05, ** p≤ 0,01, *** p≤ 0,001)

C: G_{VHH}IL-10R2/C_{VHH}gp130-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an GFP-mCherry stimuliert. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation bei 560 nm, Emission bei 590 nm) diente als Parameter für die Proliferation. Es ist ein repräsentatives Experiment von n=4 gezeigt.

Um herauszufinden, ob auch der IL-22Rα1 in der Lage ist, mit gp130 aktive Rezeptorkomplexe zu bilden, wurde eine Zelllinie mit den entsprechenden SyCyRs hergestellt. G_{VHH}gp130 Zellen waren bereits in der AG Scheller vorhanden (28). Anschließend erfolgte eine Transduktion mit C_{VHH}IL-22Rα1 und eine Oberflächenexpressionsanalyse mittels Durchflusszytometrie (s. Abb. 17).

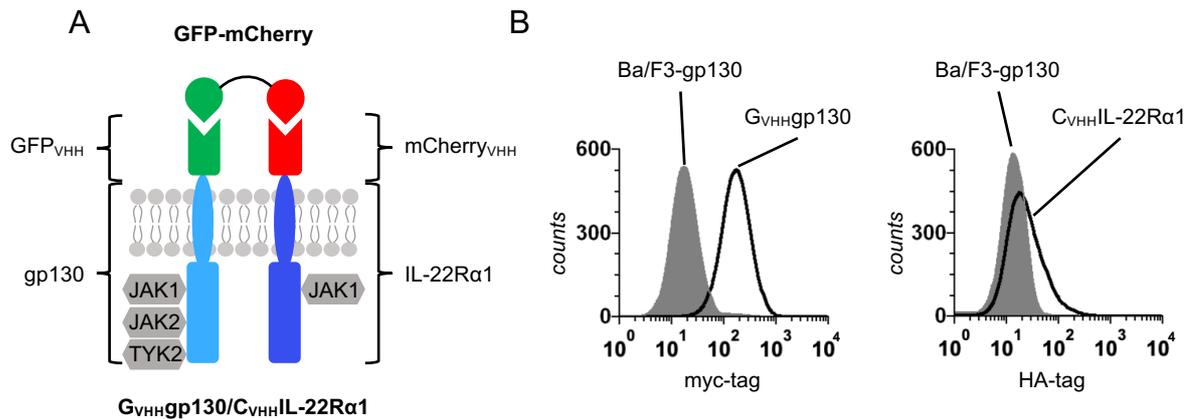


Abbildung 17: Schematische Darstellung des $G_{VHH}gp130/C_{VHH}IL-22R\alpha1$ sowie Expressionsanalyse der beiden Rezeptoren mittels Durchflusszytometrie.

A: Schematische Darstellung des heterodimeren Rezeptorkomplexes. Die extrazellulären Domänen von gp130 und IL-22R α 1 wurden durch *nanobodies* gegen GFP und mCherry (G_{VHH}/C_{VHH}) ausgetauscht, um eine räumliche Annäherung mittels Fusionsprotein GFP-mCherry zu bewirken.

B: Durchflusszytometrie der Zellen mit Anti-myc- und Anti-HA-Antikörpern und sekundärem Fluoreszenzantikörper. Der Anti-myc-Antikörper bindet an den G_{VHH} , der Anti-HA-Antikörper an den C_{VHH} . Das grau gefüllte Histogramm stellt die Ergebnisse mit untransduzierten Ba/F3-gp130-Zellen als Negativkontrolle dar. Die durchgezogene Linie stellt die $G_{VHH}gp130/C_{VHH}IL-22R\alpha1$ -Zellen dar.

Wie erwartet, zeigte sich bei 2x-GFP durch die Homodimerisierung von gp130 sowohl eine Zellproliferation als auch ein pSTAT3 Signal im Western Blot, was als Positivkontrolle diente, da dies bereits durch Engelowski *et al.* beschrieben wurde (s. Abb. 18) (28). Bei Stimulation mit GFP-mCherry wurde ebenso Proliferation gemessen und ein pSTAT3-Signal detektiert, was auf die biologische Aktivität des synthetischen Komplexes aus $G_{VHH}gp130$ und $C_{VHH}IL-22R\alpha1$ hinweist. Die halbmaximale effektorische Konzentration von GFP-mCherry im konzentrationsabhängigen Proliferationsassay war bei 0,04 ng/ml erreicht. Die Gabe von 2x-mCherry löste auch hier keine pSTAT3-Signalgebung oder Proliferation über IL-22R α 1-Homodimere aus, wie bereits in den Zelllinien zuvor (s. Abb. 14) gezeigt wurde. Als weitere Negativ- und Positivkontrolle wurden die Zellen ohne Zytokingabe und mit HIL-6 stimuliert.

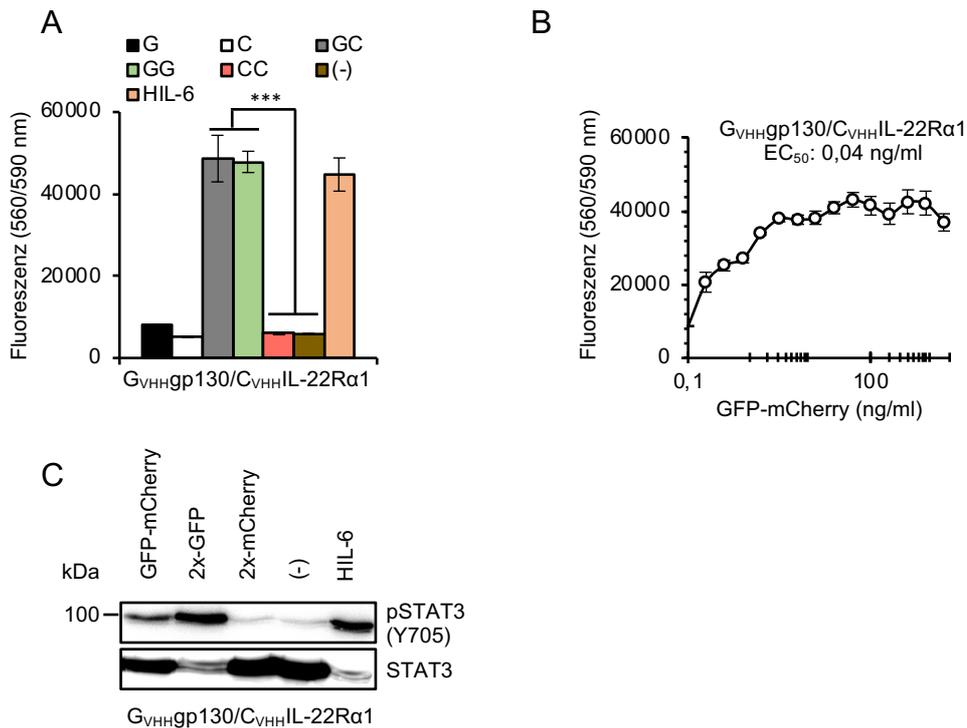


Abbildung 18: Der synthetische gp130/IL-22Rα1-Komplex zeigt biologische Aktivität und führt zu Zellproliferation und Aktivierung von STAT3 in Ba/F3-gp130-Zellen.

A: G_{VHH}gp130/C_{VHH}IL-22Rα1 Zellen wurden mit 100 ng/ml Fluoreszenzproteinen oder HIL-6 als Positivkontrolle stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation bei 560 nm, Emission bei 590 nm) diene als Parameter für die Proliferation. Es ist ein repräsentatives Experiment von n=3 gezeigt (* p≤ 0,05, ** p≤ 0,01, *** p≤ 0,001).

B: G_{VHH}gp130/C_{VHH}IL-22Rα1-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an GFP-mCherry stimuliert. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation bei 560 nm, Emission bei 590 nm) diene als Parameter für die Proliferation. Es ist ein repräsentatives Experiment von n=3 gezeigt.

C: G_{VHH}gp130/C_{VHH}IL-22Rα1-Zellen wurden mit 100 ng/ml Fluoreszenzproteinen für 1 h stimuliert. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert. Anschließend wurden 50 µg (25 µg für die Kontrolle mit HIL-6) Gesamtprotein auf SDS-PAA-Gele geladen und pSTAT3 sowie STAT3 im Western Blot detektiert. Es ist ein repräsentatives Experiment von n=3 gezeigt.

6.3 Der synthetische IL-27R führt zu Proliferation in Ba/F3-gp130-Zellen

IL-27 ist ein Vertreter der IL-12-Familie und vermittelt seine Signalgebung über den heterodimeren Rezeptor aus gp130 und WSX-1 (s. Abb. 3). Aus dieser Familie wurde bereits in der AG Scheller gezeigt, dass der IL-23-SyCyR aktiv ist (28). Ziel dieser Arbeit war ebenso, weitere SyCyRs für die IL-12-Familie zu entwickeln und deren Aktivität nachzuweisen. Hierzu wurden G_{VHH}gp130-Zellen mit der im Rahmen der Arbeit klonierten cDNA für C_{VHH}WSX-1 transduziert (s. Abb. 19).

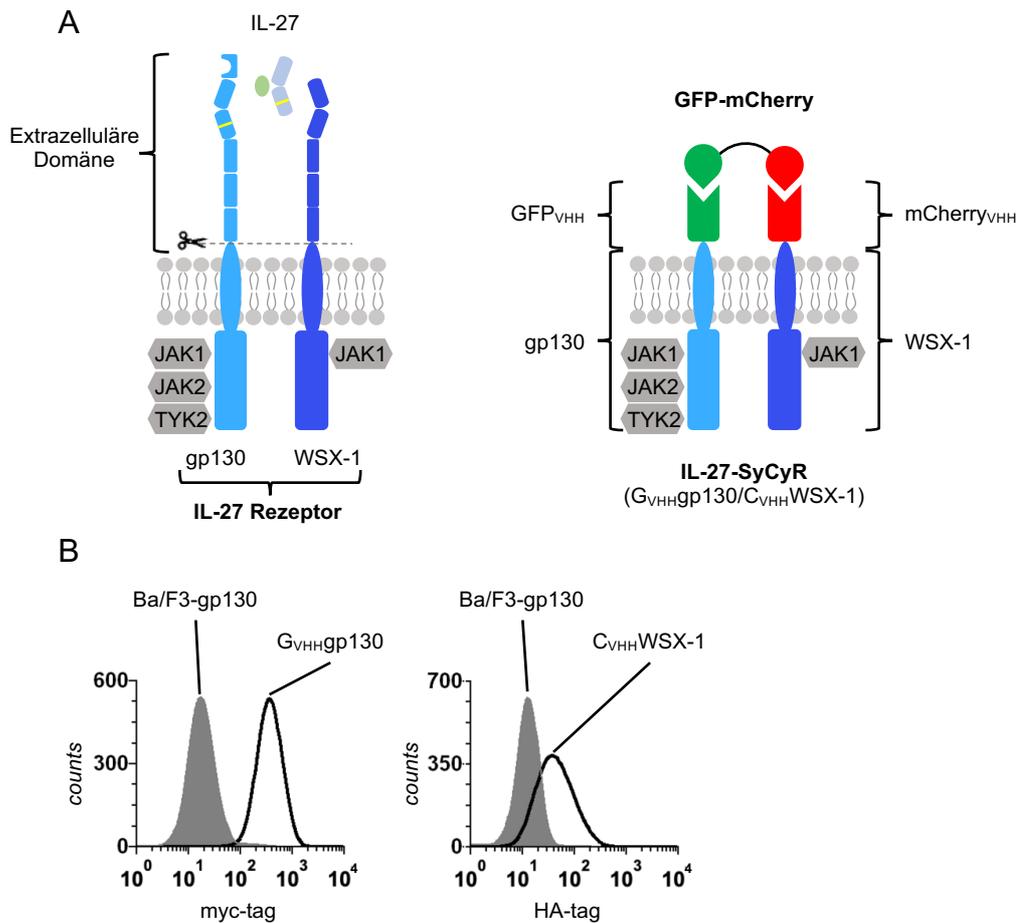


Abbildung 19: Konstruktion und Oberflächenexpression des IL-27-SyCyRs.

A: Schematische Darstellung des IL-27-SyCyRs. Die extrazellulären Domänen von WSX-1 und gp130 wurden durch *nanobodies* gegen GFP und mCherry (G_{VHH}/C_{VHH}) ersetzt. Der heterodimere Ligand GFP-mCherry führt zu einer räumlichen Annäherung beider Rezeptoren.

B: Durchflusszytometrie der Zellen mit Anti-myc- und Anti-HA-Antikörpern und sekundärem Fluoreszenzantikörper. Der Anti-myc-Antikörper bindet an den G_{VHH}, der Anti-HA-Antikörper an den C_{VHH}. Das grau gefüllte Histogramm stellt die Ergebnisse mit untransduzierten Ba/F3-gp130-Zellen als Negativkontrolle dar. Die durchgezogene Linie stellt die G_{VHH}gp130/C_{VHH}WSX-1 Zellen dar.

Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass GFP-mCherry zu einer Zellproliferation über die Bindung an den IL-27-SyCyR führt (s. Abb. 20). Als Kontrollen dienten Zellen, die nur jeweils einen der beiden Rezeptoren (GFP_{VHH}gp130 oder mCherry_{VHH}WSX-1) exprimierten.

Zellen, die den GFP_{VHH}gp130 exprimierten, proliferierten nach Stimulation mittels 2x-GFP, was auf die Homodimerisierung von gp130 zurückzuführen ist und als IL-6-SyCyR durch Engelowski *et al.* beschrieben wurde (28). Eine Homodimerisierung des mCherry_{VHH}WSX-1 durch 2x-mCherry führte im Gegensatz hierzu nicht zu einer Zellproliferation. Als Positivkontrollen dienten HIL-6 und IL-27, welche beide zu

Proliferation führten. Ein konzentrationsabhängiger Proliferationsassay ergab für GFP-mCherry eine halbmaximale effektorische Konzentration von 68,37 ng/ml. Über die Aktivität des synthetischen IL-27-Rezeptors wurde demonstriert, dass SyCyRs für weitere Mitglieder der IL-12-Familie funktionell sind.

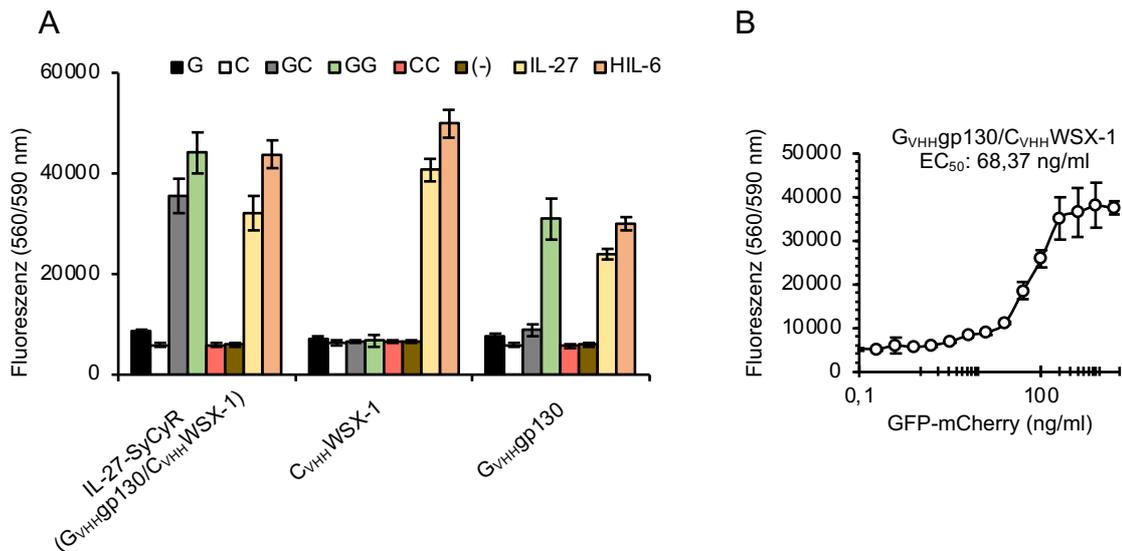


Abbildung 20: Der IL-27-SyCyR führt zu Zellproliferation.

A: Ba/F3-gp130-Zellen mit IL-27-SyCyR sowie Zellen mit jeweils nur einem synthetischen Rezeptor (G_{VHH}gp130 oder C_{VHH}WSX-1) wurden mit jeweils 100 ng/ml der Fluoreszenzproteine, IL-27 oder HIL-6 stimuliert. Als weitere Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation bei 560 nm, Emission bei 590 nm) diente als Parameter für die Proliferation. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei gleichzeitigen, verschiedenen Messungen. Es ist ein repräsentatives Experiment von n=3 gezeigt.

B: G_{VHH}gp130/C_{VHH}WSX-1-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an GFP-mCherry stimuliert. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation bei 560 nm, Emission bei 590 nm) diente als Parameter für die Proliferation. Es ist ein repräsentatives Experiment von n=3 gezeigt.

6.4 IL-39-SyCyR ist biologisch aktiv

Ein weiteres Mitglied der IL-12-Familie ist der IL-39R, welcher seine Signalgebung über heterodimere gp130/IL-23R-Komplexe vermittelt. Zur Phänokopierung des Rezeptors wurden die extrazellulären Domänen der beiden Rezeptoruntereinheiten durch *nanobodies* gegen mCherry oder GFP ausgetauscht und deren Expression im Western Blot untersucht (s. Abb. 21).

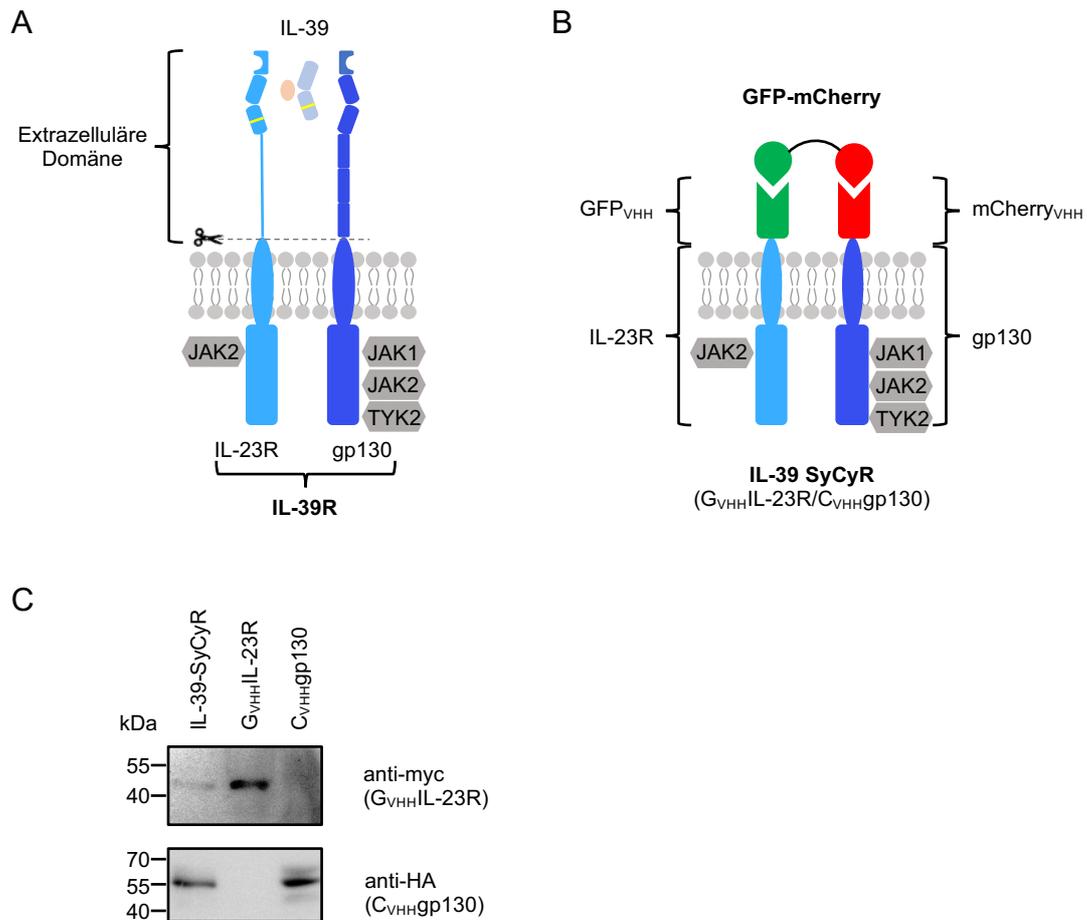


Abbildung 21: Konstruktion und Expression des IL-39-SyCyRs.

A: Schematische Darstellung des Wildtyp-IL-39R und des IL-39-SyCyRs, bei welchem die extrazellulären Domänen durch *nanobodies* gegen GFP und mCherry (G_{VHH}/C_{VHH}) ausgetauscht wurden.

B: Expressionsanalyse im Western Blot mit Anti-myc- und Anti-HA-Antikörpern. Der Anti-myc-Antikörper bindet an den G_{VHH}, der Anti-HA-Antikörper an den C_{VHH}. Es wurden 50 µg Gesamtprotein pro Bedingung auf das SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gel geladen.

Es wurden sowohl ein Proliferationsassay mit den monomeren und dimeren Fluoreszenzproteinen als auch ein Stimulationsassay durchgeführt (s. Abb. 22). Als Positivkontrolle diente HIL-6. Es konnte erfolgreich eine biologische Aktivität des IL-39-SyCyRs phänokopiert werden, was sich durch Zellproliferation nach Stimulation mit GFP-mCherry darstellte. Ebenso wurde erneut die Aktivität von homodimerem synthetischen IL-23R nachgewiesen, was bereits in der Vergangenheit beschrieben wurde. Dies äußerte sich zum einen in Zellproliferation nach Stimulation mit 2x-GFP als auch durch Aktivierung von STAT3 im Western Blot. Zudem zeigten IL-39-

SyCyR-Zellen Aktivität durch Homodimerisierung von synthetischem gp130, was als IL-6-SyCyR beschrieben wurde (28).

Floss *et al.* demonstrierten bereits die Aktivität von Rezeptorchimären des IL-39R (11). Dies konnte mittels SyCyRs untermauert werden, da typische Signalwege des IL-39R über Detektion von pSTAT3 und pERK nachgewiesen werden konnten. Die monomeren Fluoreszenzproteine sowie die unstimulierte Probe wurden als Negativkontrollen verwendet.

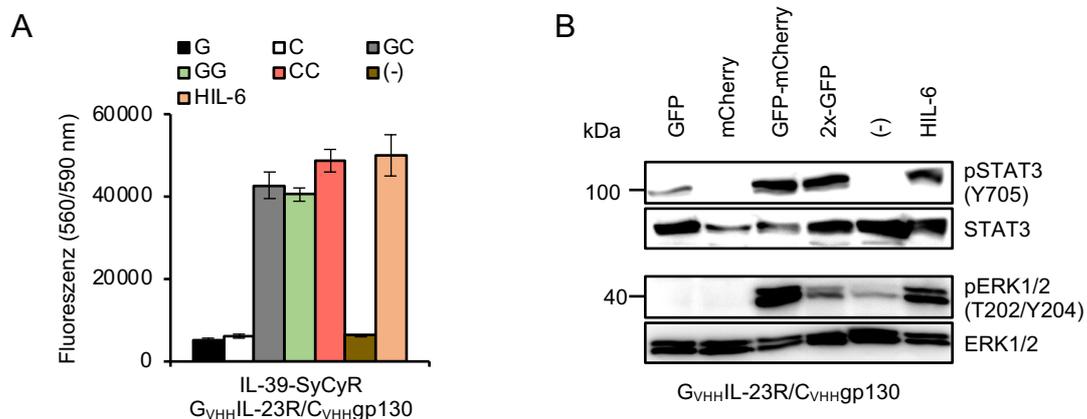


Abbildung 22: Der IL-39-SyCyR bildet funktionell aktive Heterodimere.

A: IL-39-SyCyR-Zellen wurden mit 100 ng/ml Fluoreszenzproteinen oder HIL-6 als Positivkontrolle stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation bei 560 nm, Emission bei 590 nm) diente als Parameter für die Proliferation. Es ist ein repräsentatives Experiment von n=2 gezeigt.

B: IL-39-SyCyR-Zellen wurden mit 100 ng/ml Fluoreszenzproteinen für 1 h stimuliert. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert. Es wurden 50 µg (25 µg für die Kontrolle mit HIL-6) auf SDS-PAA-Gele geladen und pSTAT3, STAT3, pERK1/2, ERK1/2 im Western Blot detektiert. Es ist ein repräsentatives Experiment von n=2 gezeigt.

6.5 EGF-SyCyR führt zu Signalgebung im Western Blot, nicht aber zu Proliferation in Ba/F3-gp130-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich das SyCyR-System breit auf verschiedene Mitglieder der IL-10-, der IL-6- und IL-12-Familie anwenden lässt. Zudem wurde die Aktivität bisher noch nicht identifizierter Rezeptorzusammensetzungen von gp130 mit IL-10R2 und IL-22Rα1 nachgewiesen. Zoellner *et al.* zeigten zudem, dass SyCyRs auch die Signalgebung von IFN phänokopieren können (132). Die bisher verwendeten Rezeptoren zählen

alle zur Familie der Klasse I- und II-Zytokinrezeptoren. Ziel dieser Arbeit war darüber hinaus SyCyRs für weitere Rezeptorklassen zu etablieren.

Eine weitere wichtige Klasse von Oberflächenrezeptoren stellen die Rezeptor-Tyrosinkinasen dar. Sie besitzen eine intrinsische Kinaseaktivität ihrer intrazellulären Domäne. Als typischer und am längsten bekannter Vertreter gilt der EGFR. Dieser vermittelt seine intrazelluläre Signalgebung unter anderem über STAT-Moleküle, ERK1/2 und PI3K/AKT. Analog zur Konstruktion der übrigen SyCyRs wurde die extrazelluläre Domäne des EGFR durch einen spezifischen *nanobody* gegen ein Fluoreszenzprotein ausgetauscht. Dies geschah im vorliegenden Falle gegen mCherry. Nach Klonierung der retroviralen Plasmide wurden stabil transduzierte C_{VHH}EGFR-Zellen hergestellt. Die Oberflächenexpression wurde mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen (s. Abb. 23).

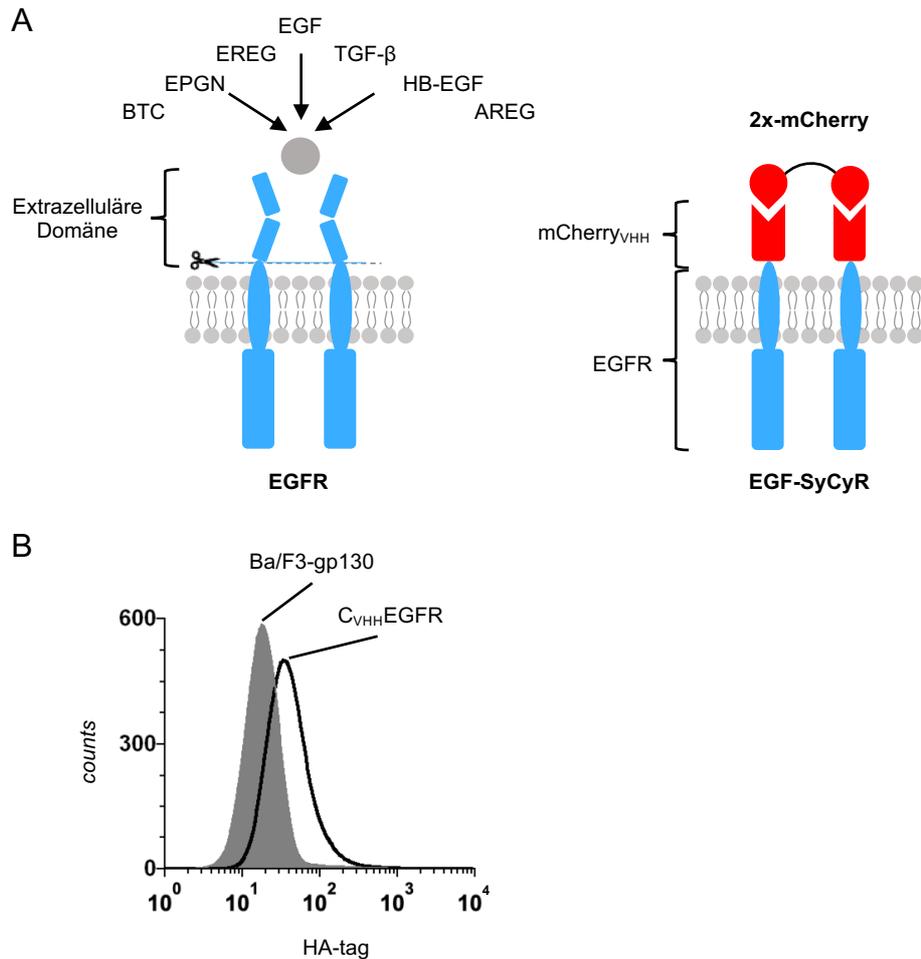


Abbildung 23: Erzeugung von synthetischen EGF-Rezeptoren und Expressionsanalyse mittels Durchflusszytometrie.

A: Schematische Darstellung des EGFR und seiner endogenen Liganden sowie des EGF-SyCyRs, bei welchem die extrazelluläre Domäne des EGFR durch einen *nanobody* gegen mCherry (C_{VHH}) ausgetauscht wurde.

B: Durchflusszytometrie der Zellen mit anti-HA-Antikörpern und sekundärem Fluoreszenzantikörper. Das grau gefüllte Histogramm stellt die Ergebnisse mit untransduzierten Ba/F3-gp130-Zellen als Negativkontrolle dar. Die durchgezogene Linie stellt die $C_{VHH}EGFR$ -Zellen dar.

Die $C_{VHH}EGFR$ -Zellen wurden im nächsten Schritt mit den Fluoreszenzproteinen stimuliert. Es erfolgte eine Negativkontrolle ohne Zytokinzugabe und eine Positivkontrolle mit HIL-6. Für keines der Fluoreszenzproteine wurde ein pSTAT3-Signal im Western Blot detektiert (s. Abb. 24A). Für 2x-mCherry allerdings wurden sowohl ein pSTAT5-, ein pERK- und pAKT-Signal im Western Blot dargestellt. Dies ist auf eine Homodimerisierung des $C_{VHH}EGFR$ in den Ba/F3-gp130-Zellen zurückzuführen. Der EGF-SyCyR zeigt somit eine biologische Aktivität. Da der EGFR vor allem proliferative Prozesse in Epithelien reguliert, wurde ein konzentrationsabhängiger Proliferationsassay mit 2x-mCherry für $C_{VHH}EGFR$ -

Zellen durchgeführt (s. Abb. 24B). Als Positivkontrolle wurden 100 ng/ml HIL-6 verwendet (nicht in Abb. gezeigt). Es zeigte sich auch unter hohen 2x-mCherry Konzentrationen keine Proliferation der Ba/F3-gp130-Zellen.

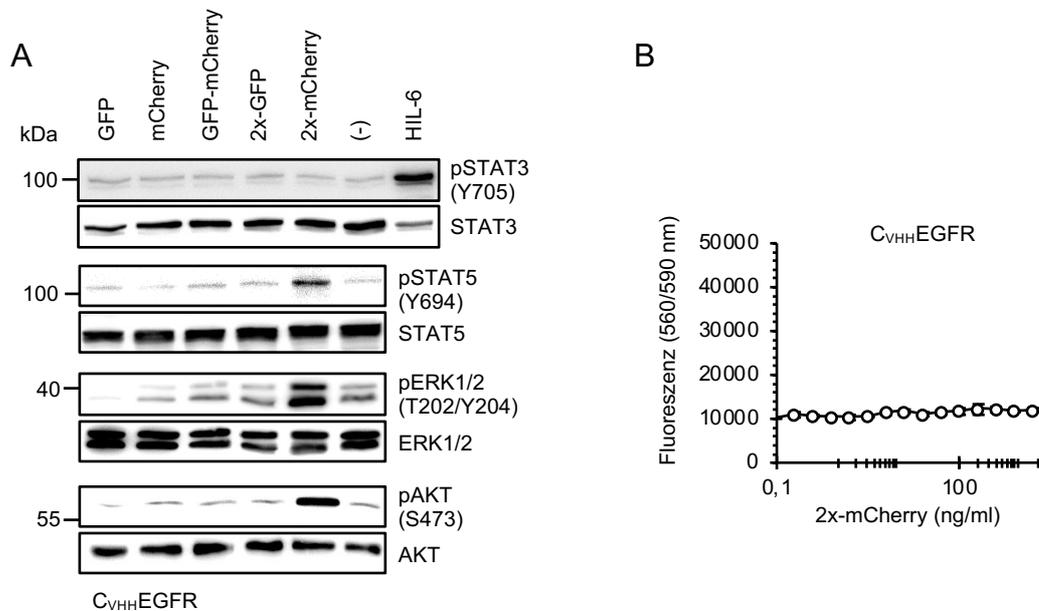


Abbildung 24: EGF-SyCyR-Zellen phänokopieren EGFR-typische Signalgebung.

A: EGF-SyCyR-Zellen wurden mit 100 ng/ml Fluoreszenzproteinen für 1 h stimuliert. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert. Anschließend wurden 50 µg (25 µg für die Kontrolle mit HIL-6) Gesamtprotein pro Bedingung auf SDS-PAA-Gele geladen und pSTAT3, STAT3, pSTAT5, STAT5, pERK1/2, ERK1/2 pAKT und AKT im Western Blot detektiert. Es ist ein repräsentatives Experiment von n=3 gezeigt (pAKT/AKT n=2).

B: EGF-SyCyR-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an 2x-mCherry stimuliert. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation bei 560 nm, Emission bei 590 nm) diente als Parameter für die Proliferation. Es ist ein repräsentatives Experiment von n=2 gezeigt.

6.6 EGFR/gp130-Heterodimere zeigen keine biologische Aktivität

Zahlreiche Zytokinrezeptoren sind in der Lage, mit verschiedenen weiteren Rezeptoren zu interagieren. Sogenannter *cross-talk* auf Rezeptorebene scheint auch zwischen Mitgliedern verschiedener Rezeptorklassen zu existieren. Wang *et al.* beschrieben eine Interaktion zwischen gp130 und dem EGFR. Es wurde gezeigt, dass von gp130 januskinaseabhängig ein Tyrosinrest an Stelle 1068 des intrazellulären Abschnitts des EGFR phosphoryliert wird. Dies sorgt für eine

prolongierte Phosphorylierung von STAT3, welche unabhängig vom Inhibitor SOCS3 ist (147).

Um diesen *cross-talk* zu simulieren, wurde ein SyCyR hergestellt, der sowohl $G_{VHH}EGFR$ als auch $C_{VHH}gp130$ enthält. Über Stimulation mit GFP-mCherry kann eine räumliche Annäherung dieser Rezeptoren bewirkt werden und geprüft werden, ob diese ausreichend zur Induktion einer Signalgebung ist. Beide Rezeptoren wurden auf der Oberfläche der transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen nachgewiesen (s. Abb. 25).

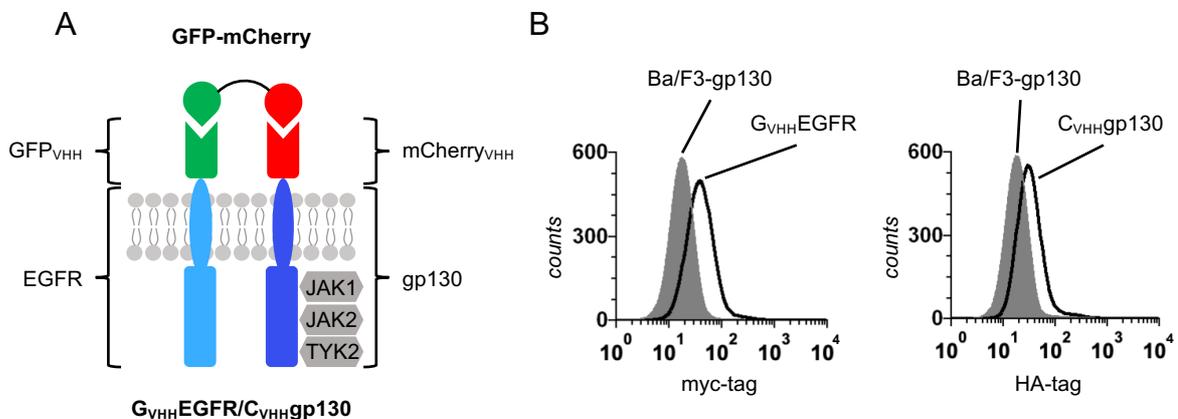


Abbildung 25: Erzeugung eines synthetischen EGFR/gp130-Komplexes.

A: Schematische Darstellung des heterodimeren Rezeptorkomplexes aus synthetischem gp130 und EGFR. Die extrazellulären Domänen von gp130 und EGFR wurden durch *nanobodies* gegen GFP und mCherry (G_{VHH}/C_{VHH}) ersetzt. Über das heterodimere GFP-mCherry kann so eine Rezeptorannäherung erfolgen.

B: Durchflusszytometrie der Zellen mit Anti-myc- und Anti-HA-Antikörpern und sekundärem Fluoreszenzantikörper. Der Anti-myc-Antikörper bindet an den G_{VHH} , der Anti-HA-Antikörper an den C_{VHH} . Das grau gefüllte Histogramm stellt die Ergebnisse mit untransduzierten Ba/F3-gp130-Zellen als Negativkontrolle dar. Die durchgezogene Linie stellt die $G_{VHH}EGFR/C_{VHH}gp130$ -Zellen dar.

Mittels Western Blot wurde untersucht, ob es durch Heterodimerisierung über GFP-mCherry zur Aktivierung von STAT3 kommt. Es zeigte sich, wie erwartet, ein Signal bei 2x-mCherry, da es eine Homodimerisierung von gp130 als synthetischen IL-6R imitiert. Monomere Fluoreszenzproteine führten, wie auch bei allen übrigen Zelllinien, zu keiner Signalgebung. Als Positivkontrolle diente HIL-6.

Für Heterodimere aus synthetischen gp130 und EGFR konnte keine Aktivierung von STAT3 nachgewiesen werden (s. Abb. 26A). Die gleichen Zellen wurden hinsichtlich der Aktivierung des PI3K-Weges analysiert. Hierzu wurde die Phosphorylierung der Kinase AKT detektiert. Da IL-6-Signalgebung auch zu einer Aktivierung dieses

Weges führt, wurden bei 2x-mCherry und HIL-6 eine Phosphorylierung nachgewiesen. Auch bei 2x-GFP zeigte sich durch Homodimerisierung des EGFR eine Aktivierung. Heterodimere Komplexe aus G_{VHH}EGFR/C_{VHH}gp130 scheinen auch hier zu keiner Signalgebung zu führen, da unter GFP-mCherry keine Phosphorylierung der AKT gezeigt werden konnte (s. Abb. 26A).

Wang *et al.* zeigten, dass die SOCS3 unabhängige Phosphorylierung von STAT3 verzögert auftritt. Aus diesem Grund wurde eine zeitabhängige Stimulation mit diesem SyCyR durchgeführt. Hierbei wurde mit 100 ng/ml GFP-mCherry stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben abgenommen. Als Positivkontrolle wurde HIL-6 verwendet, welches IL-6-Signalgebung auslöst und einer Regulation durch SOCS3 unterliegt. Zu keinem Zeitpunkt zeigte sich ein deutliches pSTAT3-Signal unter GFP-mCherry. Ein Anstieg der SOCS3-Expression konnte im Western Blot ebenfalls nicht detektiert werden. Die Positivkontrolle mit HIL-6 hingegen zeigte eine deutliche Phosphorylierung von STAT3 und einen konsekutiven SOCS3-Anstieg bei 60, 120 und 240 min. Die Intensität des pSTAT3-Signals nahm bei 240 min und 480 min deutlich ab (s. Abb. 26B). Somit konnte der berichtete *cross-talk* zwischen gp130 und EGFR mittels SyCyRs im Rahmen dieser Arbeit nicht reproduziert werden.

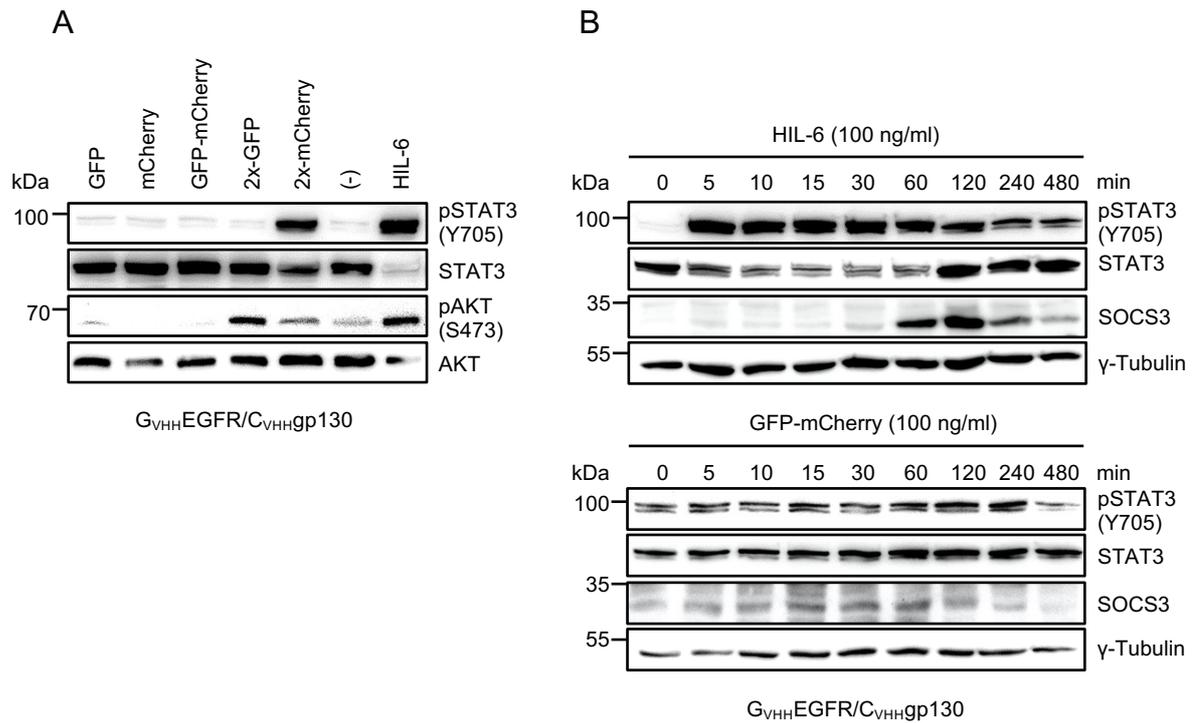


Abbildung 26: G_{VHH}EGFR/C_{VHH}gp130-Zellen zeigen bei Stimulation mit GFP-mCherry keine Signalgebung.

A: G_{VHH}EGFR/C_{VHH}gp130-Zellen wurden mit 100 ng/ml Fluoreszenzproteinen für 1 h stimuliert. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert. Anschließend wurden 50 µg (25 µg für die Kontrolle mit HIL-6) Gesamtprotein pro Bedingung auf SDS-Gele geladen und pSTAT3, STAT3, pAKT und AKT im Western Blot detektiert. Es ist ein repräsentatives Experiment von n=2 gezeigt.

B: G_{VHH}EGFR/C_{VHH}gp130-Zellen wurden jeweils mit 100 ng/ml GFP-mCherry oder HIL-6 als Positivkontrolle stimuliert. Zeitpunkt 0 wurde nicht stimuliert. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen und die pSTAT3- und SOCS3-Signalgebung im Western Blot detektiert. Als Ladekontrolle für SOCS3 wurde γ-Tubulin verwendet. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert. Es ist ein repräsentatives Experiment von n=2 gezeigt.

7 Diskussion

7.1 Die biologische Aktivität von SyCyRs

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass SyCyRs in der Lage sind, die Signalgebung verschiedenster physiologischer und nicht-physiologischer Rezeptorkomplexe zu induzieren. Das von Engelowski *et al.* entwickelte System stellte die Grundlage zur Rezeptorkonstruktion dar (28). Hierbei wurden die extrazellulären Domänen der jeweiligen Rezeptoren deletiert und durch die variablen Teile der schwere-Ketten-Antikörper (VHH), sogenannte *nanobodies*, gegen GFP und mCherry ausgetauscht. Über dimere Fusionsproteine aus GFP und mCherry, die als synthetische Liganden dienen, konnten so stöchiometrisch definierte Rezeptorkomplexe gebildet werden.

Physiologischerweise führen Zytokine zu einer Aktivierung von Oberflächenrezeptoren, im Falle der Interleukine und Wachstumsfaktoren geschieht dies meist über eine Dimerisierung. Über die Phosphorylierung und Aktivierung von Kinasen können anschließend Signalwege wie der Jak/STAT-, PI3K/Akt-, MAPK-Weg und weitere aktiviert werden (9). In der Erforschung der Zytokine und Rezeptoren zeigt sich jedoch, dass Zytokine und Rezeptoren mehrere Liganden besitzen können. Eine spezifische Erforschung einzelner Zytokin-Rezeptorkomplexe wird so deutlich erschwert (7, 12, 148). Das hier verwendete System umgeht dieses Problem durch eine hohe Spezifität der Liganden für deren synthetische Rezeptoren. Die Liganden GFP und mCherry sind nicht-toxisch und bieten somit auch die Möglichkeit einer *in vivo*-Anwendung, welche bereits erfolgreich in murinen Modellen gezeigt werden konnte (28, 37).

Neben verschiedenen Interleukinen konnte eine Aktivität der SyCyRs auch erstmals für Tyrosinkinase-Rezeptoren gezeigt werden.

7.1.1 Dimerisierung als kritischer Schritt der Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren

Über die Bindung der dimeren Fluoreszenzproteine wird eine räumliche Annäherung der synthetischen Rezeptoren erreicht. Dies erfolgt über verschiedene

Homo- und Heterodimere (2x-GFP, GFP-mCherry, 2x-mCherry), welche über einen flexiblen Aminosäurelinker verbunden sind. Sie induzieren eine Annäherung definierter synthetischer Rezeptoren. Die räumliche Nähe der intrazellulären Domänen bewirkt eine Aktivierung verschiedener Signalwege. Dies wurde über den Nachweis von aktivierten STAT-Proteinen und über Zellviabilitätsassays in den jeweiligen Zelllinien ermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden aktive SyCyRs für IL-22R-, IL-27R-, IL-6R- und IL-39R-vermittelte Signalgebung gezeigt. Die in der Vergangenheit beschriebene Aktivität der SyCyRs für die IL-12- und IL-6-Familie konnte erneut bestätigt und um eine breite Palette von Rezeptoren erweitert werden. Die Aktivität des IL-22-SyCyRs zeigte ebenso eine Aktivität für die IL-10-Familie auf, womit SyCyRs auf Klasse II-Zytokinrezeptoren anderer Familien anwendbar sind. Zoellner *et al.* konnten dies in weitergehenden Experimenten ebenso auf IFNR übertragen (132).

Ferner wurden aktive Rezeptorkomplexe gebildet, für die es bisher keinen biologisch aktiven, endogenen Liganden gibt. Hierzu gehörten homodimere SyCyRs des IL-10R2 und synthetische Komplexe aus IL-10R2/gp130 und IL-22R α 1/gp130. Dies untermauert die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, dass Jak-assoziierte Rezeptoren in der Lage sind, Signalgebung über verschiedenste Komplexe zu vermitteln (17). Die Familienzugehörigkeit scheint hierbei eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die Rezeptoren der IL-6-, IL-12- und IL-10-Familie zeigen untereinander eine hohe Austauschbarkeit, ohne deren Aktivität zu beeinflussen. Ihre Funktion ist demnach vor allem durch die entsprechenden intrazellulären Signalwege bestimmt, welche wiederum vom Repertoire der assoziierten Jaks und Bindemotive der Rezeptoren bestimmt werden. Letztlich ist die räumliche Annäherung der Rezeptoren von zentraler Bedeutung für deren Aktivierung.

7.1.2 IL-22R-vermittelte Signalgebung konnte erfolgreich phänokopiert werden

IL-22 vermittelt seine Signalgebung über den heterodimeren Rezeptor aus IL-22R α 1 und IL-10R2 (112, 113). Ba/F3-gp130-Zellen mit Wildtyp-IL-22R wurden mittels IL-22Fc erfolgreich als Positivkontrolle stimuliert. In einer weiteren Zelllinie

wurde dann der IL-22-SyCyR eingebracht. Beide Rezeptoren zeigten eine biologische Aktivität bei ähnlichen Konzentrationen und eine Signalgebung in Form der aktivierten STAT3-Proteine. Ebenso zeigte die zeitliche Abfolge der STAT3- und SOCS3-Aktivierung eine hohe Übereinstimmung zwischen Wildtyp und synthetischem Rezeptor. Zu erwähnen bleibt jedoch, dass eine relevante Suppression der Aktivierung von STAT3 durch SOCS3 im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden konnte (s. Abb. 11). Möglicherweise bedarf es einer Dosisreduktion der verwendeten Zytokine, um diese zu erfassen. In weiterführenden Experimenten der AG Scheller wurde ebenfalls eine hohe Übereinstimmung des Transkriptoms beider Rezeptoren nachgewiesen (145). SyCyRs sind demnach in der Lage die natürliche Signalgebung des IL-22R spezifisch zu phänokopieren.

7.1.3 IL-10R2-Homodimere zeigen trotz fehlender klassischer Signalmotive eine biologische Aktivität

Der IL-22R α 1 ist vor allem mit Jak1 assoziiert, der IL-10R2 mit Tyk2 (115, 149). IL-22 bindet zunächst an den IL-22R α 1, wodurch die Affinität zur Rekrutierung des IL-10R2 erhöht wird (101, 102). Die intrazelluläre Domäne des murinen IL-22R α 1 weist 346 Aminosäuren auf und besitzt verschiedene Bindemotive für Signalmoleküle wie STATs und ERKs (115). Im Gegensatz dazu besteht die intrazelluläre Domäne des IL-10R2 aus nur 76 Aminosäuren. Bisher konnten hier keine klassischen Bindemotive für Jak1 und Jak2 gefunden werden (150). Unerwarteterweise zeigten homodimere Komplexe aus synthetischen IL-22R α 1 trotz zahlreicher intrazellulärer Bindemotive für STATs und Kinasen keine biologische Aktivität. Die räumliche Annäherung erscheint im Gegensatz zu den übrigen SyCyRs nicht suffizient zur Aktivierung. Möglicherweise bedarf es eines kürzeren Aminosäurelinkers zwischen den synthetischen Zytokinen, um den räumlichen Abstand zu verkürzen. Auf der anderen Seite könnte ein längerer Linker auch mehr Flexibilität gewährleisten und beispielsweise eine Rotation der Rezeptoren ermöglichen, um zu einer Aktivierung zu führen. Ebenso kann es sein, dass die kurze Aminosäuresequenz zwischen der transmembranären Domäne und dem extrazellulären *nanobody* für die Aktivierung von Relevanz ist. Hummel *et al.*

zeigten, dass diese Domäne beispielsweise im Falle des IL-23R bedeutsam für dessen Aktivierung ist (151). Letztlich bleibt eine Aktivierung von homodimeren IL-22R α 1-Komplexen durch das vorliegende System aus, sodass entweder eine andere räumliche Anordnung zueinander notwendig ist oder bisher unbekannte Faktoren eine Rolle spielen.

Der kurze synthetische IL-10R2 hingegen zeigte bei Homodimerisierung eine Phosphorylierung von STAT-Molekülen und eine Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen. Bisher wurde oftmals postuliert, dass kurze Rezeptoren wie der IL-10R2 eine Rekrutierung und Aktivierung der Jak3 oder Tyk2 vermitteln und eher zu einem geringen Teil zur Signalgebung beitragen (148, 152). Dass IL-10R2-Homodimere aktiv sein könnten, schlugen bereits Kotenko *et al.* vor (149). Dies wurde nun erstmals mittels der synthetischen Rezeptorbiologie im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen.

In weiterführenden Experimenten in der AG Scheller wurde gezeigt, dass der IL-10R2 entgegen der Erwartung ebenso eine Phosphorylierung der Jak1 und Jak2 bewirkt. Dies erscheint ungewöhnlich, da klassische Bindemotive für Jaks wie Box1- und Box2-Bindemotive am IL-10R2 nicht vorhanden sind. Erstmals konnte eine nicht-kanonische Aktivierung von Jak-assoziierten Signalwegen des IL-10R2 aufgedeckt werden. Deletionsvarianten grenzten zudem einen Bereich für die Bindung der Jaks ein. Die aktivierten Signalwege des IL-10R2-Homodimers sind dem des heterodimeren Komplexes aus IL-22R α 1/IL-10R2 ähnlich (145).

Kurzkettige Rezeptoren wie der IL-10R2 zeigen eine durchaus hohe Relevanz für die Signalgebung, obwohl ihre Rolle bisher als sekundär erachtet wurde. SyCyRs können helfen, die einzelnen Beiträge der Rezeptoruntereinheiten genauer aufzuschlüsseln. Sie ermöglichen eine einfache Analyse von Bindemotiven für Signalmoleküle. Angesichts der ubiquitären Expression des IL-10R2 ist es relevant, dessen Mechanismen der Signaltransduktion besser zu verstehen. Synthetische Rezeptoren können helfen, seine Rolle in physiologischen und pathologischen Zusammenhängen aufzuschlüsseln.

7.1.4 Synthetische Rezeptorkomplexe des IL-6R, IL-23R, IL-27R und IL-39R zeigen Aktivität und belegen die breite Anwendbarkeit des SyCyR-Systems

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit umfasste, die breite Anwendbarkeit für weitere Mitglieder der IL-6- und IL-12-Familie zu belegen. Bisher zeigten Engelowski *et al.*, dass SyCyRs sowohl IL-6- wie auch IL-23-Signalgebung phänokopieren (28).

In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse von Engelowski *et al.* für IL-6-Signalgebung sowohl durch homodimere GFP_{VHH}-gp130- als auch mCherry_{VHH}-gp130-Komplexe bestätigt. Ein weiterer Rezeptor, an dem gp130 beteiligt ist, stellt der IL-27R dar. Er besteht aus den Oberflächenrezeptoren gp130 und WSX-1 (48). Physiologisch erfolgt die Phosphorylierung der Kinasen Jak1, 2 und Tyk2 und anschließend von STAT1, 3, 4 und 5 (55, 57). Der IL-27-SyCyR zeigte zwar eine biologische Aktivität in Ba/F3-gp130-Zellen und führte zu einer deutlichen Proliferation der Zellen. Dennoch konnte eine postulierte Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 in Ba/F3-gp130-Zellen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise scheint die Proliferation in Ba/F3-gp130-Zellen durch IL-27 von anderen Signalwegen abhängig zu sein als denen, die in der vorliegenden Arbeit analysiert worden sind. Hierfür wäre eine Detektion weiterer STAT-Moleküle oder der assoziierten Jaks notwendig. Eine Microarray-Analyse des Transkriptoms könnte zusätzlich dazu beitragen, weitere aktivierte Signalwege zu identifizieren und zu untersuchen.

Ein weiteres Mitglied der IL-12-Familie ist IL-39. Der synthetische Rezeptor aus gp130 und IL-23R (IL-39-SyCyR) zeigte ebenso Aktivität über die Phosphorylierung von STAT3 und Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen. IL-39 ist ein heterodimeres Protein aus p19/EBI3 und scheint in die Pathophysiologie muriner Lupus erythematodes-Modelle involviert zu sein (16). Auf Grund des nicht verfügbaren, rekombinanten aktiven IL-39 fehlen valide Positivkontrollen mittels IL-39-Stimulation. Dennoch sind die aktivierten Signalwege des IL-39-SyCyRs im Einklang mit den von Floss *et al.* vorgestellten Ergebnissen (11). Sowohl die physiologische als auch die pathophysiologische Funktion von IL-39 bleibt offen, da bisher kein natürlich vorkommendes humanes aktives IL-39 gereinigt werden konnte (153). Es bleibt fraglich, ob IL-39 im menschlichen Organismus eine

relevante Rolle spielt. Das SyCyR-System umgeht diese Problematik, indem synthetische Liganden verwendet werden können und sowohl eine *in vitro*- als auch *in vivo*-Erforschung zulassen.

7.1.5 SyCyRs weisen *cross-talk* zwischen Rezeptoren der IL-6- und IL-10-Familie nach

SyCyRs ermöglichen durch ihr kombinatorisches Potential sowohl die Erforschung von physiologischen wie auch rein synthetischen Rezeptorkomplexen. Hierzu gehören Komplexe aus gp130 als Mitglied der IL-6-Familie und dem IL-10R2 sowie dem IL-22R α 1 als Mitglieder der IL-10-Familie. Für beide Rezeptorkomplexe gibt es keine physiologisch bekannten Liganden. Durch den synthetischen Liganden GFP-mCherry konnte eine räumliche Annäherung der oben genannten Rezeptoren induziert werden. Es zeigte sich, dass gp130 sowohl mit dem IL-10R2 als auch mit dem IL-22R α 1 im Komplex zu einem pSTAT3-Signal führt und Proliferation in Ba/F3-gp130-Zellen auslöst. Dies zeigt, dass Zytokinrezeptoren unabhängig ihrer Familienzugehörigkeit umfangreich zu *cross-talk* auf Rezeptorebene befähigt sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen damit in Einklang mit Moraga *et al.* Die dort verwendeten *Syntheticines* bewirkten ebenso eine Assoziation verschiedenster Rezeptorkomplexe und wiesen eine biologische Aktivität nach (17).

7.1.6 SyCyRs von Rezeptor-Tyrosinkinasen zeigen anhand des EGFR Aktivität

Neben Jak-assoziierten Rezeptoren zeigen auch SyCyRs aus Rezeptor-Tyrosinkinasen Aktivität. Als klassischer Vertreter wurde der EGFR gewählt. Die extrazelluläre Domäne wurde wie beschrieben durch einen *nanobody* gegen GFP und mCherry ausgetauscht.

Im Rahmen der Arbeit wurde nachgewiesen, dass eine Homodimerisierung der EGF-SyCyRs zu einer Phosphorylierung von STAT5, ERK und AKT, nicht aber von STAT3 in Ba/F3-gp130-Zellen führte. Trotz der aktivierten Signalwege lösten synthetische EGFR keine Zellproliferation aus. EGFR sind involviert in Wachstum, Zelldifferenzierung und auch von großer Bedeutung in der Tumorigenese (154). Zahlreiche Tumoren weisen eine Überexpression oder konstitutiv aktive Varianten

auf (155). Der EGFR ist Zielstruktur zahlreicher Therapeutika, darunter Antikörper und Tyrosinkinaseinhibitoren (156). Warum eine Aktivierung des synthetischen EGFR keine Proliferation in Ba/F3-gp130-Zellen auslöst, kann vielfältige Ursachen haben. Dies mag durch die verwendeten Zellen bedingt sein, da diese als murine prä-B-Zelllinie in der Regel keinen EGFR exprimieren (157, 158). Möglicherweise reicht auch die Phosphorylierung von STAT5 nicht aus, um eine Zellproliferation zu bewirken. In den übrigen proliferierenden Zelllinien zeigten sich meist pSTAT3-Signale. Jiang *et al.* zeigten außerdem, dass für Ba/F3-Zellen EGF nur ein schwacher Proliferationsstimulus darstellt (159).

Außerdem erwies es sich als schwierig, sinnvolle Positivkontrollen zu finden. Der EGFR besitzt sieben Liganden, die nicht nur eine Homodimerisierung bewirken, sondern auch heterodimere Komplexe mit anderen Mitgliedern der EGFR-Familie auslösen (136). Zudem zeigt der EGFR *cross-talk* mit anderen Rezeptoren wie gp130, der ebenso zu ungewollten Hintergrundsignalen führen kann (147, 160). Es ist daher schwer, eine valide Positivkontrolle für den EGF-SyCyR zu finden. Bei der Aktivierung des Wildtyp-EGFR erfolgt eine Konformationsänderung, die intrazellulär eine asymmetrische Assoziation der Domänen induziert (161). Es erscheint zunächst unwahrscheinlich, dass der SyCyR diese komplexe Signaltransduktion abbilden kann, dennoch konnte eine biologische Aktivität nachgewiesen werden. Möglicherweise bewirkt eine Annäherung der intrazellulären Reste die Konformationsänderung oder der flexible Aminosäurelinker zwischen den Fluoreszenzproteinen ermöglicht es, die asymmetrische Konfiguration zu imitieren. Eine Verwendung von SyCyRs zur Erforschung der ErbB-Familie erscheint hilfreich, jedoch bedarf es vorerst weiterer Positivkontrollen, um einen *reality-check* des Signals zu gewährleisten. Insbesondere die Rolle von Wachstumsfaktoren in der Tumorigenese ist ein Argument für die Weiterentwicklung synthetischer Rezeptorsysteme. In der Folge könnten Resistenzmechanismen konstitutiv aktiver EGFR-Varianten gegenüber anti-EGFR-Therapien besser verstanden werden. Intrazelluläre Zielstrukturen und Bindemotive lassen sich mittels SyCyRs, wie für den IL-10R2 gezeigt, leicht identifizieren. Synthetische Rezeptoren bieten Potenzial, Lösungsansätze für klinische Problemstellungen sowie neue Therapien zu entwickeln.

7.2 Synthetische Rezeptoren - personalisierte Immuntherapie

Das SyCyR-System beweist in der Erforschung intrazellulärer Signaltransduktionsmechanismen neue Möglichkeiten. Seine einfache Anwendbarkeit durch den Austausch der extrazellulären Domänen und stöchiometrisch klar definierbare Rezeptorkomplexe erlauben eine praktisch hintergrundfreie Untersuchung und Aktivierung von Zytokinrezeptoren. Neben der *in vitro*-Anwendung zeigt sich auch eine Aktivität *in vivo*, wie Engelowski *et al.* bereits nachweisen konnten (28).

Eine Limitierung des Systems ist, dass Konformationsänderungen von Rezeptoren nicht abgebildet werden können. Darüber hinaus sind die Liganden GFP und mCherry zwar nicht-toxisch, aber als Proteine durchaus immunogen und können *in vivo* somit potenziell eine Sensibilisierung hervorrufen. Zudem sind sie nicht für die Anwendung im Menschen zugelassen, was ihren bisherigen Einsatz auf Tiermodelle beschränkt. Dieses Problem scheint vorerst fortzubestehen, da eine Immunogenität Voraussetzung ist für die Bildung eines *nanobody* als Teil eines antigenspezifischen schwere-Ketten-Antikörpers (VHH) (162).

Das Potenzial synthetischer Rezeptoren bleibt trotz dieser Problematik groß. Ein Beispiel für eine bereits zugelassene Therapie mit künstlichen Rezeptoren ist die CAR-T-Zell-Therapie. Der CAR besitzt, ähnlich dem SyCyR, ein extrazelluläres antigenbindendes Element. Dieses ist gegen Tumorantigene gerichtet und bewirkt eine spezifische zelluläre Immunantwort (20). Besondere Effektivität zeigte die CAR-T-Zell-Therapie Tisagenlecleucel, welches bei der akuten lymphatischen B-Zell-Leukämie und dem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom eingesetzt wird (22). Auch hier ist die Therapie jedoch deutlich limitiert. Bestimmte Patientenkollektive scheinen nur ein geringes Ansprechen auf die CAR-T-Zell-Therapie zu entwickeln, da die Zellen *in vivo* nicht proliferieren und persistieren. Dies kann mitunter auf PD-1-vermittelte Signalgebung und Inhibition der CAR-T-Zellen zurückgeführt werden. Ferner können schwerwiegende Nebenwirkungen durch ein *cytokine release syndrome* über vermehrte T-Zell-Aktivierung auftreten (163, 164).

Lösungsansätze können synthetische Rezeptoren oder Veränderung des CAR darstellen. Das SyCyR-System birgt die Möglichkeit, über stimulatorische Signale CAR-T-Zellen zu aktivieren und proliferieren zu lassen. Möglicherweise bieten Jak/STAT-vermittelte Signalwege das Potenzial, ein Ansprechen auch bei bisherigen Therapieversagern oder soliden Tumoren mit inhibitorischem Mikromilieu zu bewirken (165). Außerdem könnte das *cytokine release syndrome* bei massiver Aktivierung der CAR-T-Zellen durch inhibitorische SyCyRs gehemmt werden. Mossner *et al.* beschreiben zudem SyCyRs, welche über *Death*-Rezeptoren wie Fas/FasL auch den Zelltod induzieren können. Dies könnte bei überschießender Immunantwort als eine Art Notbremse funktionieren. Dabei bleiben SyCyRs nicht auf dimere Rezeptoren begrenzt. Denkbar sind auch homo- oder heterotrimere Rezeptoren wie die TNFR, für welche ebenso aktive SyCyRs beschrieben wurden (166). Dies ist theoretisch auch für oligomere Rezeptoren möglich. Limitierungen dieser Technologien stellen die aufwendige Herstellung von CAR-T-Zellen und der einhergehende Kostenfaktor dar. Außerdem besteht die Schwierigkeit, mehrere Rezeptoren in die gleiche Zellpopulation einzubringen und diese klonal zu expandieren, ohne dass Mutationen auftreten. Einen Überblick der möglichen SyCyRs zur Modulation der CAR-T-Zell-Therapie zeigt Abbildung 27.

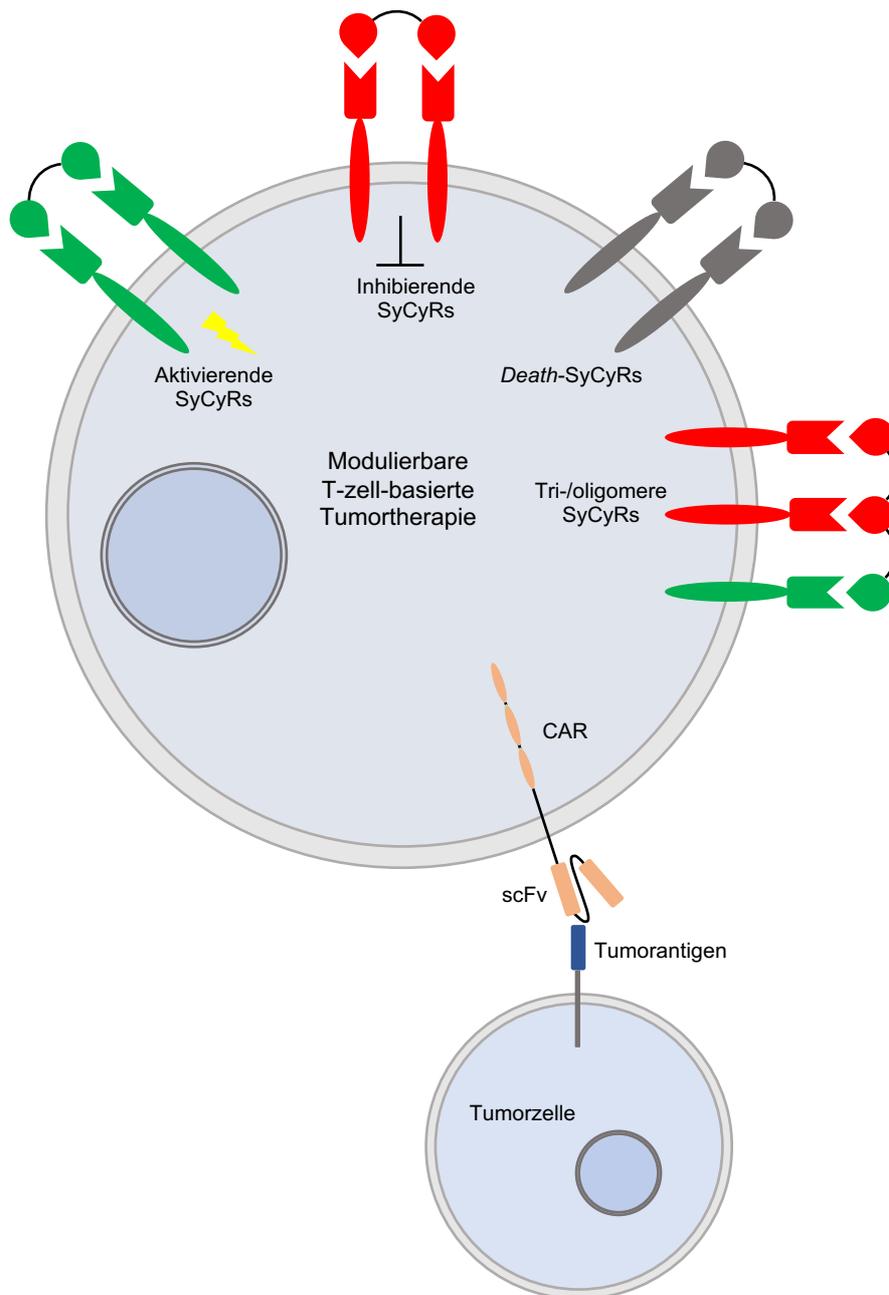


Abbildung 27: SyCyR-Technologie als modulierbares System zur Optimierung zellbasierter Therapien wie der CAR-T-Zell-Therapie.

CAR-T-Zellen binden über das scFv an Tumorantigene und lösen hierüber eine tumorspezifische Immunantwort aus. Limitierungen stellen einerseits überschießende Immunantworten oder nicht ausreichend persistierende oder proliferierende CAR-T-Zellen dar.

SyCyRs ermöglichen es in den gewünschten Zellen hochspezifisch eine Rezeptoraktivierung zu bewirken. Dabei hängt die Funktion des jeweiligen SyCyRs von deren intrazellulären Domäne ab. Somit könnten zum einen inhibitorische SyCyRs dazu dienen, überschießende Immunantworten der CAR-T-Zell-Therapie zu limitieren oder im Extremfall CAR-T-Zellen über *Death-SyCyRs* zur Apoptose zu zwingen. Zum anderen könnten bei nicht ausreichendem Ansprechen CAR-T-Zellen *in vivo* mittels SyCyRs stimuliert werden. Das Rezeptorrepertoire der SyCyRs kann durch tri- oder oligomere SyCyRs erweitert werden und somit beispielsweise auch auf TNFR ausgeweitet werden. SyCyRs stellen somit ein hochspezifisches, schaltbares System für die *in vitro*- und *in vivo*-Aktivierung von Oberflächenrezeptoren dar.

Insgesamt stellt die synthetische Rezeptorbiologie ein breites und innovatives Feld präklinischer und klinischer Forschung dar. Unter den neuartigen Tumorthérapien finden sich zunehmend synthetisch konstruierte Therapeutika, die sich eine räumliche Annäherung von T-Zellen und Tumorzellen zunutze machen. Hierunter fällt auch Tebentafusp, ein 2022 zugelassenes synthetisches Protein, welches an Tumorantigenen von Aderhautmelanomen bindet und T-Zellen über Bindung von CD3 rekrutiert und aktiviert (167). SyCyRs erweitern das Repertoire synthetischer Rezeptoren für die Prälinik, können aber schon jetzt interessante Ansatzpunkte für zukünftige klinische Therapien aufzeigen. Grundvoraussetzung hierfür ist die bereits von Engelowski *et al.* gezeigte *in vivo*-Anwendbarkeit (28).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zahlreiche synthetische Rezeptoren erfolgreich kloniert und deren Aktivität in Zellen nachgewiesen werden. Dabei ist ihre Anwendung nicht nur auf Interleukine der IL-6- und IL-12-Familie anwendbar, sondern breit über die Familiengrenzen hinweg auch für Rezeptor-Tyrosinkinasen möglich. Außerdem wurden neuartige, aktive Rezeptoren aus synthetischen gp130/IL-10R2 und gp130/IL-22R α 1 nachgewiesen. Dies untermauert die Möglichkeit eines breiten *cross-talk* auf Rezeptorebene.

Perspektivisch eröffnen die entwickelten SyCyRs neue Möglichkeiten der Erforschung von Rezeptorbiologie und der Optimierung zellulärer Therapien. Sie zeigen damit das Potential synthetischer Biologie für die Medizin auf.

8 Literaturverzeichnis

1. Morris R, Kershaw NJ, Babon JJ. The molecular details of cytokine signaling via the Jak/STAT pathway. *Protein Science*. 2018;27(12):1984-2009.
2. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*. 2012;925135.
3. Scheller J, Engelowski E, Moll JM, Floss DM. Immunoreceptor engineering and synthetic cytokine signaling for therapeutics. *Trends Immunol*. 2019;40(3):258-72.
4. Floss DM, Scheller J. Naturally occurring and synthetic constitutive-active cytokine receptors in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019;47:1-20.
5. Tait Wojno ED, Hunter CA, Stumhofer JS. The immunobiology of the Interleukin-12 family: room for discovery. *Immunity*. 2019;50(4):851-70.
6. Rose-John S, Scheller J, Schaper F. "Family reunion"-a structured view on the composition of the receptor complexes of interleukin-6-type and interleukin-12-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(5):471-4.
7. Broughton SE, Hercus TR, Lopez AF, Parker MW. Cytokine receptor activation at the cell surface. *Curr Opin Struct Biol*. 2012;22(3):350-9.
8. Oyler-Yaniv A, Krichevsky O. Imaging cytokine concentration fields using PlaneView imaging devices. *Bio Protoc*. 2018;8(7):e2788.
9. Stark GR, Darnell JE, Jr. The Jak-STAT pathway at twenty. *Immunity*. 2012;36(4):503-14.
10. Roskoski R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological Research*. 2014;79:34-74.
11. Floss DM, Schönberg M, Franke M, Horstmeier FC, Engelowski E, Schneider A, et al. IL-6/IL-12 cytokine receptor shuffling of extra- and intracellular domains reveals canonical STAT activation via synthetic IL-35 and IL-39 signaling. *Sci Rep*. 2017;7(1).
12. Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, Müller-Newen G, Grötzinger J, Rose-John S, et al. Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2012;23(3):85-97.
13. Tan X, Letendre JH, Collins JJ, Wong WW. Synthetic biology in the clinic: engineering vaccines, diagnostics, and therapeutics. *Cell*. 2021;184(4):881-98.
14. Hemmann U, Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Kurapkat G, Grötzinger J, et al. 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. *J Biol Chem*. 1996;271(22):12999-3007.
15. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450(7169):566-9.
16. Wang X, Wei Y, Xiao H, Liu X, Zhang Y, Han G, et al. A novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in Lupus-like mice. *Eur J Immunol*. 2016;46(6):1343-50.
17. Moraga I, Spangler JB, Mendoza JL, Gakovic M, Wehrman TS, Krutzik P, et al. Synthekines are surrogate cytokine and growth factor agonists that compel signaling through non-natural receptor dimers. *Elife*. 2017;6.
18. Lana MG, Strauss BE. Production of Lentivirus for the establishment of CAR-T cells. *Methods Mol Biol*. 2020;2086:61-7.
19. Zhang Z, Qiu S, Zhang X, Chen W. Optimized DNA electroporation for primary human T cell engineering. *BMC Biotechnol*. 2018;18(1):4.
20. Zhang C, Liu J, Zhong JF, Zhang X. Engineering CAR-T cells. *Biomark Res*. 2017;5:22.
21. Mirzaei HR, Jamali A, Jafarzadeh L, Masoumi E, Alishah K, Fallah Mehrjardi K, et al. Construction and functional characterization of a fully human anti-CD19 chimeric antigen receptor (huCAR)-expressing primary human T cells. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):9207-15.
22. Freyer CW. Tisagenlecleucel: The First CAR on the Highway to Remission for Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Adv Pract Oncol*. 2018;9(5):537-44.
23. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/kymriah-tisagenlecleucel>. (letzter Zugriff am 29.01.2023)

24. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(5):439-48.
25. Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*. 2011;365(18):1673-83.
26. Juillerat A, Tkach D, Busser BW, Temburni S, Valton J, Duclert A, et al. Modulation of chimeric antigen receptor surface expression by a small molecule switch. *BMC Biotechnol*. 2019;19(1):44.
27. Feins S, Kong W, Williams EF, Milone MC, Fraietta JA. An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. *Am J Hematol*. 2019;94(S1):3-9
28. Engelowski E, Schneider A, Franke M, Xu H, Clemen R, Lang A, et al. Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands. *Nat Commun*. 2018;9(1):2034.
29. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993;363(6428):446-8.
30. Greenberg AS, Avila D, Hughes M, Hughes A, McKinney EC, Flajnik MF. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*. 1995;374(6518):168-73.
31. Muyldermans S, Atarhouch T, Saldanha J, Barbosa JA, Hamers R. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng*. 1994;7(9):1129-35.
32. Rothbauer U, Zolghadr K, Muyldermans S, Schepers A, Cardoso MC, Leonhardt H. A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol Cell Proteomics*. 2008;7(2):282-9.
33. Fridy PC, Li Y, Keegan S, Thompson MK, Nudelman I, Scheid JF, et al. A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires. *Nat Methods*. 2014;11(12):1253-60.
34. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. 1962;59(3):223-39.
35. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 2004;22(12):1567-72.
36. Fink D, Wohrer S, Pfeffer M, Tombe T, Ong CJ, Sorensen PH. Ubiquitous expression of the monomeric red fluorescent protein mCherry in transgenic mice. *Genesis*. 2010;48(12):723-9.
37. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett*. 1997;407(3):313-9.
38. Hasegawa H, Mizoguchi I, Chiba Y, Ohashi M, Xu M, Yoshimoto T. Expanding diversity in molecular structures and functions of the IL-6/IL-12 heterodimeric cytokine family. *Front Immunol*. 2016;7:479.
39. Wang RX, Yu CR, Mahdi RM, Egwuagu CE. Novel IL27p28/IL12p40 cytokine suppressed experimental autoimmune uveitis by inhibiting autoreactive Th1/Th17 cells and promoting expansion of regulatory T cells. *J Biol Chem*. 2012;287(43):36012-21.
40. Flores RR, Kim E, Zhou L, Yang C, Zhao J, Gambotto A, et al. IL-Y, a synthetic member of the IL-12 cytokine family, suppresses the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Eur J Immunol*. 2015;45(11):3114-25.
41. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(18):6934-8.
42. Krueger JG, Ferris LK, Menter A, Wagner F, White A, Visvanathan S, et al. Anti-IL-23A mAb BI 655066 for treatment of moderate-to-severe psoriasis: Safety, efficacy, pharmacokinetics, and biomarker results of a single-rising-dose, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(1):116-24.e7.
43. Visvanathan S, Baum P, Salas A, Vinisko R, Schmid R, Grebe KM, et al. Selective IL-23 inhibition by risankizumab modulates the molecular profile in the colon and ileum of patients with active Crohn's disease: results from a randomised phase II biopsy sub-study. *J Crohns Colitis*. 2018;12(10):1170-9.
44. Leonardi CL, Kimball AB, Papp KA, Yeilding N, Guzzo C, Wang Y, et al. 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*. 2008;371(9625):1665-74.
45. Gordon KB, Strober B, Lebwohl M, Augustin M, Blauvelt A, Poulin Y, et al. Efficacy and safety of risankizumab in moderate-to-severe plaque psoriasis (UltIMMa-1 and UltIMMa-2): results from two double-blind, randomised, placebo-controlled and ustekinumab-controlled phase 3 trials. *Lancet*. 2018;392(10148):650-61.
 46. Ecoeur F, Weiss J, Schleegeer S, Guntermann C. Lack of evidence for expression and function of IL-39 in human immune cells. *PLoS One*. 2020;15(12):e0242329.
 47. Bridgewood C, Alase A, Watad A, Wittmann M, Cuthbert R, McGonagle D. The IL-23p19/EBI3 heterodimeric cytokine termed IL-39 remains a theoretical cytokine in man. *Inflamm Res*. 2019;68(6):423-6.
 48. Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, et al. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *The Journal of Immunology*. 2004;172(4):2225-31.
 49. Gearing DP, Cosman D. Homology of the p40 subunit of natural killer cell stimulatory factor (NKSF) with the extracellular domain of the interleukin-6 receptor. *Cell*. 1991;66(1):9-10.
 50. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells. *Immunity*. 2002;16(6):779-90.
 51. Devergne O, Hummel M, Koeppen H, Le Beau MM, Nathanson EC, Kieff E, et al. A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. *J Virol*. 1996;70(2):1143-53.
 52. Jin Y, Fyfe PK, Gardner S, Wilmes S, Bubeck D, Moraga I. Structural insights into the assembly and activation of the IL-27 signaling complex. *EMBO Rep*. 2022;23(10):e55450.
 53. Caveney NA, Glassman CR, Jude KM, Tsutsumi N, Garcia KC. Structure of the IL-27 quaternary receptor signaling complex. *Elife*. 2022;11.
 54. Składanowska K, Bloch Y, Strand J, White KF, Hua J, Aldridge D, et al. Structural basis of activation and antagonism of receptor signaling mediated by interleukin-27. *Cell Rep*. 2022;41(3):111490.
 55. Hibbert L, Pflanz S, De Waal Malefyt R, Kastelein RA. IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J Interferon Cytokine Res*. 2003;23(9):513-22.
 56. Hall AO, Beiting DP, Tato C, John B, Oldenhove G, Lombana CG, et al. The cytokines interleukin 27 and interferon-γ promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology. *Immunity*. 2012;37(3):511-23.
 57. Diegelmann J, Olszak T, Göke B, Blumberg RS, Brand S. A novel role for interleukin-27 (IL-27) as mediator of intestinal epithelial barrier protection mediated via differential signal transducer and activator of transcription (STAT) protein signaling and induction of antibacterial and anti-inflammatory proteins. *J Biol Chem*. 2012;287(1):286-98.
 58. Fabbi M, Carbotti G, Ferrini S. Dual roles of IL-27 in cancer biology and immunotherapy. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:3958069.
 59. Rose-John S, Waetzig GH, Scheller J, Grötzinger J, Seeger D. The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets*. 2007;11(5):613-24.
 60. Scheller J, Rose-John S. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol*. 2006;195(4):173-83.
 61. Hashimoto SI, Suzuki T, Nagai S, Yamashita T, Toyoda N, Matsushima K. Identification of genes specifically expressed in human activated and mature dendritic cells through serial analysis of gene expression. *Blood*. 2000;96(6):2206-14.
 62. Liu J, Guan X, Ma X. Regulation of IL-27 p28 gene expression in macrophages through MyD88- and interferon-gamma-mediated pathways. *J Exp Med*. 2007;204(1):141-52.
 63. Smits HH, van Beelen AJ, Hessle C, Westland R, de Jong E, Soeteman E, et al. Commensal Gram-negative bacteria prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced Th1 development. *Eur J Immunol*. 2004;34(5):1371-80.
 64. Chen Q, Ghilardi N, Wang H, Baker T, Xie MH, Gurney A, et al. Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature*. 2000;407(6806):916-20.

65. Yoshida H, Hamano S, Senaldi G, Covey T, Faggioni R, Mu S, et al. WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to *L. major* infection. *Immunity*. 2001;15(4):569-78.
66. Diveu C, McGeachy MJ, Boniface K, Stumhofer JS, Sathe M, Joyce-Shaikh B, et al. IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J Immunol*. 2009;182(9):5748-56.
67. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2000;85(1):9-18; quiz , 21.
68. Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol*. 2012;181(1):8-18.
69. Patel DD, Kuchroo VK. Th17 cell pathway in human immunity: lessons from genetics and therapeutic interventions. *Immunity*. 2015;43(6):1040-51.
70. Murugaiyan G, Mittal A, Lopez-Diego R, Maier LM, Anderson DE, Weiner HL. IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4+ T cells. *J Immunol*. 2009;183(4):2435-43.
71. Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, et al. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol*. 2007;8(12):1363-71.
72. Hanson ML, Hixon JA, Li W, Felber BK, Anver MR, Stewart CA, et al. Oral delivery of IL-27 recombinant bacteria attenuates immune colitis in mice. *Gastroenterology*. 2014;146(1):210-21.e13.
73. McAleer JP, Saris CJ, Vella AT. The WSX-1 pathway restrains intestinal T-cell immunity. *Int Immunol*. 2011;23(2):129-37.
74. Sasaoka T, Ito M, Yamashita J, Nakajima K, Tanaka I, Narita M, et al. Treatment with IL-27 attenuates experimental colitis through the suppression of the development of IL-17-producing T helper cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300(4):G568-76.
75. Troy AE, Zaph C, Du Y, Taylor BC, Guild KJ, Hunter CA, et al. IL-27 regulates homeostasis of the intestinal CD4+ effector T cell pool and limits intestinal inflammation in a murine model of colitis. *J Immunol*. 2009;183(3):2037-44.
76. Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, et al. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol*. 2006;7(9):929-36.
77. Fitzgerald DC, Zhang GX, El-Behi M, Fonseca-Kelly Z, Li H, Yu S, et al. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol*. 2007;8(12):1372-9.
78. Imielinski M, Baldassano RN, Griffiths A, Russell RK, Annese V, Dubinsky M, et al. Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. 2009;41(12):1335-40.
79. Shimizu M, Shimamura M, Owaki T, Asakawa M, Fujita K, Kudo M, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of IL-27. *J Immunol*. 2006;176(12):7317-24.
80. Ho MY, Leu SJ, Sun GH, Tao MH, Tang SJ, Sun KH. IL-27 directly restrains lung tumorigenicity by suppressing cyclooxygenase-2-mediated activities. *J Immunol*. 2009;183(10):6217-26.
81. Kachroo P, Lee MH, Zhang L, Baratelli F, Lee G, Srivastava MK, et al. IL-27 inhibits epithelial-mesenchymal transition and angiogenic factor production in a STAT1-dominant pathway in human non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2013;32(1):97.
82. Cao JY, Yin HS, Li HS, Yu XQ, Han X. Interleukin-27 augments the inhibitory effects of sorafenib on bladder cancer cells. *Braz J Med Biol Res*. 2017;50(8):e6207.
83. Wang T, Chen Y, Nie H, Huang Y, Zhao Y, Yang J. IL-27 inhibits non-small-cell lung cancer cell metastasis by miR-935 in vitro. *Onco Targets Ther*. 2019;12:1447-54.
84. Liu Z, Liu JQ, Talebian F, Wu LC, Li S, Bai XF. IL-27 enhances the survival of tumor antigen-specific CD8+ T cells and programs them into IL-10-producing, memory precursor-like effector cells. *Eur J Immunol*. 2013;43(2):468-79.
85. Salcedo R, Stauffer JK, Lincoln E, Back TC, Hixon JA, Hahn C, et al. IL-27 mediates complete regression of orthotopic primary and metastatic murine neuroblastoma tumors: role for CD8+ T cells. *J Immunol*. 2004;173(12):7170-82.

86. Ziblat A, Domaica CI, Spallanzani RG, Iraolagoitia XL, Rossi LE, Avila DE, et al. IL-27 stimulates human NK-cell effector functions and primes NK cells for IL-18 responsiveness. *Eur J Immunol.* 2015;45(1):192-202.
87. Wei J, Xia S, Sun H, Zhang S, Wang J, Zhao H, et al. Critical role of dendritic cell-derived IL-27 in antitumor immunity through regulating the recruitment and activation of NK and NKT cells. *J Immunol.* 2013;191(1):500-8.
88. Matsui M, Kishida T, Nakano H, Yoshimoto K, Shin-Ya M, Shimada T, et al. Interleukin-27 activates natural killer cells and suppresses NK-resistant head and neck squamous cell carcinoma through inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Res.* 2009;69(6):2523-30.
89. Hu P, Hu HD, Chen M, Peng ML, Tang L, Tang KF, et al. Expression of interleukins-23 and 27 leads to successful gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Mol Immunol.* 2009;46(8-9):1654-62.
90. Huber M, Steinwald V, Guralnik A, Brüstle A, Kleemann P, Rosenplänter C, et al. IL-27 inhibits the development of regulatory T cells via STAT3. *Int Immunol.* 2008;20(2):223-34.
91. Wojno ED, Hosken N, Stumhofer JS, O'Hara AC, Mauldin E, Fang Q, et al. A role for IL-27 in limiting T regulatory cell populations. *J Immunol.* 2011;187(1):266-73.
92. Carbotti G, Barisione G, Airolidi I, Mezzanzanica D, Bagnoli M, Ferrero S, et al. IL-27 induces the expression of IDO and PD-L1 in human cancer cells. *Oncotarget.* 2015;6(41):43267-80.
93. Gonin J, Carlotti A, Dietrich C, Audebourg A, Radenen-Bussi re B, Caignard A, et al. Expression of IL-27 by tumor cells in invasive cutaneous and metastatic melanomas [corrected]. *PLoS One.* 2013;8(10):e75694.
94. Chen S, Crabill GA, Pritchard TS, McMiller TL, Wei P, Pardoll DM, et al. Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):305.
95. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res.* 2020;10(3):727-42.
96. Wang X, Zhang Y, Wang Z, Liu X, Zhu G, Han G, et al. Anti-IL-39 (IL-23p19/Ebi3) polyclonal antibodies ameliorate autoimmune symptoms in lupus-like mice. *Mol Med Rep.* 2018;17(1):1660-6.
97. Wang X, Liu X, Zhang Y, Wang Z, Zhu G, Han G, et al. Interleukin (IL)-39 [IL-23p19/Epstein-Barr virus-induced 3 (Ebi3)] induces differentiation/expansion of neutrophils in lupus-prone mice. *Clin Exp Immunol.* 2016;186(2):144-56.
98. Ramnath D, Tunny K, Hohenhaus DM, Pitts CM, Bergot AS, Hogarth PM, et al. TLR3 drives IRF6-dependent IL-23p19 expression and p19/EBI3 heterodimer formation in keratinocytes. *Immunol Cell Biol.* 2015;93(9):771-9.
99. Bazan JF. Shared architecture of hormone binding domains in type I and II interferon receptors. *Cell.* 1990;61(5):753-4.
100. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:929-79.
101. Yoon SI, Logsdon NJ, Sheikh F, Donnelly RP, Walter MR. Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. *J Biol Chem.* 2006;281(46):35088-96.
102. Yoon SI, Jones BC, Logsdon NJ, Harris BD, Deshpande A, Radaeva S, et al. Structure and mechanism of receptor sharing by the IL-10R2 common chain. *Structure.* 2010;18(5):638-48.
103. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity.* 2004;21(2):241-54.
104. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:71-109.
105. Zdanov A, Schalk-Hihi C, Gustchina A, Tsang M, Weatherbee J, Wlodawer A. Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma. *Structure.* 1995;3(6):591-601.
106. Fickenscher H, Pirzer H. Interleukin-26. *Int Immunopharmacol.* 2004;4(5):609-13.
107. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):170-81.

108. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol.* 2011;12(5):383-90.
109. Niess JH, Hruz P, Kaymak T. The Interleukin-20 cytokines in intestinal diseases. *Front Immunol.* 2018;9:1373.
110. Kotenko SV. IFN-λs. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(5):583-90.
111. Ouyang W, O'Garra A. IL-10 family cytokines IL-10 and IL-22: from basic science to clinical translation. *Immunity.* 2019;50(4):871-91.
112. Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, Foster J, Zhang Z, Stinson J, et al. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem.* 2000;275(40):31335-9.
113. Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Esterova E, Dickensheets H, Donnelly RP, et al. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rβ) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *J Biol Chem.* 2001;276(4):2725-32.
114. Jones BC, Logsdon NJ, Walter MR. Structure of IL-22 bound to its high-affinity IL-22R1 chain. *Structure.* 2008;16(9):1333-44.
115. Lejeune D, Dumoutier L, Constantinescu S, Kruijer W, Schuringa JJ, Renauld JC. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *J Biol Chem.* 2002;277(37):33676-82.
116. Brand S, Beigel F, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, et al. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290(4):G827-38.
117. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Flavell RA. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity.* 2007;27(4):647-59.
118. Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Esterova E, Dickensheets H, Donnelly RP, et al. Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. *J Immunol.* 2001;166(12):7096-103.
119. Dumoutier L, Lejeune D, Colau D, Renauld JC. Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *J Immunol.* 2001;166(12):7090-5.
120. Brand S, Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, Heeg MH, Weiss TS, et al. IL-22-mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression in vitro. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2007;292(4):1019-28.
121. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from γδ T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity.* 2009;31(2):331-41.
122. Colonna M. Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity. *Immunity.* 2009;31(1):15-23.
123. Fujita H, Nograles KE, Kikuchi T, Gonzalez J, Carucci JA, Krueger JG. Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(51):21795-800.
124. Buonocore S, Ahern PP, Uhlig HH, Ivanov II, Littman DR, Maloy KJ, et al. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature.* 2010;464(7293):1371-5.
125. Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke WD, Kunz S, Asadullah K, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol.* 2006;36(5):1309-23.
126. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med.* 2006;203(10):2271-9.
127. Boniface K, Bernard F-X, Garcia M, Gurney AL, Lecron J-C, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *The Journal of Immunology.* 2005;174(6):3695.

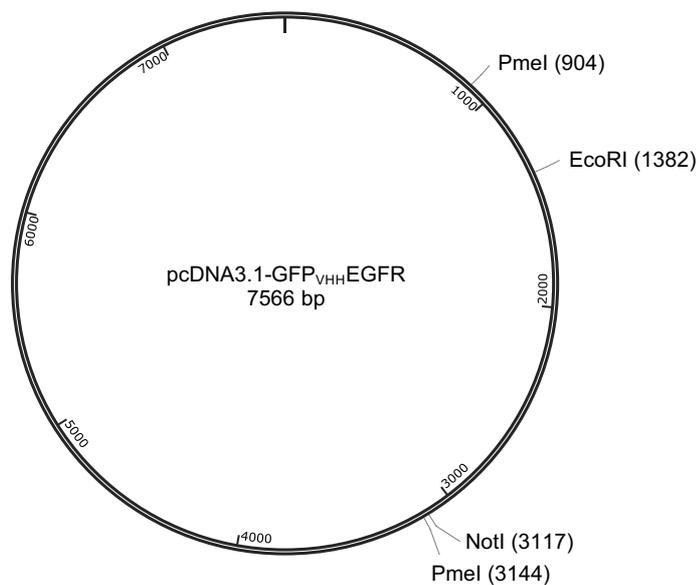
128. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med.* 2008;14(3):282-9.
129. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med.* 2008;14(3):275-81.
130. Kolumam G, Wu X, Lee WP, Hackney JA, Zavala-Solorio J, Gandham V, et al. IL-22R ligands IL-20, IL-22, and IL-24 promote wound healing in diabetic db/db mice. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170639.
131. Lim C, Savan R. The role of the IL-22/IL-22R1 axis in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25(3):257-71.
132. Zoellner N, Coesfeld N, De Vos FH, Denter J, Xu HC, Zimmer E, et al. Synthetic mimetics assigned a major role to IFNAR2 in type I interferon signaling. *Front Microbiol.* 2022;13:947169.
133. Burgess AW. EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth Factors.* 2008;26(5):263-74.
134. Gadella TW, Jr., Jovin TM. Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *J Cell Biol.* 1995;129(6):1543-58.
135. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2010;141(7):1117-34.
136. Freed DM, Bessman NJ, Kiyatkin A, Salazar-Cavazos E, Byrne PO, Moore JO, et al. EGFR ligands differentially stabilize receptor dimers to specify signaling kinetics. *Cell.* 2017;171(3):683-95.e18.
137. Wee P, Wang Z. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers (Basel).* 2017;9(5):52.
138. da Cunha Santos G, Shepherd FA, Tsao MS. EGFR mutations and lung cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:49-69.
139. Gearing DP, Ziegler SF, Comeau MR, Friend D, Thoma B, Cosman D, et al. Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(3):1119-23.
140. Suthaus J, Tillmann A, Lorenzen I, Bulanova E, Rose-John S, Scheller J. Forced homo- and heterodimerization of all gp130-type receptor complexes leads to constitutive ligand-independent signaling and cytokine-independent growth. *Mol Biol Cell.* 2010;21(15):2797-807.
141. Ketteler R, Glaser S, Sandra O, Martens UM, Klingmüller U. Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther.* 2002;9(8):477-87.
142. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
143. Jarvik JW, Telmer CA. Epitope tagging. *Annu Rev Genet.* 1998;32:601-18.
144. Sambrook J. *Molecular cloning : a laboratory manual: Third edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press N.Y.; 2001.
145. Mossner S, Kuchner M, Fazel Modares N, Knebel B, Al-Hasani H, Floss DM, et al. Synthetic interleukin 22 (IL-22) signaling reveals biological activity of homodimeric IL-10R2 and functional cross-talk with the IL-6 receptor gp130. *Journal of Biological Chemistry.* 2020.
146. Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff JP, Kallen KJ, Wollmer A, et al. I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol.* 1997;15(2):142-5.
147. Wang Y, van Boxel-Dezaire AH, Cheon H, Yang J, Stark GR. STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(42):16975-80.
148. Wang X, Lupardus P, Laporte SL, Garcia KC. Structural biology of shared cytokine receptors. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:29-60.
149. Kotenko SV, Izotova LS, Pollack BP, Muthukumaran G, Pauku K, Silvennoinen O, et al. Other kinases can substitute for Jak2 in signal transduction by interferon-gamma. *J Biol Chem.* 1996;271(29):17174-82.

150. Usacheva A, Sandoval R, Domanski P, Kotenko SV, Nelms K, Goldsmith MA, et al. Contribution of the Box 1 and Box 2 motifs of cytokine receptors to Jak1 association and activation. *J Biol Chem*. 2002;277(50):48220-6.
151. Hummel TM, Ackfeld T, Schönberg M, Ciupka G, Schulz F, Oberdoerster A, et al. Synthetic Deletion of the Interleukin 23 Receptor (IL-23R) Stalk Region Led to Autonomous IL-23R Homodimerization and Activation. *Mol Cell Biol*. 2017;37(17).
152. Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol*. 2007;178(5):2623-9.
153. Bridgewood C, Alase A, Watad A, Wittmann M, Cuthbert R, McGonagle D. The IL-23p19/EBI3 heterodimeric cytokine termed IL-39 remains a theoretical cytokine in man. *Inflamm Res*. 2019;68(6):423-6.
154. Wang Z. ErbB receptors and cancer. *Methods Mol Biol*. 2017;1652:3-35.
155. Pines G, Köstler WJ, Yarden Y. Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS Lett*. 2010;584(12):2699-706.
156. Martinelli E, Ciardiello D, Martini G, Troiani T, Cardone C, Vitiello PP, et al. Implementing anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) therapy in metastatic colorectal cancer: challenges and future perspectives. *Ann Oncol*. 2020;31(1):30-40.
157. Walker F, Hibbs ML, Zhang HH, Gonez LJ, Burgess AW. Biochemical characterization of mutant EGF receptors expressed in the hemopoietic cell line BaF/3. *Growth Factors*. 1998;16(1):53-67.
158. Collins MK, Downward J, Miyajima A, Maruyama K, Arai K, Mulligan RC. Transfer of functional EGF receptors to an IL3-dependent cell line. *J Cell Physiol*. 1988;137(2):293-8.
159. Jiang J, Greulich H, Jänne PA, Sellers WR, Meyerson M, Griffin JD. Epidermal growth factor-independent transformation of Ba/F3 cells with cancer-derived epidermal growth factor receptor mutants induces gefitinib-sensitive cell cycle progression. *Cancer Res*. 2005;65(19):8968-74.
160. Köse M. GPCRs and EGFR - Cross-talk of membrane receptors in cancer. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017;27(16):3611-20.
161. Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*. 2006;125(6):1137-49.
162. Muyldermans S. A guide to: generation and design of nanobodies. *Febs j*. 2021;288(7):2084-102.
163. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*. 2010;18(4):843-51.
164. Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*. 2014;6(224):224ra25.
165. Khanali J, Azangou-Khyavy M, Boroomand-Saboore M, Ghasemi M, Niknejad H. Jak/STAT-dependent chimeric antigen receptor (CAR) expression: a design benefiting from a dual and/or gate aiming to increase specificity, reduce tumor escape and affect tumor microenvironment. *Front Immunol*. 2021;12:638639.
166. Mossner S, Floss DM, Scheller J. Pro- and anti-apoptotic fate decisions induced by di- and trimeric synthetic cytokine receptors. *iScience*. 2021;24(5):102471.
167. Dhillon S. Tebentafusp: First approval. *Drugs*. 2022;82(6):703-10.

9 Anhang

9.1 Plasmidkarten, Aminosäuresequenzen und Klonierungsstrategien

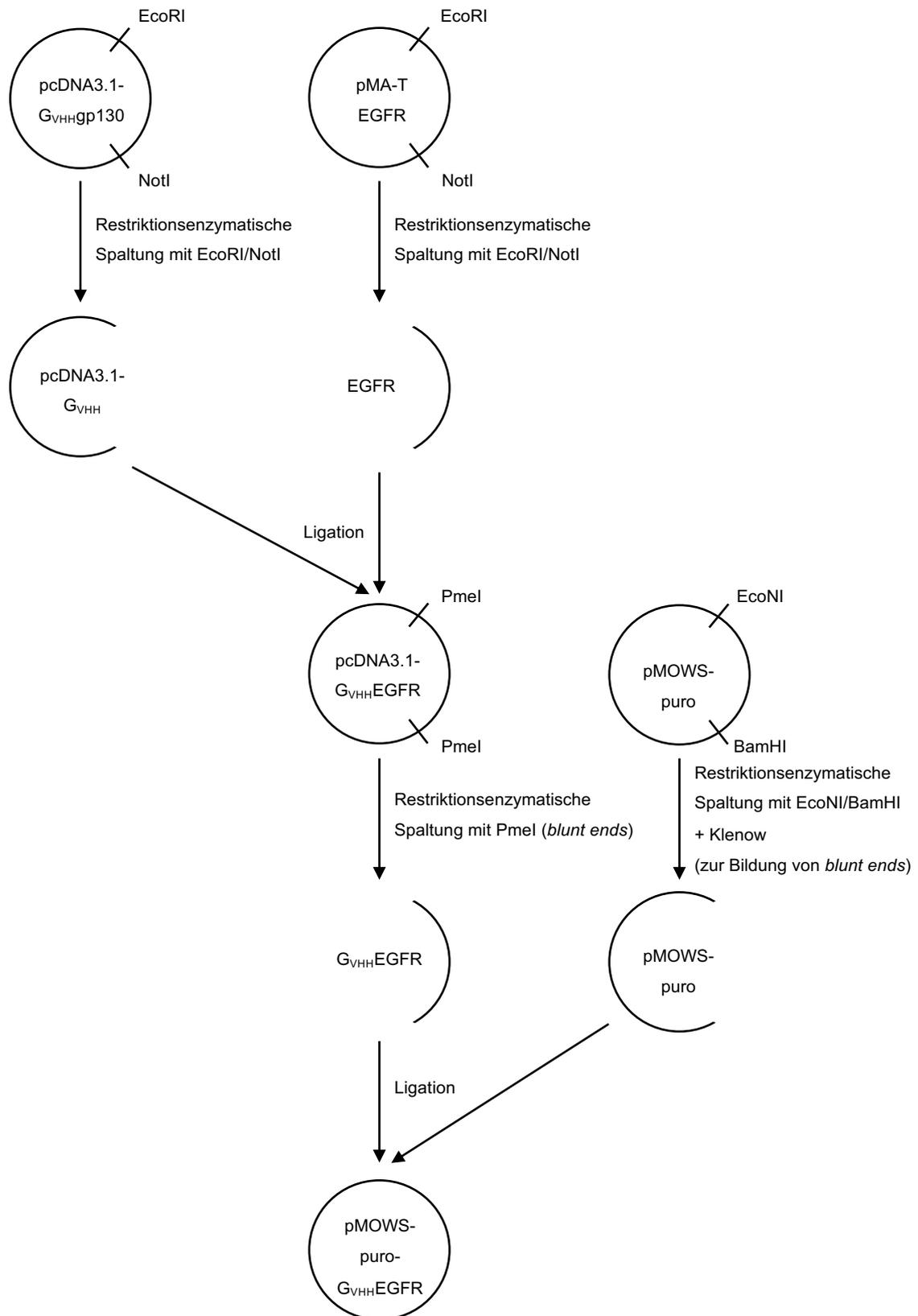
9.1.1 Plasmidkarte von pcDNA3.1-GFP_{VHH}EGFR und Aminosäuresequenz



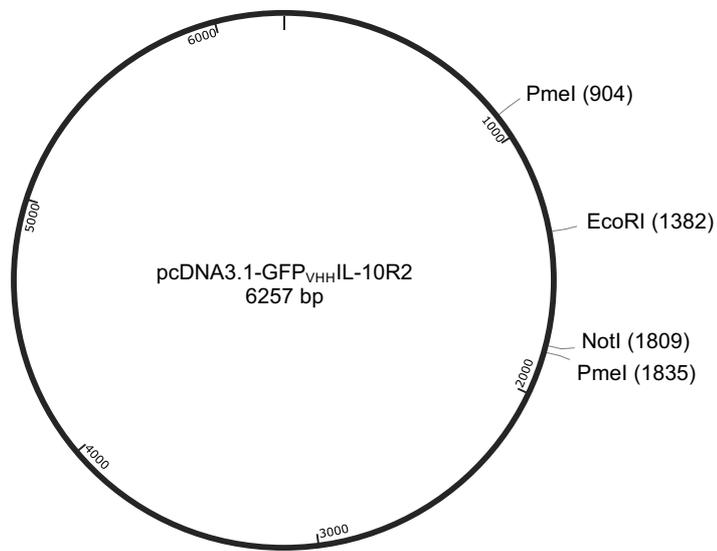
GFP_{VHH}EGFR

MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSEQKLISEEDLGSQVQLVESGGALVQ IL-11R signal
PGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQAPGKEREWVAGMSSAGDRSSYED peptide
SVKGRFTISRDDARNTVYQLQMNSLKPEDTAVYYCNVNVGFEYWGQGTQV
TVSSEFCPTNGPKIPSIATGMV GALLLLLVVALGIGLFMRRRHIVRKRT myc-tag
LRRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVY
KGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCR GFP_{VHH}
LLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIARGM
NYLEDRRRLVHRDLAARNVLVKT'PQHVKITDFGLAKLLGAEKEYHAEGG EGFR
KVPIKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGI PASEI
SSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMA
RDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDVDVDADEYLI PQQ
GFFSSPSTSRTPLLSSLSATSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDSFLQRY S
SDPTGALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQN'PVYHNQPLNPAP
SRDPHYQDPHSTAVGNPEYLN'TVQPTCVNSTFDS'PAHWAQKGS HQISLD
NPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSSEFIGA

9.1.2 Klonierungsschema für GFP_{VHH}EGFR



9.1.3 Plasmidkarte von pcDNA3.1-GFP_{VHH}IL-10R2 und Aminosäuresequenz



GFP_{VHH}IL-10R2

MSSSCSGLSRVIVAVATALVSASSEQKLISEEDLGSQVQLVESGGALV
 QPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQAPGKEREWVAGMSSAGDRSSY
 EDSVKGRFTISRDDARNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNVNVGFYWGQG
 TQVTVSSEFRITGNDEITPSWIVAILIVSVLVVFLFLLGCFVVLWLIY
 KTKHTFRSGTSLPQHLKEFLGHPHSTFLLFSFPPPEEAEVFDKLSI
 ISEESEGSKQSPEDNCASEPPSDPGPRELESKDEAPSPPHDDPKLLTS
 TSEV

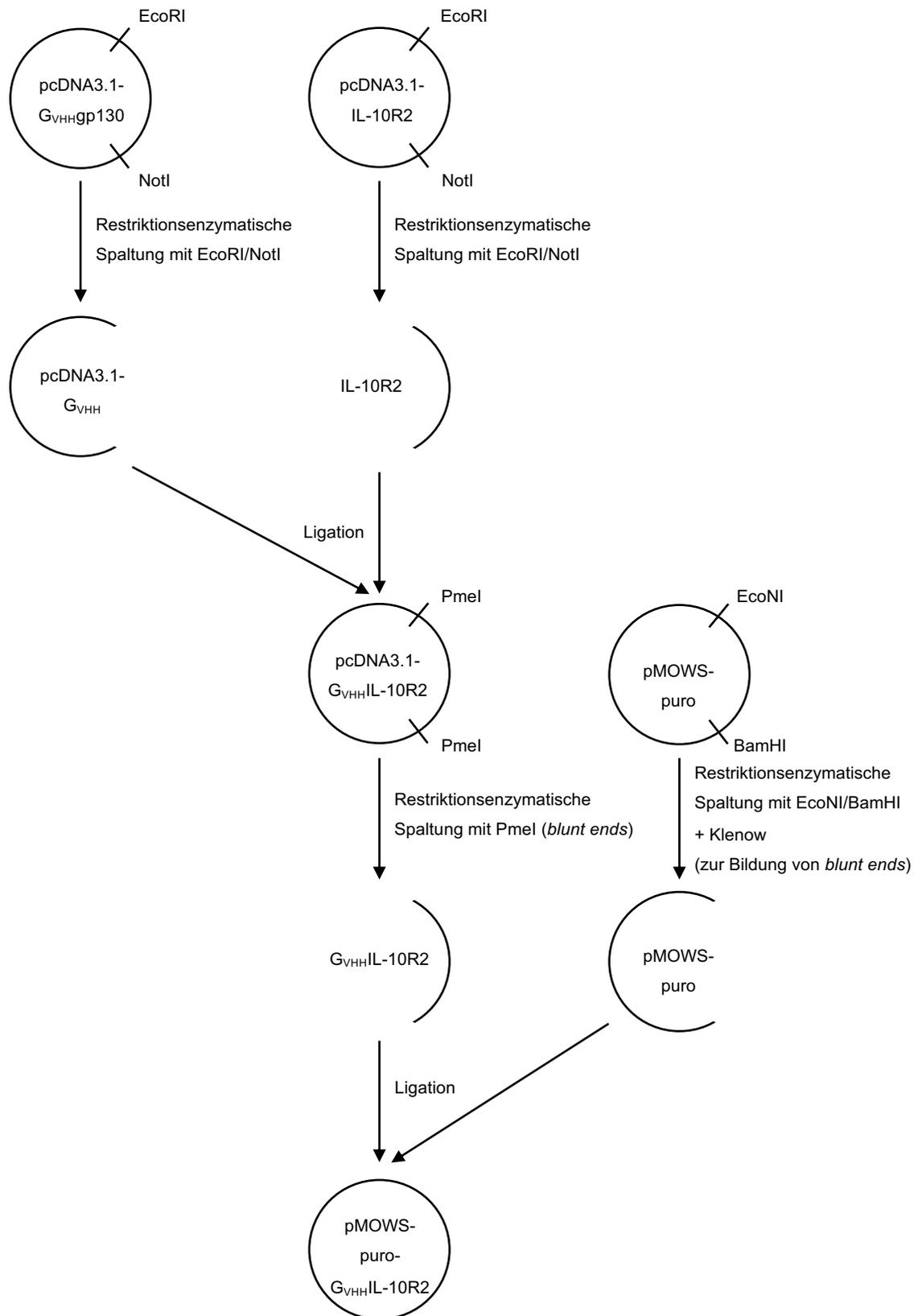
IL-11R signal
 peptide

myc-tag

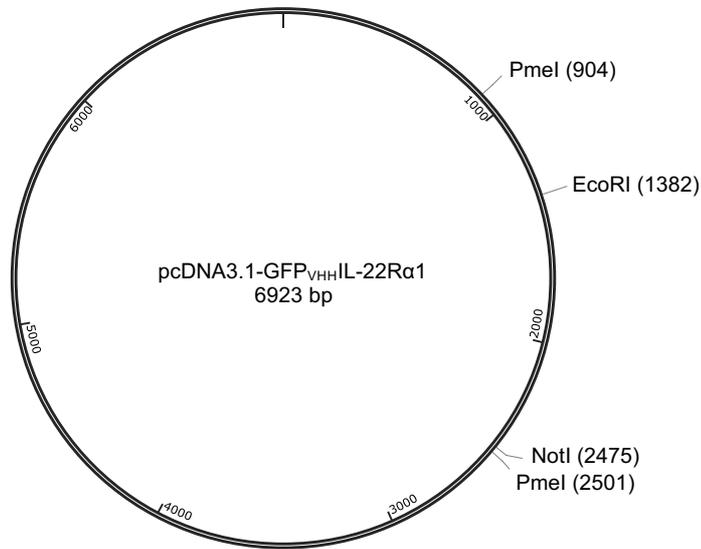
GFP_{VHH}

IL-10R2

9.1.4 Klonierungsschema für GFP_{VHH}IL-10R2



9.1.5 Plasmidkarte von pcDNA3.1-GFP_{VHH}IL-22R α 1 und Aminosäuresequenz



GFP_{VHH}IL-22R α 1

MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSEQKLISEEDLGSQVQLVESGGALV
 QPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQAPGKEREWVAGMSSAGDRSSY
 EDSVKGRFTISRDDARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNVGFYWGQG
 TQVTVSSEFTLPDRTWAYSFSGAVLFSGMGLVGLLCYLGYKYITKPPV
 PPNSLNVQRVLTQPLRFIQEHVLI PVLDSLGPSSLPQPIQYSQVVVS
 GPREPPGAVWRQSLSDLTYVGQSDVSI LQPTNVPAQQTLSPPSYAPKA
 VPEVQPPSYAPQVASDAKALFYSPQQGMKTRPATYDPQILDSCPASY
 AVCVEDSGKDSTPGILSTPKYLKTKGQLQEDTLVRSCLPGDLSLQKVT
 SLGEGETQRPKSLPSPLGFCTDRGPDHLTLRSEEPETPRYLKGA SLL
 SSVQIEGHPVSLPLHVHSVSCSPSDEGSPWGLLDSLVC PKDEGPAVE
 TEAMCPSAAASELEQSTELDSL FFKGLALTVQWES

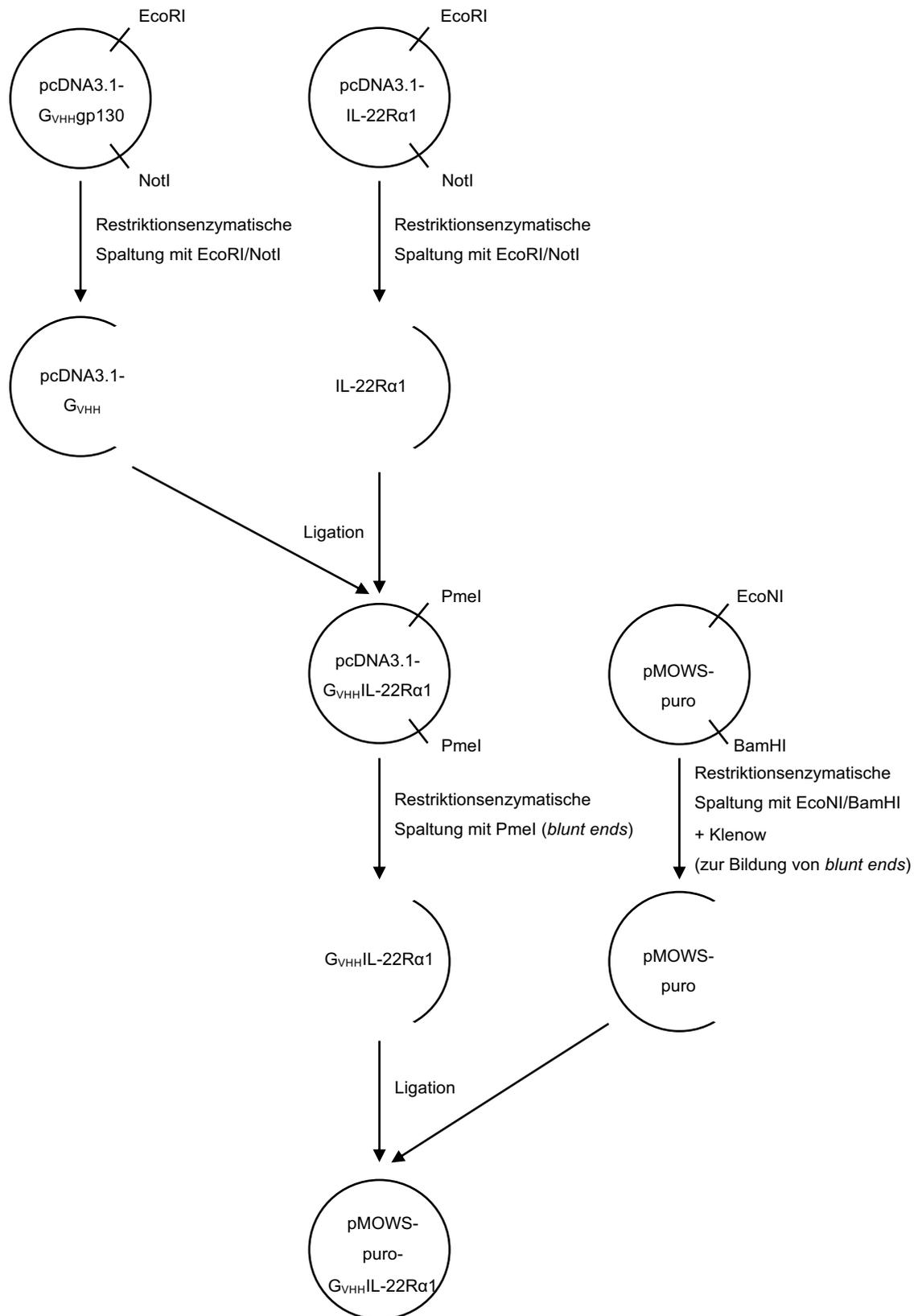
IL-11R signal
peptide

myc-tag

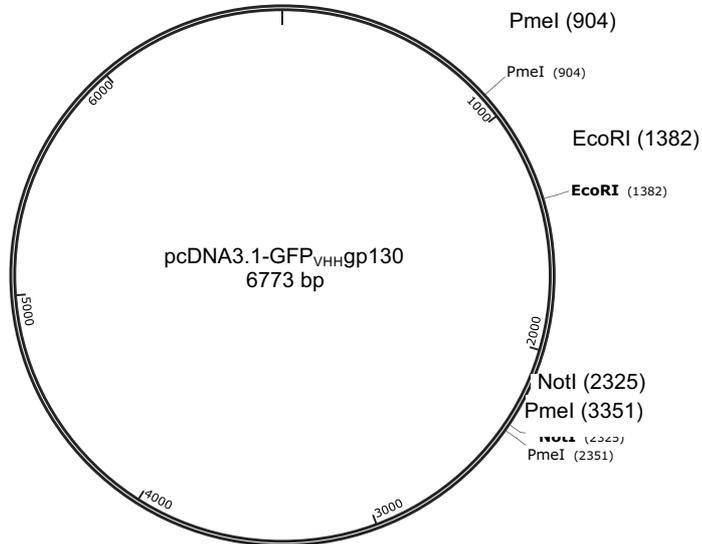
GFP_{VHH}

IL-22R α 1

9.1.6 Klonierungsschema für GFP_{VHH}IL-22Rα1



9.1.7 Plasmidkarte von pcDNA3.1-GFP_{VHH}gp130 und Aminosäuresequenz
(28)

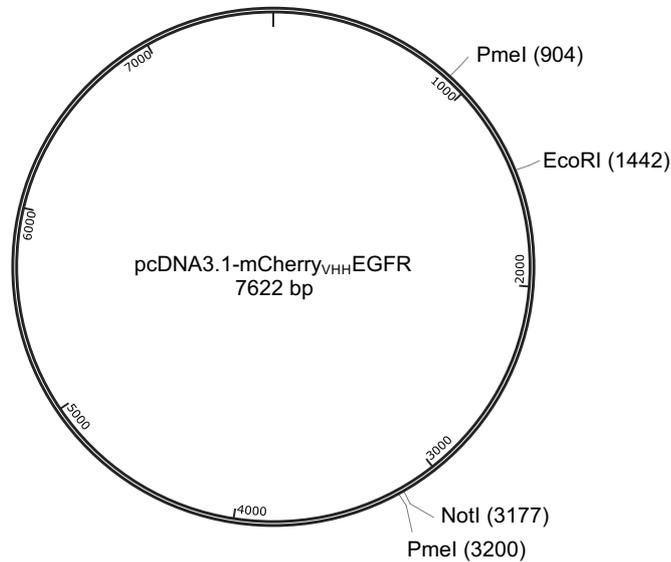


GFP_{VHH}gp130

MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSEQKLISEEDLGSQVQLVESGGALV
 QPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQAPGKEREWVAGMSSAGDRSSY
 EDSVKGRFTISRDDARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNVGFYWGQG
 TQVTVSSEFTFTTPKFAQGEIEAIVVPVCLAFLLTLLGVLFQFNKRD
 LIKKHIWPNVDPSPKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMYSDGNFTDVSV
 VEIEANDKKPFPELDKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPSI
 SSSDENESSQNTSSTVQYSTVHSGYRHHQVPSVQVFSRSEATQPLLD
 EERPEDLQLVDHVDGGDILPRQQYFKQNCSEQHSSPDISHFERSKQV
 SSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMKMFQEVSAADAFGPGTEGQV
 ERFETVGMEEATDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQAAARV

IL-11R signal
 peptide
 myc-tag
 GFP_{VHH}
 gp130

9.1.8 Plasmidkarte von pcDNA3.1-mCherry_{VHH}EGFR und Aminosäuresequenz



mCherry_{VHH}EGFR

MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDKGSYPYDVPDYAGSQVQL
 VESGGGLVQAGGSLRLSCATSGFTFSDYAMGWFRQAPGKEREVAAIS
 WSGHVTDYADSVKGRFTISRDNVKNVTVYLQMNSLKPEDTAVYSCAAAK
 SGTWWYQRSENFSGSWGQGTQVTVSKEAIEFCPTNGPKIPSIATGMVG
 ALLLLLVVALGIGLFMRRRHIVRKRTRLRLLQERELVEPLTPSGEAPN
 QALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELR
 EATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLGLICLTSTVQLITQLMPFG
 CLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNVL
 VKTPQHVKITDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKVPKWMALLESILHRIYT
 HQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGI PASEISSILEKGERLPQPPICT
 IDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMH
 LPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADLEYLIPQQGFSSPSTSRTPLLS
 SLSATSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDD
 TFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTA
 VGNPEYLNVTVPFCVNSTFDS PAHWAQKGS HQISLDNPDYQQDFFPKE
 AKPNGIFKGSTAENA EYLRVAPQSSEFIGA

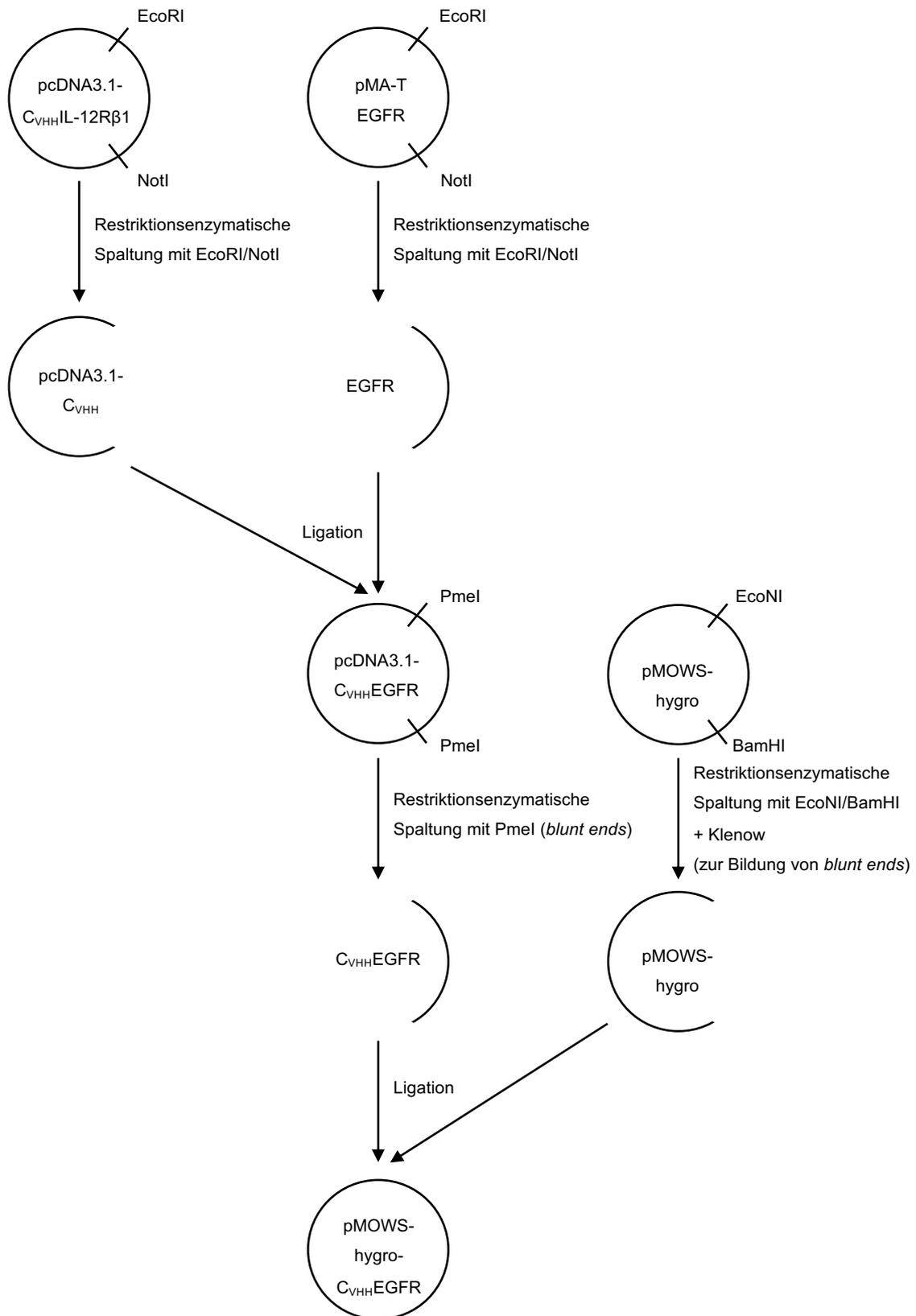
IL-11R signal
peptide

HA-tag

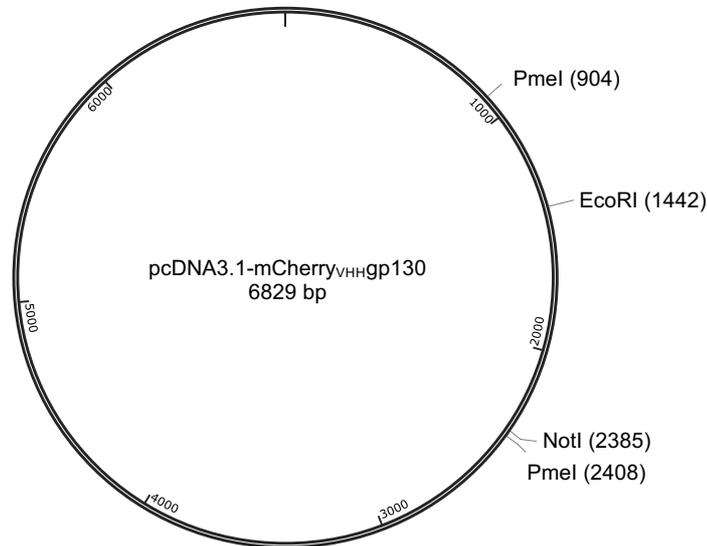
mCherry_{VHH}

EGFR

9.1.9 Klonierungsschema für mCherry_{VHH}EGFR



9.1.10 Plasmidkarte von pcDNA3.1-mCherry_{VHH}gp130 und Aminosäuresequenz



mCherry_{VHH}gp130

MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDKGSYPYDVPDYAGSQVQL
 VESGGGLVQAGGSLRLSCATSGFTFSDYAMGWRQAPGKEREFVAAIS
 WSGHVTDYADSVKGRFTISRDNVKNITVYLQMNSLKPEDTAVYSCAAAK
 SGTWWYQRSEDFGSWGQGTQVTVSKEAIEFTFTTPKFAQGEIEAIV
 PVCLAFLLTLLGLVLCFENKRDLIKHIWPNVDPDPKSHIAQWSPHTP
 PRHNFNSKDQMYSDGNFTDVSVVEIEANDKKPFPELDKSLDLFKKEKI
 NTEGHSSGIGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSSTVQYSTVHSGY
 RHQVPSVQVFSRSEATQPLLDSEERPEDIQLVDHVDGGDILPRQQYF
 KQNCQHESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSG
 QMKMFQEVSAADAFGPGTEGQVERFETVGMEEATDEGMPKSYLPQTVR
 QGGYMPQAAARV

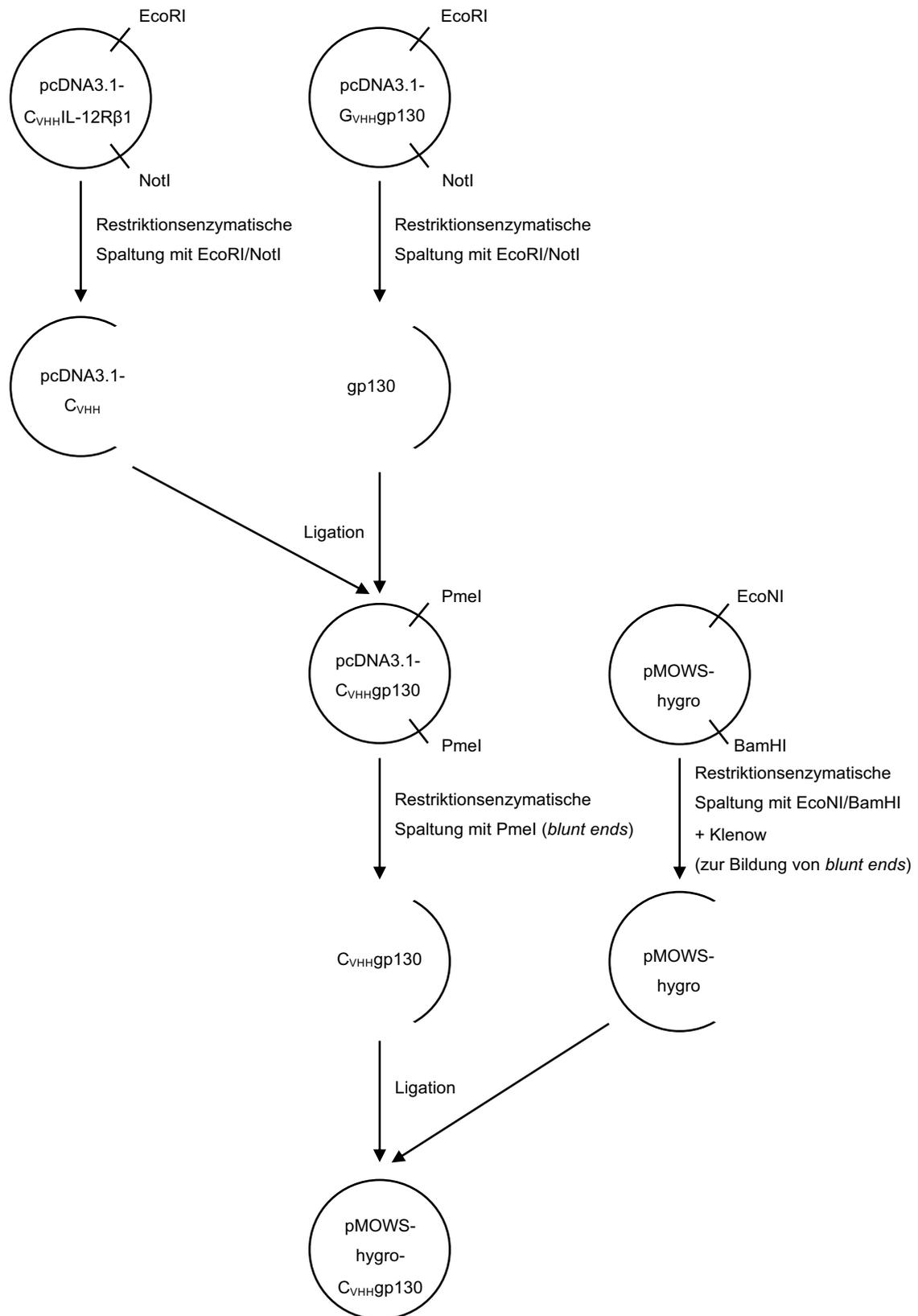
IL-11R signal peptide

HA-tag

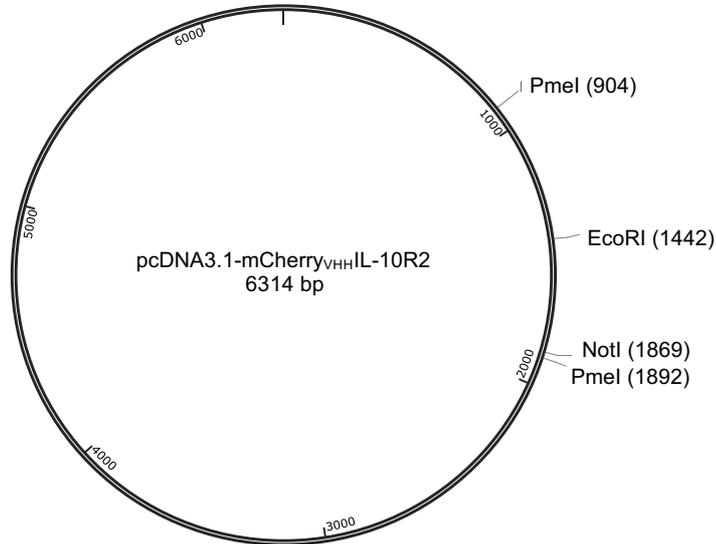
mCherry_{VHH}

gp130

9.1.11 Klonierungsschema für mCherry_{VHH}gp130



9.1.12 Plasmidkarte von pcDNA3.1-mCherry_{VHH}IL-10R2 und Aminosäuresequenz



mCherry_{VHH}IL-10R2

MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDKGSYPYDVPDYAGSQVQL
 VESGGGLVQAGGSLRLSCATSGFTFSDYAMGWRQAPGKEREFVAAIS
 WSGHVTDYADSVKGRFTISRDNVKNITVYLQMNSLKPEDTAVYSCAAAK
 SGTWWYQRSENDFGSWGQGTQVTVSKEAIEFRITGNDEITPSWIVAILL
 IVSVLVVVFLELLGCFVVLWLIYKTKHTFRSGTSLPQHLKEFLGHPHH
 STFLLFSFPPPEEAEVFDKLSIISEESESGSKQSPEDNCASEPPSDPGP
 RELESKDEAPSPPHDDPKLLTSTSEV

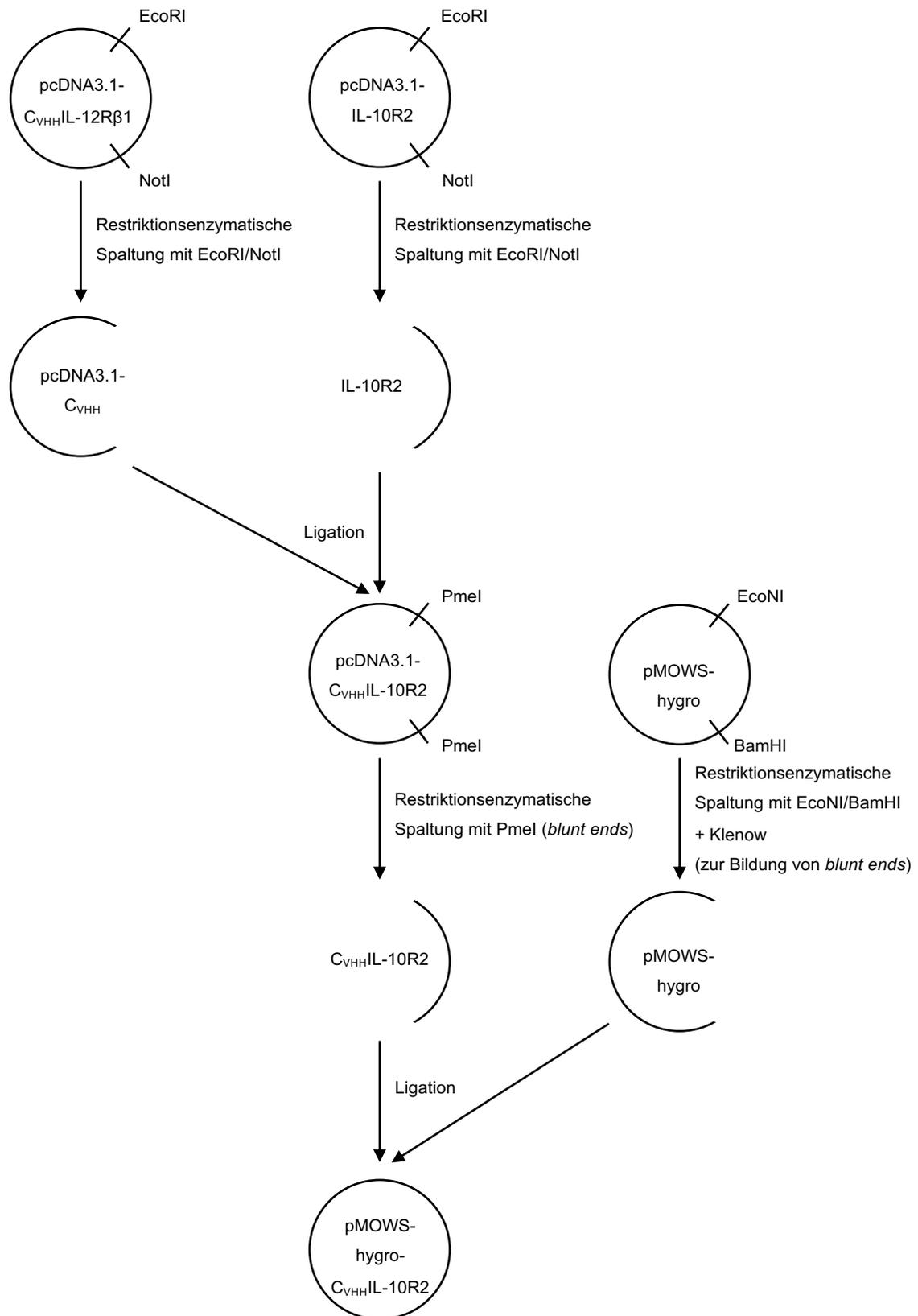
IL-11R signal
peptide

HA-tag

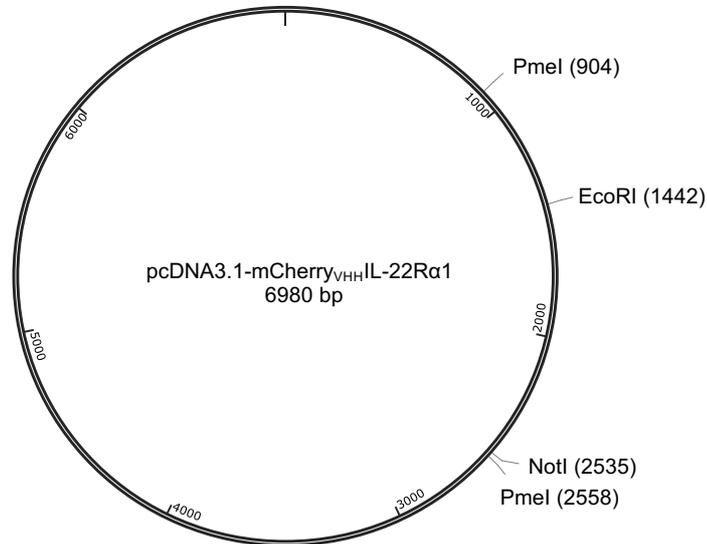
mCherry_{VHH}

IL-10R2

9.1.13 Klonierungsschema für mCherry_{VHH}IL-10R2



9.1.14 Plasmidkarte von pcDNA3.1-mCherry_{VHH}IL-22Rα1 und Aminosäuresequenz



mCherry_{VHH}IL-22Rα1

MSSSCSGLSRVLLVAVATALVSASSDYDDDDKGSYPYDVPDYAGSQVQL
 VESGGGLVQAGGSLRLSCATSGFTFSDYAMGWRQAPGKEREVAAIS
 WSGHVTDYADSVKGRFTISRDNVKNTVYLQMNSLKPEDTAVYSCAAAK
 SGTWWYQRSENDFGSWGQGTQVTVSKEAIEFTLPDRTWAYSFSGAVLF
 SMGFLVGLLCYLGYKYITKPPVPPNSLNVQRVLTFFQPLRFIQEHVLIIP
 VLDLSGPSSLPQPIQYSQVVVSGPREPPGAVWRQSLSDLTYVGQSDVS
 ILQPTNVPAQQTLSPPSYAPKAVPEVQPPSYAPQVADAKALFYSPQQ
 GMKTRPATYDPQDILDSCPASYAVCVEDSGKDSTPGILSTPKYLKTKG
 QLQEDTLVRSCLPGLSLQKVTSLGEGETQRPKSLPSPLGFCTDRGPD
 LHTLRSEEPETPRYLKGAISLLSSVQIEGHPVSLPLHVHSVSCSPSDE
 GPSPWGLLDLSLVCPKDEGPAVETEAMCPSAAASELEQSTELDSLKGL
 ALTVQWES

IL-11R signal
 peptide

HA-tag

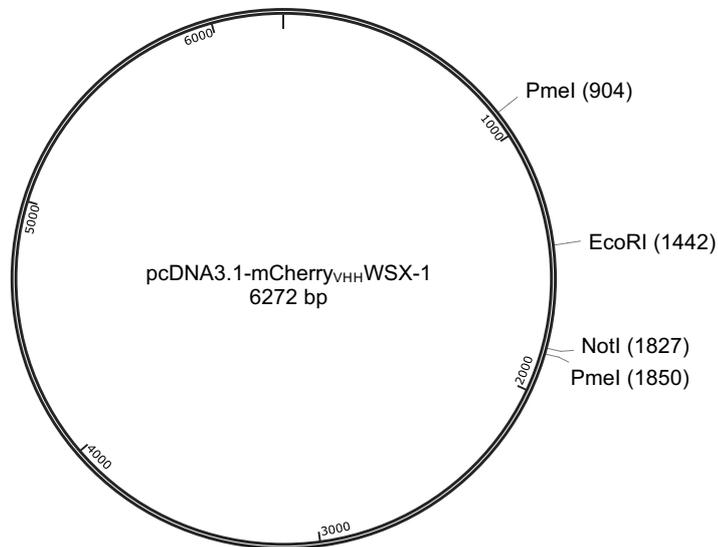
mCherry_{VHH}

IL-22Rα1

9.1.15 Klonierungsschema für mCherry_{VHH}IL-22Rα1



9.1.16 Plasmidkarte von pcDNA3.1-mCherry_{VHH}WSX-1 und Aminosäuresequenz



mCherry_{VHH}WSX-1

MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSDYDDDDKGSYPYDVPDYAGSQVQL
 VESGGGLVQAGGSLRLSCATSGFTFSDYAMGWRQAPGKEREFVAAIS
 WSGHVTDYADSVKGRFTISRDNVKNTVYLQMNSLKPEDTAVYSCAAAK
 SGTWWYQRSEDFGSWGQGTQVTVSKEAIEFSLHLPDNRIRWKALPWF
 LSLWGLLLMGCGLSLASTRCLQARCLHWRHKLLPQWIWERVPDPANSN
 SGQPYIKEVSLPQPPKDGPILEVEEVELQPVVESPKASAPIYSGYEKH
 FLPTPEELGLLV

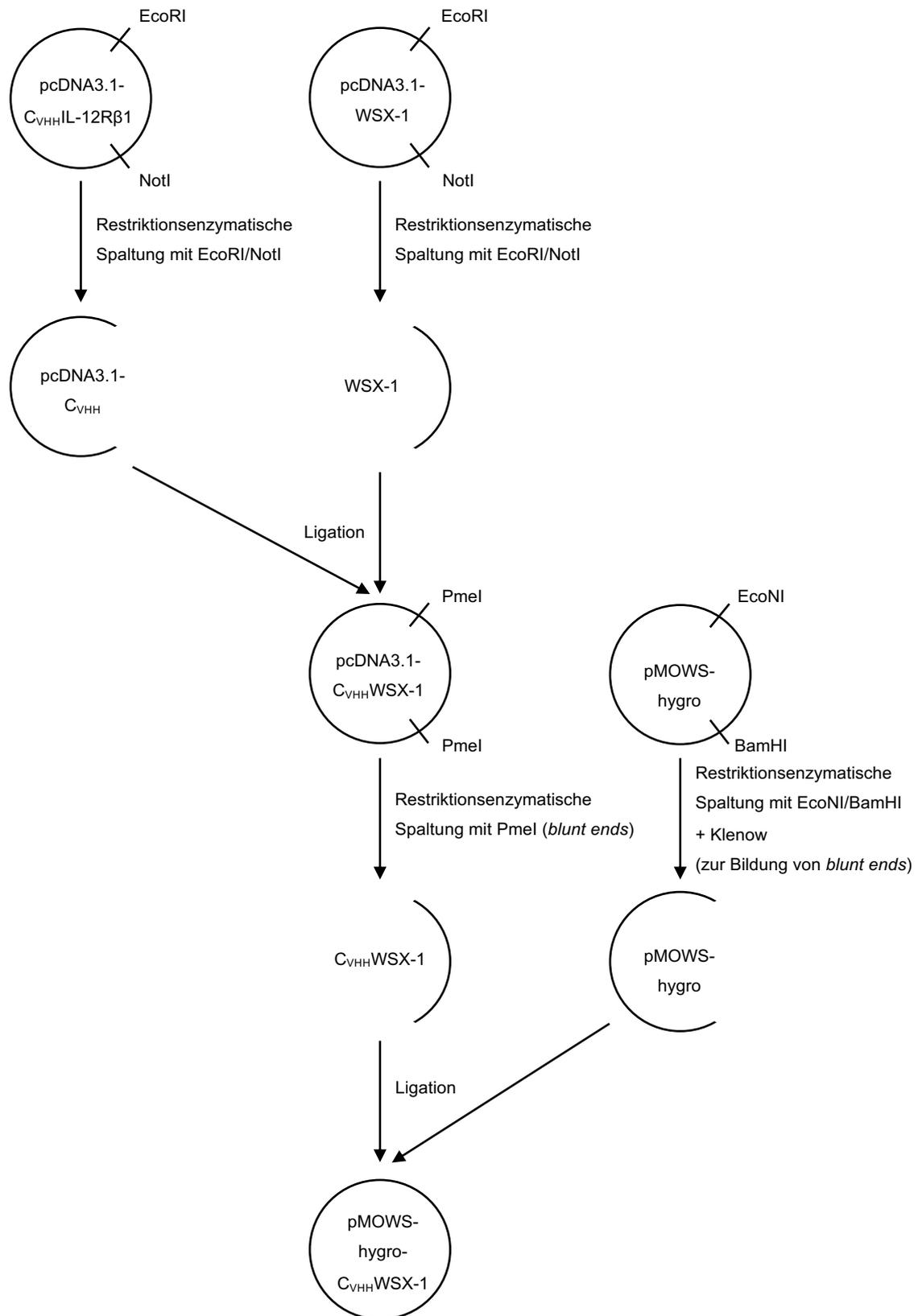
IL-11R signal
peptide

HA-tag

mCherry_{VHH}

WSX1

9.1.17 Klonierungsschema für mCherry_{VHH}WSX-1



10 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Jürgen Scheller bedanken, ohne den dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre und der mir stets bei allen Rückfragen und Herausforderungen zur Seite stand. Gleiches gilt in besonderem Maße für Frau Dr. Engelowski und Frau PD Dr. Floß, die mir stets geholfen haben und mit mir gemeinsam diese Promotion vorangetrieben haben.

Ebenso möchte ich mich bei dem gesamten Team des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II bedanken, mit denen das Zusammenarbeiten so viel Freude bereitet hat, dass die Zeit wie im Fluge verging und sich trotz mancher Sackgasse niemals schwer angefühlt hat. Frau Oprée-Jeremic danke ich für ihre immer herzliche Art und Unterstützung.

Zuletzt danke ich meiner Familie, die mich immer unterstützt hat und an mich geglaubt hat.