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

Die Etablierung von synthetischen Zytokinrezeptoren (SyCyRs) für die Interferon-Signaltransduktion

Dissertation

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

> vorgelegt von Elena Zimmer 2024

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

gez.: Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Björn Stork

"Die wahre Lebenskunst besteht darin, im Alltäglichen das Wunderbare zu sehen." Pearl S. Buck

Auflistung der Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Zoellner, N., Coesfeld, N., De Vos, F. H., Denter, J., Xu, H. C., **Zimmer, E.,** Knebel, B., Al-Hasani, H., Mossner, S., Lang, P. A., Floss, D. M., & Scheller, J. Synthetic mimetics assigned a major role to IFNAR2 in type I Interferon signaling. *Frontiers in Microbiology*, 3254.

Zusammenfassung (deutsch)

Interferone sind Zytokine, die eine wichtige Rolle im Immunsystem einnehmen. Sie entfalten immunmodulatorische, anti-proliferative sowie antiinfektiöse Wirkungen im Organismus und waren daher lange Zeit großer Hoffnungsträger für die Entwicklung zahlreicher Medikamente. Aufgrund ihrer ambivalenten Wirkungen, vor allem im Bereich der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und malignen Tumoren, sowie der häufig auftretenden, starken Nebenwirkungen, wurden Interferone in vielen Fällen jedoch durch andere Therapeutika mit günstigeren Nebenwirkungsprofilen abgelöst. Das von der Arbeitsgruppe von Prof. Scheller (AG Scheller) entwickelte System synthetischer Zytokinrezeptoren [1] bietet die Möglichkeit, Rezeptoren durch den Einsatz synthetischer Liganden und extrazellulärer nanobodies (VHH) gezielt und somit hintergrundfrei zu aktivieren. In vorherigen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass das System der synthetischen Zytokinrezeptoren auf murine Typ I Interferonrezeptoren (mIFNAR) angewandt werden kann [2]. Um dieses System auch für die humanen Typ I und Typ II Interferone zu etablieren, wurden die intrazellulären und transmembranären Anteile der Interferonrezeptoren (IFNR), sowie einige Aminosäuren des extrazellulären Rezeptoranteils mit nanobodies (VHH) fusioniert. Diese bildeten den extrazellulären Teil des Rezeptors und waren gegen die synthetischen, fluoreszierenden Proteine green fluorescent protein (V_G) und mCherry (V_c) gerichtet. Der humane Typ I Interferonrezeptor (hIFNAR) setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, die je mit V_{G} (hIFNAR1) und V_{C} (hIFNAR2) fusioniert wurden. Der humane Typ II Interferonrezeptor (hIFNGR) besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten hIFNGR1 und hIFNGR2, die sich zu einem Tetramer aus je zwei hIFNGR1 und hIFNGR2 zusammensetzen. Aufgrund der besonderen Rezeptorstruktur wurden für hIFNGR mehrere Varianten aus Rezeptoruntereinheit und nanobody erstellt.

Nach Stimulation durch die natürlichen Liganden werden intrazellulär verschiedene Signalwege aktiviert, wobei die JAK/STAT-Signalkaskade am charakteristischsten für die Interferon-Signaltransduktion ist. Daher wurde bei der Untersuchung der Signaltransduktion der synthetischen Rezeptoren hierauf der Fokus gelegt. Die Stimulation von synthetischen hIFNARexprimierenden Ba/F3-gp130 Zellen zeigte eine für die Typ I Interferone charakteristische Aktivierung der JAK/STAT-Signalkaskade. Durch die Fusion einzelner Untereinheiten mit jeweils anderen nanobodies erlaubte das System die Steuerung der Rezeptorassemblierung durch Einsatz unterschiedlicher Ligandenkombinationen. So konnte nachgewiesen werden, dass die Stimulation eines hIFNAR2-Homodimers zu einer STAT-Phosphorylierung führte, während ein hIFNAR1-Homodimer nach Stimulation keine Aktivierung der JAK/STAT-Signalkaskade zeigte. Abschließend wurden zuvor in der AG Scheller erstellte Mutationsvarianten von synthetischen mIFNA-Rezeptoren mit **Mutationen** von intrazellulären Tyrosinen beider Rezeptoruntereinheiten hinsichtlich ihrer STAT-Aktivierung nach Stimulation von Rezeptortragenden HEK293 Zellen untersucht. Die Ergebnisse bekräftigten die in der Literatur beschriebene Relevanz der IFNAR2-Tyrosine Y335 und Y510 für die STAT-Aktivierung. Zusammenfassend ermöglicht die Etablierung der synthetischen Zytokinrezeptoren für die Interferon-Signaltransduktion eine, hintergrundfreie und zielgerichtetere Aktivierung der Signalkaskade, welche den Weg sowohl für weitere biochemische Forschung als auch für die Entwicklung gezielterer, nebenwirkungsärmerer Therapien ebnet.

Zusammenfassung (englisch)

Interferons are cytokines that play an important role in the immune system. They exert immunomodulatory, anti-proliferative and anti-infectious functions and have therefore long been a great source of hope for the development of numerous drugs. Due to their ambivalent effects, especially in regard of development of autoimmune diseases, procarcinogenic effects, as well as the frequently occurring strong side effects when clinically administrated, interferons have in many cases been replaced by other therapeutic agents with more favourable side effect profiles. The synthetic cytokine receptor system developed by the team of Prof. Scheller (AG Scheller) [1] enables background-free receptor activation through the use of synthetic ligands and extracellular nanobodies (VHH). Previous work has demonstrated that the synthetic cytokine receptor system can be applied to murine type I interferon receptors (mIFNAR) [2]. To establish this system also for human type I and type II interferons, the intracellular and transmembrane domains of the interferon receptors (IFNR), as well as some amino acids of the extracellular receptor domain were fused with nanobodies (VHH). These formed the extracellular domain of the synthetic receptor and were directed against the synthetic fluorescent proteins green fluorescent protein (V_G) and mCherry (V_C). Human type I IFNR (hIFNAR) is composed of two subunits, hIFNAR1, which was fused to V_{G} and hIFNAR2, which was fused to V_c. Human type II IFNR (hIFNGR) is composed of two distinct subunits hIFNGR1 and hIFNGR2, which form a tetramer of two hIFNGR1 and two hIFNGR2, respectively. Due to this particular receptor structure, several variants of receptor subunit and nanobody were created for hIFNGR.

Upon stimulation by their natural ligands, various signaling pathways are activated intracellularly, with the JAK/STAT signaling cascade being the most characteristic one for interferon signal transduction. Therefore, the investigation of the singaling pathways of the synthetic ligands focused on the JAK/STAT signaling cascade. Stimulation of Ba/F3-gp130 cells expressing the synthetic hIFNAR led to characteristic activation of the JAK/STAT signaling cascade. As every subunit was fused with different nanobodies, the use of various ligand combinations allowed control of receptor assembly. Thus, stimulation of a hIFNAR2 homodimer was shown to activate STAT phosphorylation, whereas a stimulated hIFNAR1 homodimer showed no activation of the JAK/STAT signaling cascade. Eventually, mutational variants of synthetic mIFNA-receptors with mutations of intracellular tyrosines of receptor subunits previously generated in AG Scheller were examined with respect to their STAT activation after stimulation of receptor-bearing HEK293 cells. The results confirmed the relevance of mIFNAR2 tyrosines Y335 and Y510 for STAT activation as reported in the literature. In conclusion, the establishment of synthetic cytokine receptors for interferon signal transduction enables further background-free and more specific activation of the signal transduction pathway, which clears the way for further biochemical research as well as for the development of targeted immune-therapies with fewer side effects.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Vollständige Bezeichnung
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
I	Liter
ng	Nanogramm
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
g	Gramm
AG	Arbeitsgruppe
AGS	Aicardi-Goutières-Syndrom
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxisulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
С	mCherry
CANDLE	chronic atypical neutrophilic dermatosis with lipodystrophy and elevated temperatures
CAR-T-Zellen	chimeric antigen receptor T-Zellen
СС	mCherry-Fc
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
СН	constant heavy chain domain
CH25H	Cholesterol-25-Hydroxylase
CL	constant light chain domain
CRS	cytokine release syndrome
DAA	direct antiviral agents
DAMP	damage associated molecular pattern
DLBCL	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced green fluorecent protein
EMA	european medicines agency
Еро	Erythropoetin
Epo-R	Erythropoetin-Rezeptor

Fab	fragment for antigen binding
Fc	fragment crystallizable
FCS	fetales Kälberserum
FDA	food and drug administration
G	GFP
GAF	Interferon y activated factor
GAS	Interferon y activated site
GC	GFP-mCherry rekombinant
GCCG	GFP-mCherry-Fc
GFL	Gesellschaft für Labortechnik
GFP	green fluorescent protein
GG	GFP-Fc
GGCCGG	2x GFP-mCherry Fc
gp130	Glykoprotein 130
h	Stunde
HcAbs	heavy chain only antibodies
HCV	Hepatitis-C-Virus
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HIL-6	Hyper-Interleukin-6
IFITM-Protein	IFN-inducible transmembrane Protein
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon α Rezeptor
IFNGR	Interferon y Rezeptor
IFNLR	Interferon λ Rezeptor
IFNα	Interferon α
IFNγ	Interferon gamma
lg	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-10R	Interleukin 10 Rezeptor
IL-12	Interleukin 12
IL-6	Interleukin 6
IL-6R	Interleukin 6 Rezeptor
IRF	interferon regulatory factors
ISGF3	interferon stimulated gene factor 3
ISGs	interferon stimulated genes
ISRE	interferon stimulated response element
JAK1	Januskinase 1
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
kb	Kilobasen
1	Liter
LB	Lysogeny-Broth, Luria/Miller
LPS	Lipopolysaccharide

МАРК	Mitogen-aktivierte Proteinkinase		
MAS	Makrophagenaktivierungssyndrom		
mCherry	monomeric Cherry		
MHC I-/II	major histocompatibility complex I / II		
mIFNAR/hIFNAR	muriner/humaner Interferon α Rezeptor		
min	Minuten		
ml	Milliliter		
mRFP	monomeric red fluorescent protein		
MS	Multiple Sklerose		
Mx1 und 2	myxovirus resistance protein 1 und 2		
NF-κB	nuclear factor-кВ		
ng	Nanogramm		
NKT-Zellen	natural killer T-cells		
NK-Zellen	natural killer cells		
PAMPs	pathogen associated molecular patterns		
pBS	pBluescript		
PBS	phosphate buffered saline		
PCR	polymerase chain reaction		
PRR	pathogen recognizing receptors		
pSTAT	phosphorylated signal transducers and activators of transcription		
puro	Puromycin		
RIG-I	retinoic acid-inducible gene-I		
RLR	RIG-I-like Rezeptoren		
RNA	Ribonukleinsäure		
rpm	Rotationen pro Minute		
RT	Raumtemperatur		
S	Sekunden		
SARS-Cov-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2		
SAVI	STING associated vasculopathy with onset in infancy		
SDM-PCR	site-directed-mutagenesis PCR		
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis		
SJIA	systemisch juvenile ideopathischer Arthritis		
SLE	systemische Lupus erythematodes		
SNVs	single nucleotide variants		
SP	Signalpeptid		
STAT	signal transducers and activators of transcription		
STING	stimulator of interferon genes		
SyCyR	synthetic cytokine receptor		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
TAP 1 und 2	transporters associated with antigen processing 1 and 2		
TBS	Tris-buffered saline		

TBS-T	Tris-buffered saline mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like receptors
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIM-Protein	tripartite motif Protein
ТҮК2	Tyrosinkinase 2
UV	ultraviolett
V	Volt
Vc	mCherry- <i>nanobody</i>
V _G	green fluorescent protein nanobody
VHH	variable heavy chain domain/nanobody
Viperin	virus inhibitory protein, endoplasmatic reticulum associated, interferon inducible
VL	variable light chain domain
VNAR	variable new antigen receptor
α	anti

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung1		
1.1	Die Interferonfamilie1		
1.2	Die Interferonrezeptoren2		
1.3	Ausschüttung der Interferone4		
1.4	Physio	logische und pathophysiologische Wirkung der Interferone	5
	1.4.1	Antiviral	5
	1.4.2	Immunmodulatorisch	6
	1.4.3	Anti- und prokanzerogene Effekte	6
	1.4.4	Autoimmunerkrankungen und Interferonopathien	7
1.5	Kliniscl	her Einsatz von Interferonen	7
1.6	Die syr	nthetischen Zytokinrezeptoren (SyCyRs)	8
1.7	Ziele d	er Arbeit	10
2	Materi	ial und Methoden	11
2.1	Materi	alien	11
	2.1.1	Antibiotika	. 11
	2.1.2	Antikörper	. 11
	2.1.3	Chemikalien	. 12
	2.1.4	Enzyme	. 13
	2.1.5	Geräte	. 13
	2.1.6	Kits	. 14
	2.1.7	Medien	. 14
	2.1.8	Oligonukleotide	. 15
	2.1.9	Plasmide	. 16
	2.1.10	Puffer und Lösungen	. 17
	2.1.11	Verbrauchsmaterialien	. 18
	2.1.12	Zytokine und synthetische Liganden	. 18
	2.1.13	Zelllinien und Bakterienstämme	. 18
2.2	Molek	ularbiologische Methoden	19
	2.2.1	Transformation von chemisch kompetenten E. coli	. 19
	2.2.2	PCR (polymerase chain reaction/Polymerasekettenreaktion)	. 20
	2.2.3	Präparation von Plasmid-DNA	. 22
	2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	. 23
	2.2.5	Gelextraktion – Isolation von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	. 23
	2.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten	. 24
	2.2.7	Bestimmung der DNA-Konzentration	. 24

	2.2.8	Restriktion der DNA	25
	2.2.9	Dephosphorylierung	25
	2.2.10	Phosphorylierung von DNA-Fragmenten	25
	2.2.11	Sequenzierung	25
2.3	Zellbic	ologische Methoden	26
	2.3.1	Passagieren von Zellen	26
	2.3.2	Transfektion von HEK-293T und HEK-293 Zelllinien	26
	2.3.3	Retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen	26
	2.3.4	Stimulationsassay	27
	2.3.5	Proliferationsassay von Ba/F3-gp130 Zellen	27
	2.3.6	Analyse der Expression von Rezeptoren an der Zelloberfläche von Ba/F3-gp130 Zellen .	27
2.4	Protei	nbiolchemische Methoden	28
	2.4.1	Herstellung von Zelllysaten	28
	2.4.2	BCA Assay	28
	2.4.3	Western Blot	28
	2.4.4	Stripping der Western Blot Membran	29
2	E la		24
5	Ergebi		31
3.1	Synthe	etische humane IFNα-Rezeptoren werden durch synthetische Liganden	24
		21 L	51
	3.1.1	Synthetische nirkka-kezeptoren werden in eukaryotischen zeiten exprimiert	32
	5.1.2	eukaryotischen Zellen zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges	34
	3.1.3	Erzeugung von stabilen Ba/F3-gp130 Zellen mit Expression synthetischer humaner Typ I IFN-Rezeptoren	37
	3.1.4	Die Stimulation von synthetischen hIFNα-Rezeptoren führt in stabil transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen zu einer Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges	40
3.2	Mutat	ionsvarianten des synthetischen mIFNα-Rezeptors zeigen unterschiedliche	
	Aktivie	erungen des JAK/STAT-Signalweges	43
	3.2.1	Die Mutationsvarianten des synthetischen mIFNα-Rezeptors werden von eukaryotischen Zellen exprimiert.	44
	3.2.2	Die Stimulation verschiedener Mutationsvarianten der synthetischen mIFN $lpha$ -	
		Rezeptoren führt zu einer Änderung der Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges in transient transfizierten, eukaryotischen Zellen	47
	3.2.3	Herstellung von stabilen Ba/F3-gp130 Zellen mit Expression der Mutationsvarianten der synthetischen Rezeptoren	49
	3.2.4	Die Mutationsvarianten der synthetischen Rezeptoren werden auf der Oberfläche von Ba/F3-gp130 Zellen exprimiert.	50
3.3	Die Ak	tivierung synthetischer humaner IFNy-Rezeptoren mit synthetischen	
	Ligand	len führt zu einer intrazellulären JAK/STAT-Signaltransduktion	52
	3.3.1	Expression der synthetischen hIFNy-Rezeptoren in HEK293T Zellen	57

	3.3.2	Die Stimulation der synthetischen hIFNγ-Rezeptoren mit synthetischen Liganden führt in HEK293 Zellen zu keiner Signaltransduktion	9
	3.3.3	Herstellung stabiler Ba/F3-gp130 Zelllinien mit Expression der synthetischen hIFNγ- Rezeptoren	0
	3.3.4	Analyse der Signaltransduktion in stabil transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen	2
4	Diskus	ssion67	7
4.1	Konsti	ruktionsprinzip der SyCyRs6	7
	4.1.1	Der synthetische hIFNAR phänokopierte die Signalkaskade des Wildtyp-Rezeptors6	7
	4.1.2	Das Homodimer aus hIFNAR2 initiiert nach Stimulation eine JAK/STAT Signalkaskade 69	9
4.2	Die Ty Phosp	rosinreste Y335 und Y510 in mIFNAR2 sind relevant für die horylierung der STAT-Proteine	1
4.3	Kann o Interfe	das System der synthetischen Zytokinrezeptoren auch auf Typ II erone angewandt werden?72	2
4.4	Anwei und Kl	ndungsmöglichkeiten für synthetische Interferonrezeptoren in Forschung Iinik	4
4.5	Schlus	sfolgerung	5
5	Abbilo	dungsverzeichnis77	7
6	Tabell	enverzeichnis	9
7	Litera	tur- und Quellenverzeichnis80	D
8	Anhar	ng89	9
Danl	ksagung	g 98	8

1 Einleitung

1.1 Die Interferonfamilie

Zytokine sind Proteine, die als Botenstoffe zur Zell-Zell-Kommunikation beitragen und das Wachstum sowie die Funktion von Zellen regulieren können. Durch Bindung an für sie spezifische Rezeptoren lösen sie eine Signaltransduktion in der rezeptortragenden Zielzelle aus. Dies resultiert in der Aktivierung verschiedener Gene, die zur klinischen Wirkung der Zytokine beitragen. Zellen des Immunsystems, die in Kontakt mit einem Erreger gelangt sind, sezernieren Zytokine, zu denen auch Interferone gehören, mit dem Ziel, durch verschiedene Signalwege die Etablierung einer systemischen Infektion zu vermeiden.

Interferone (IFNs) werden aufgrund ihrer Struktur den Zytokinen der Klasse II zugeordnet [3]. Sie werden weiterhin in die Gruppen Interferon Typ I, II und III unterteilt [4]. Typ I Interferone wurden 1957 erstmals als antiviral wirkender Faktor beschrieben, der von einer zuvor mit einem abgeschwächten Virus behandelten Zelle produziert wurde [5, 6]. Die antivirale Eigenschaft, die als *"viral interference"* bezeichnet wurde, war ausschlaggebend für ihre Namensgebung und ist eine gemeinsame Eigenschaft aller Interferone [4-6]. Eine fehlerhafte oder ausbleibende Funktion von Typ I Interferonen führt zu einem lebensbedrohlichen Verlauf viraler Erkrankungen, wie sowohl Untersuchungen am Mausmodell als auch von mit SARS-Cov-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus type* 2) infizierten Patienten mit angeborener Interferon-Fehlfunktion zeigen [7, 8].

Zur Gruppe der Typ I Interferone gehören die beiden am besten untersuchten Vertreter IFNa und IFN β , sowie IFN ϵ , IFN κ und IFN ω [9]. Von IFN α existieren beim Menschen 13 Subtypen, von allen anderen Untergruppen der Typ I Interferone existiert beim Menschen nur je eine Variante [10, 11]. Die Vertreter der Typ I Interferone unterscheiden sich in der Synthese, die in verschiedenen Geweben erfolgt, ihrer Wirkung sowie in der Bindungsaffinität an die verschiedenen Untereinheiten ihres Rezeptors [3]. Obwohl alle Vertreter an die gleichen Rezeptoren binden (vgl. 1.2), können sie je nach Variante und Gewebe, in dem die Reaktion stattfindet, unterschiedliche biologische Effekte erzeugen [3, 11]. Während IFNα vor allem für die systemische antivirale Funktion der Interferone verantwortlich ist, werden IFNB hauptsächlich antiproliferative und immunmodulatorische Wirkungen zugeschrieben [11]. Sowohl IFNα als auch IFNβ können von fast allen kernhaltigen Körperzellen gebildet werden [4]. IFNk wird vor allem konstitutiv von Keratinozyten zur Abwehr viraler Infektionen von Haut und weiblichen Geschlechtsorganen ausgeschüttet [3, 12]. IFNe wird ebenfalls vom Epithel der Reproduktionsorgane sezerniert, wobei seine Sekretion durch Hormonausschüttung reguliert wird [13]. Neben der Beteiligung an der antiviralen Immunantwort haben Typ I Interferone ebenfalls bei der Immunabwehr nicht-viraler Infektionen sowie bei der körpereigenen Erkennung von Tumoren eine zentrale Funktion [3].

Zur Gruppe der Typ II Interferone zählt lediglich ein Genprodukt, welches zuerst 1965 entdeckt und später als IFNy bezeichnet wurde [14, 15]. Wie auch die Typ I Interferone, übt IFNy mit dem Ziel der Erregerbekämpfung Effekte sowohl auf die angeborene als auch auf die erworbene Immunantwort aus [16, 17]. Seine Sekretion erfolgt hauptsächlich durch *natural killer-* (NK-) und *natural killer T-cells* (NKT-Zellen) nach Aktivierung durch Zytokine oder durch Stimulation entsprechender Rezeptoren [16, 17]. Sowohl bei Typ I als auch bei Typ II Interferonen wurden neben den physiologischen Effekten Zusammenhänge mit Autoimmunerkrankungen, wie systemischem Lupus erythematodes, sowie eine ambivalente Rolle bei der Progression von Tumorgeschehen beschrieben [16]. Als Typ III Interferone werden IFNA1, IFNA2 und IFNA3 bezeichnet, deren Rezeptoren

hauptsächlich von Epithelzellen ausgebildet werden [3]. Da die Typ III Interferone nicht primärer Gegenstand dieser Dissertation sind, wird auf diese nicht näher eingegangen.



Abb. 1: Schematischer Aufbau der Interferonrezeptoren der Interferone Typ I bis III und deren Signaltransduktion (angelehnt an [4]).

Die Bindung der Typ I Interferone (IFN) an den Interferon α Rezeptor (IFNAR) 2 führt zur Rekrutierung von IFNAR1. Über Trans-Phosphorylierung werden die intrazellulären Kinasen TYK2 und JAK1 aktiviert. Diese phosphorylieren *signal transducers and activators of transcription* (STAT)1 und STAT2. Phosphoryliertes STAT1 (pSTAT1) und pSTAT2 bilden mit *interferon regulary factor* (IRF) 9 den *interferon stimulated gene factor* (ISGF)3 und dislozieren in den Zellkern. Dort agieren sie als Transkriptionsfaktor für *interferon stimulated response elements* (ISRE). Die Signaltransduktion der Typ III Interferone verläuft nach dem gleichen Muster. Neben der Formation des ISGF3 können ebenfalls phosphorylierte STAT1-Homodimere gebildet werden, die als *Interferon \gamma activated factor* (GAF) *Interferon \gamma activated sites* (GAS) im Zellkern aktivieren. Auch die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)/c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) Signalwege ist nach Rezeptoraktivierung durch Typ I Interferone möglich. Die Bindung von Typ II Interferon an den Interferon γ Rezeptor (IFNGR) führt zur Phosphorylierung der Kinasen JAK1 und JAK2. Diese phosphorylieren STAT1, welches als Homodimer den GAF-Komplex bildet und im Zellkern GAS aktiviert. Auch der ISGF3 wird, wenn auch schwach, durch die Bindung von Typ II Interferonen an den IFNGR aktiviert. (zusammengefasst in [4])

Die drei Interferon-Typen unterscheiden sich sowohl in ihrer Expression als auch im strukturellen Aufbau sowie in der durch sie initiierten Signaltransduktion. Alle Typ I Interferone binden auto- und parakrin an den IFNα Rezeptor (IFNAR), der aus zwei Rezeptoruntereinheiten, IFNAR1 und IFNAR2, besteht und auf beinahe allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird [3, 4, 18]. Seine Untereinheiten setzen sich aus einer extrazellulären und einer intrazellulären

Domäne zusammen, die über eine Transmembranhelix miteinander verbunden sind [11]. Nachdem ein Typ I Interferon mit hoher Affinität an die IFNAR2-Untereinheit gebunden hat, wird die IFNAR1-Untereinheit rekrutiert, deren Bindungsaffinität zu dem Liganden i.d.R. niedriger ist [3]. Die Affinität der Bindung beider Untereinheiten ist abhängig vom Subtyp der Typ I Interferone – im Gegensatz zu z.B. murinem IFN α , wurde bei murinem IFN β eine Bindung mit hoher Affinität an die murine IFNAR1-Untereinheit (mIFNAR1) nachgewiesen und so unabhängig von der mIFNAR2-Untereinheit eine Signaltransduktion ausgelöst [19, 20]. Humanes IFNκ und ε bindet hingegen mit einer insgesamt schwächeren Affinität als IFNα an die humane IFNAR2-Untereinheit (hIFNAR2) [3, 21]. Untersuchungen zur Bindungsaffinität der Typ I Interferone an ihren Rezeptor zeigen, dass unterschiedliche Bindungsaffinitäten in verschiedenen biologischen Wirkungen resultieren [22, 23]. Die intrazellulären Anteile des Rezeptors sind konstitutiv mit den Januskinasen Tyrosinkinase 2 (TYK2) (IFNAR1) [24, 25] und Januskinase 1 (JAK1) (IFNAR2) assoziiert [26, 27]. Durch Trans-Phosphorylierung werden die jeweiligen Rezeptoruntereinheiten aktiviert und die signal transducers and activators of transcription (STAT) 1 bzw. STAT2 phosphoryliert. STAT2 ist hierbei konstitutiv an die IFNAR2-Untereinheit gebunden, während STAT1 erst durch die Heterodimerisierung mit STAT2 an IFNAR2 bindet [28-30]. Die phosphorylierten STAT-Proteine komplexieren mit dem interferon regulatory factor (IRF)9 zum interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3) [4]. ISGF3 transloziert in den Zellkern, wo er als Transkriptionsfaktor zahlreicher interferon stimulated genes (ISGs) fungiert [4]. Diese codieren unter anderem für antivirale Proteine oder Transkriptionsfaktoren [17]. In Abwesenheit von STAT2 bzw. STAT1 kann die Signaltransduktion auch über alternative Signalkomplexe wie z.B. einen STAT1-STAT1-IRF1 bzw. STAT2-IRF9-Komplex stattfinden [31]. Neben der Aktivierung von STAT1 und STAT2 können Typ I Interferone ebenfalls eine Aktivierung von STAT3 Proteinen induzieren. Dies kann einerseits zur negativen Regulation von STAT1-Aktivierung, aber auch zur Induktion von verschiedenen ISGs führen [3].

Der Rezeptor der Typ III Interferone ist dem der Typ I Interferone strukturell ähnlich: Er besteht ebenfalls aus zwei Untereinheiten, hier IFN λ Rezeptor 1 (IFNLR1) und Interleukin 10 Rezeptor 2 (IL-10R2), wird jedoch hauptsächlich auf Epithelzellen sowie auf einigen Immunzellen, z.B. neutrophilen Granulozyten, exprimiert (zusammengefasst in [4], [3]). Typ III Interferone binden mit hoher Affinität an den spezifischeren IFNLR1, woraufhin der weniger spezifische IL-10R2 zum Rezeptorkomplex rekrutiert wird. Letzterer dient ebenfalls als Untereinheit verschiedener anderer Rezeptorkomplexe der IL-10 Familie [3]. Die Signaltransduktion der Typ III Interferone nicht primärer Gegenstand dieser Dissertation sind, werden diese hier nicht näher erläutert.

Der IFNy Rezeptor (IFNGR), der Rezeptor der Typ II Interferone, ist ein Tetramer und besteht aus je zwei der Rezeptoruntereinheiten IFNGR1 und IFNGR2. [32]. Der IFNGR wird, mit Ausnahme von Erythrozyten, auf nahezu allen Körperzellen ausgebildet [16]. Hierbei werden die Untereinheiten IFNGR1 konstitutiv exprimiert, während die Expression der IFNGR2 Untereinheiten vom Differenzierungsgrad der jeweiligen Zellen abhängig ist [16]. Vermittelt durch den als Homodimer vorliegenden Liganden IFNy assoziieren die Rezeptoruntereinheiten [33]. Intrazellulär ist der Rezeptor mit JAK1 und 2 assoziiert [17]. Bei Aktivierung des Rezeptors durch den Liganden wird STAT1 nach Tyrosin-Phosphorylierung des intrazellulären Rezeptoranteils durch die zuvor reziprok phosphorylierten Januskinasen aktiviert. Das phosphorylierte STAT1 (pSTAT1) löst sich vom Rezeptor und formiert ein Homodimer, genannt *interferon* γ *activated factor* (GAF) [4]. Dieser transloziert in den Zellkern, bindet dort die *interferon* γ *activated site* (GAS) und aktiviert so ebenfalls ISGs, die für Chemokine und Transkriptionsfaktoren wie IRFs codieren (zusammengefasst in [17]). Je nach Zelltyp, in dem die Signalkaskade stattgefunden hat, werden verschiedene Zielgene aktiviert [16]. Einen Überblick über die verschiedenen Rezeptortypen und die intrazelluläre Signalkaskade bietet Abb. 1.

1.3 Ausschüttung der Interferone

Die Ausschüttung der Typ I Interferone erfolgt charakteristischerweise in zwei so genannten Wellen [3]: Pathogene Erreger besitzen für bestimmte Erregergruppen charakteristische molekulare Strukturen, so genannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs). Hierzu gehören z.B. Lipopolysaccharide (LPS), die ein Bestandteil der Oberfläche gramnegativer Bakterien sind. Gelangen diese in Kontakt mit menschlichen Zellen, können sie von *pathogen-recognizing-receptors* (PRRs), wie *Toll-like-receptors* (TLRs), oder anderen membranständigen, endosomalen oder zytosolischen Sensoren, wie *retinoic acid-inducible gene I* (RIG-I) oder Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptoren, detektiert werden [17, 34, 35]. Hierdurch kann eine Signalkaskade initiiert werden, die unter anderem in der Aktivierung von IRF3 und der Ausschüttung von IFNβ, der ersten Welle der Interferonfreisetzung, resultiert [3] (siehe Abb. 2).





Erkennen *pathogen-recognizing-receptors* (PRRs), wie *Toll-like-receptors* (TLRs) oder *RIG-I-like* Rezeptoren (RLRs), die charakteristischen Merkmale einer viralen Infektion der Zelle, kommt es zur Aktivierung der *interferon regulatory factors* (IRFs) 3 und 7. Gemeinsam mit *nuclear factor* (NF)-κB initiieren diese im Zellkern die Expression von IFNβ. Infolgedessen wird IFNβ von der infizierten Zelle sezerniert und bindet an die Typ-I IFN-Rezeptoren uninfizierter Zellen, um die IFN-Signalkaskade (siehe Abb. 1) auszulösen. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erzeugt. Modifiziert nach [3].

IFNβ stimuliert die Transkription weiterer ISGs, unter anderem die von IRF7, dessen Aktivierung zur Synthese und Freisetzung weiterer Subtypen der Typ I Interferone, der so genannten zweiten Welle der Interferonausschüttung, führt [3]. Die direkte Aktivierung von IRF5 und IRF7

sowie die Erkennung pathogener Muster durch dendritische Zellen können ebenfalls eine Signalkaskade induzieren, die zur Transkription von Typ I Interferon-Genen führt [36] [17, 37, 38]. Auch körpereigene, beschädigte Zellen können endogene Moleküle produzieren und sezernieren, die als Liganden der PRRs fungieren und als so genannte *damage associated molecular patterns* (DAMPs) ebenfalls eine Initiation der Signaltransduktion bewirken [39]. Infolgedessen entsteht eine sterile Entzündung, welche wichtig für die Zellreparatur ist, jedoch auch mit der Entwicklung entzündlicher Erkrankungen, wie z.B. Autoimmunerkrankungen oder auch Krebs, assoziiert wird (vgl. Punkt 1.4.4) [17, 39].

Die Produktion von IFNγ wird nach Detektion von Zytokinen wie IL-12 und IL-18 oder nach Stimulation von Antigenrezeptoren vor allem von Immunzellen, wie NK-Zellen, T-Zellen und adaptiven Zellen, wie *cluster of differenciation* 4⁺ (CD4⁺) oder CD8⁺ T-Zellen produziert (zusammengefasst in [40]). Hierbei können NK-Zellen sowohl über die die NK-Zellen aktivierenden Rezeptoren als auch durch Zytokine zur IFNγ-Sekretion stimuliert werden [16]. Die Zytokin-gesteuerte Stimulation wird z.B. durch IL-12 oder IL-18 ausgelöst, das von Makrophagen in einem frühen Stadium der Infektion produziert wird [41, 42]. IL-12 bindet an seinen Rezeptor auf NK-Zellen und aktiviert STAT4 und NF-κB, die die Synthese von IFNγ initiieren [16, 17].

1.4 Physiologische und pathophysiologische Wirkung der Interferone

Die nach Bindung der Interferone an ihren Rezeptor aktivierten ISGs erzeugen vielfältige Effekte. Diese lassen sich grob in antivirale, immunmodulatorische sowie anti-Tumor-Aktivitäten einteilen und werden im weiteren Verlauf näher erläutert. Negative *feedback*-Mechanismen sorgen für eine Auflösung des durch die IFNs ausgelösten Zustandes. Schlagen diese fehl, kann dies zur Entstehung von Pathologien, wie Autoimmunerkrankungen, so genannten Interferonopathien, oder zur Progression von Tumorgeschehen beitragen.

1.4.1 Antiviral

Die durch ISGs exprimierten antiviralen Proteine setzen an verschiedenen Stadien des viralen Vermehrungszyklus an und verhindern so beispielsweise die virale Transkription oder den Eintritt des Virus in die Wirtszelle [43, 44]. Während einige antiviralen Proteine ein sehr breites Wirkspektrum haben, sind andere nur gegen wenige Erreger wirksam [45]. Viperin (*virus inhibitory protein, endoplasmatic reticulum associated, interferon inducible*) wird nach Aktivierung sowohl der Typ I als auch der Typ III IFN-Signalkaskade exprimiert [46-48]. Neben vielfältigen weiteren Funktionen inhibiert es sowohl die Replikation einiger Flaviviren (z.B. Hepatitis-C-Virus (HCV)) als auch die Freisetzung von behüllten Viren (z.B. Influenza A Virus) aus der Wirtszelle [49, 50]. Weitere antiviral wirksame Proteine sind beispielsweise *Myxovirus resistance protein* 1 und 2 (Mx1 und 2), Cholesterol-25-hydroxylase (CH25H), *IFN-inducible transmembrane* (IFITM) Proteine, *tripartite motif* (TRIM) Proteine, oder Tetherin, deren Wirkweise im Detail im Review von Schneider et al. ausgeführt ist [44]

1.4.2 Immunmodulatorisch

Die Ausschüttung der Typ I Interferone führt, neben der Expression von direkt antiviral wirkenden Proteinen, zu weiteren immunmodulatorischen Effekten, die der Abwehr viraler Infektionen dienen. Ein Beispiel hierfür ist die Expression von Proteinen wie z.B. PRRs zur sensitiveren Detektion von pathogenen molekularen Mustern und IRFs zur Modulation der weiteren IFN-Ausschüttung, die ebenfalls von ISGs codiert werden [44]. Diese Proteine liegen zum Teil bereits vor der IFN-Stimulation in geringen Mengen in der Zelle vor, ihre Genexpression wird durch die IFN-Ausschüttung zusätzlich gesteigert [44].

Typ I Interferone tragen neben der angeborenen außerdem zur erworbenen Immunität bei. Das T-Zell *priming* wird beispielsweise sowohl direkt, durch verschiedene STAT-Effektorproteine der Interferon-Signalkaskade, als auch indirekt, durch Stimulation und Expressionsinduktion von Co-stimulatorischen Molekülen oder *major histocompatibility complexes* I und II (MHCI-/II), von Interferonen beeinflusst [3]. Zudem resultiert die Induktion von Chemokin- und Zytokinbildung dendritischer Zellen und die somit gesteigerte Antigenpräsentation in einer höheren Überlebens- und Proliferationsrate der T-Zellen [3]. Des Weiteren nehmen die Typ I Interferone Einfluss auf den Klassenwechsel der Immunglobulin (Ig)-Moleküle durch gesteigerte Expression B-Zell-stimulierender Zytokine und proliferationsinduzierender Liganden von dendritischen Zellen [3].

Das Typ II Interferon übt ebenfalls eine immunmodulatorische Wirkung sowohl auf die angeborene als auch auf die erworbene Immunität aus. IFNy als wichtiger Aktivator von Makrophagen steigert die Synthese proinflammatorischer Zytokine, die Antigen-Präsentation und Phagozytose, sowie die Zytotoxizität gegenüber Bakterien und Tumoren [51]. Durch die Aktivierung der Makrophagen kommt es außerdem zu einer Sekretion von Interleukin-12 (IL-12), wodurch erneut IFNy ausgeschüttet wird (vgl. Punkt 1.3) und ein positiver Feedback-Dessen Resultat Mechanismus entsteht. ist eine spezifische extrazelluläre Zytokinzusammensetzung, welche zu einer lokal gesteigerten Immunantwort von T-Helfer-Zellen führt [16]. In antigenpräsentierenden Zellen wird durch IFNy ebenfalls die Expression von MHC-I und II sowie die der transporters associated with antigen processing (TAP) 1 und 2 erhöht und so die Effizienz der Antigenpräsentation gesteigert [16, 52]. Abschließend spielt IFNy ebenfalls eine wichtige Rolle beim Klassenwechsel der Ig-Moleküle, der Proliferation von B-Zellen sowie der Entstehung von CD4⁺ T-Helferzellen und führt zu einer erhöhten zytotoxischen Wirksamkeit und Proliferationsregulation von CD8⁺ T-Zellen (zusammengefasst in [16])

1.4.3 Anti- und prokanzerogene Effekte

Typ I Interferone unterbrechen den Zellzyklus von Tumoren und sorgen für die Einleitung einer Apoptose. So wurde beispielsweise bei Zervixkarzinomen ein Interferon-induzierter Proliferationsstopp der Karzinomzellen und bei Mammakarzinom- sowie Melanomzellen eine Interferon-induzierte Apoptose beobachtet [53-55]. Durch Stimulation von Immunzellen üben Typ I Interferone sowohl durch eine Immunantwort gegen Tumor-assoziierte Antigene als auch durch Verhinderung von Metastasenbildung eine antiproliferative Wirkung aus (zusammengefasst in [3]). Typ II Interferone nehmen im Rahmen der Tumorbekämpfung eine ambivalente Rolle ein, da sie sowohl zytotoxische Aktivität auf Tumorzellen ausüben als auch prokanzerogene Effekte fördern können [56]. Maßgeblich ist dies durch Dauer und Intensität der IFNγ-Signalgebung bedingt [56]. Zunächst steigert die IFNγ antikanzerogene Effekte durch verstärkte Antigenpräsentation durch MHC I und II Moleküle sowie T-Zell *priming*-Aktivierung und Tumorzelltoxizität durch FAS und FAS-Liganden [56]. Bei verlängerter Stimulation von Zellen durch IFNγ zeigt sich jedoch eine prokanzerogene Wirkung, die beispielsweise in Immunsuppression, Angiogenese und Tumorzellproliferation resultieren kann [57].

1.4.4 Autoimmunerkrankungen und Interferonopathien

Wenngleich die genaue Regulation einer basalen IFN-Aktivität noch nicht vollständig verstanden ist, scheint diese sowohl bei Typ I als auch bei Typ II Interferonen für die physiologischen Körperfunktionen unerlässlich zu sein [17]. Kommt es jedoch beispielsweise durch Genmutationen zu einer verstärkten oder überschießenden Aktivität von Typ I IFN, können Autoimmunerkrankungen und klinische Manifestationen sogenannter Interferonopathien, wie chronic atypical neutrophilic dermatosis with lipodystrophy and elevated temperatures (CANDLE), stimulator of interferon genes (STING)-associated vasculopathy with onset in infancy (SAVI) oder das Aicardi-Goutières-Syndrom (AGS), entstehen [58, 59]. Der erste potentielle Zusammenhang von Autoimmunerkrankungen und Typ I Interferonen wurde 1969 im Zusammenhang mit dem systemischen Lupus erythematodes (SLE) beschrieben [60]. Weitere Studien zeigten, dass vermutlich durch IFNa induzierte Gene besonders bei Patienten mit schwerem Erkrankungsverlauf deutlich stärker exprimiert wurden [61, 62]. Erhöhte Level von Typ I Interferonen wurden durch weitere Arbeitsgruppen ebenfalls bei Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen, wie rheumatoider Arthritis oder dem Sjögren-Syndrom, nachgewiesen [17, 34]. Eine Dysregulation von Typ II Interferonen wurde auch bei Autoimmunerkrankungen gefunden. So zeigen beispielsweise an systemisch juveniler ideopathischer Arthritis (SJIA) erkrankte Patienten, die ein Makrophagenaktivierungssyndrom (MAS) ausbilden, eine erhöhte IFNy-Aktivität [42, 58, 63].

1.5 Klinischer Einsatz von Interferonen

Typ I Interferone fanden lange Zeit Anwendung in der Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten, wurden aber in einigen Fällen aufgrund starker Nebenwirkungen, die häufig zum Therapieabbruch führten, bzw. zugunsten besserer Behandlungsalternativen abgelöst. In der Krebstherapie führten Behandlungen mit IFNα z.B. bei Brustkrebs, Nierenzellkarzinomen und besonders bei Melanomen zu einer verlängerten Überlebensrate [3, 64]. Da jedoch häufig Nebenwirkungen auftraten, eine systemische Gabe von Typ I Interferonen oftmals nicht gut toleriert wurde und die Gabe nicht bei allen untersuchten Krebsarten einen positiven Effekt zeigte, wird diese Therapieform nur noch selten eingesetzt [3]. Bei der Behandlung viraler Erkrankungen, wie SARS-CoV-2-Infektionen [65, 66], Hepatitis B, C oder Hepatitis D, findet IFNα ebenfalls Anwendung [67]. Aufgrund starker Nebenwirkungen und besseren vorliegenden Behandlungsalternativen, z.B. durch *direct antiviral agents* (DAA) im Falle der Hepatitis C, sind sie inzwischen zur Behandlung von Letzteren nicht immer das Mittel der ersten Wahl [3, 67, 68]. IFNβ wird bei an Multipler Sklerose (MS) erkrankten Patienten bei schubweisem Verlauf

der Erkrankung als Medikament mit dem Ziel eingesetzt, die Häufigkeit der Schübe zu reduzieren und das Fortschreiten der Erkrankung zu verzögern [69].

1.6 Die synthetischen Zytokinrezeptoren (SyCyRs)

Zur hintergrundfreien Analyse der Signaltransduktion von Interferonrezeptoren wurden in dieser Arbeit synthetische Interferonrezeptoren verwendet. Extrazellulär gelegene, gegen *green fluorescent Protein* (GFP) und *monomeric Cherry* (mCherry) gerichtete *nanobodies* [70, 71] wurden mit der Transmembran- und intrazellulären Domäne eines Wildtyprezeptors sowie einem aus 15 Aminosäuren bestehenden Fragment der extrazellulären Rezeptordomäne fusioniert [1, 72, 73]. Die Struktur der in dieser Arbeit verwendeten *synthetic cytokine receptors* (SyCyRs) wurde 2018 in der Arbeitsgruppe von Prof. Scheller in Düsseldorf entwickelt und bereits auf IL-6, IL-23, TNF α , IL-22 und Fas angewandt [1, 72, 73]. Auch bei murinen Typ I IFNs wurden die SyCyRs bereits eingesetzt, wonach deren Signaltransduktion *in vitro* und biologische Aktivität *in vivo* eine hohe Homologie mit denen des mit IFN α 4 stimulierten Wildtyprezeptors zeigten [2]

GFP und mCherry sind fluoreszierende Proteine. GFP wurde erstmals 1962 aus der Qualle *Aequorea victoria* gewonnen [74]. Um seine Eigenschaften zu modifizieren, beispielsweise die Fluroeszenz zu erhöhen (*enhanced* GFP, EGFP), oder eine Bildung von Dimeren und Oligomeren zu verhindern (A206K GFP), wurde das grün fluoreszierende, synthetische Protein in verschiedenen Arbeiten nachträglich verändert [75, 76]. Das rot fluoreszierende mCherry wurde 2004 als eine Modifikation des aus Scheibenanemonen (Discosoma sp.) gewonnenen DsRed entwickelt und gehört zur Gruppe *monomeric red fluorescent proteins* (mRFP) [1, 77].

Nanobodies sind die variable, antigenbindende Domäne (variable heavy chain domain, VHH) von heavy-chain-only-Antikörper (HcAbs), welche 1993 in Kameliden entdeckt wurden [78]. Sie bestehen, anders als humane Antikörper (AK), nur aus schweren Ketten und der variablen, antigenbindende Domäne VHH, auch nanobody genannt, welche auch in isolierter Form weiterhin Antigene detektieren kann (siehe Abb. 3) [78]. Nanobodies kommen außer in Kameliden (VHH) ebenfalls in Knorpelfischen (varbiable new anatigen receptor (VNAR)) vor und können gegen zahlreiche targets, wie Bakterien oder Zytokine, sowie gegen fluoreszierende Proteine, wie *GFP* und *mCherry*, gerichtet generiert werden [70, 79]. Außerdem zeigen sie eine geringe Molekülmasse, welche ihnen eine hohe Gewebspenetration ermöglicht sowie eine hohe Stabilität und Affinität (zusammengefasst in [80]).



Abb. 3: Aufbau eines humanen Immunglobulin (Ig)G-Antikörpers (A), eines cameliden *heavy-chain-only*-Antikörpers (B) und eines synthetischen Zytokinrezeptors (SyCyR) (C).

(A) Humanes IgG besteht aus zwei schweren Ketten (blau) sowie zwei leichten Ketten (grün). Die variablen Domänen der schweren (variable heavy chain domain, VH) und die der leichten Ketten (variable light chain domain, VL) bilden die Antigenbindungsstellen. Die variablen Domänen bilden mit je einer konstanten Domäne (constant light chain domain, CL und constant heavy chain domain 1, CH1) das Antigen-bindende Fragment Fab (fragment for antigen binding). Je zwei konstante Domänen der schweren Ketten (CH2 und CH3) sind über Disulfidbrücken mit dem Fab-Fragment verbunden und bilden das Fc-Fragment (fragment crystallizable), welches mit Effektorzellen bzw. Effektormolekülen interagieren kann. (B) Camelide heavy-chain-only-Antikörper bestehen aus zwei schweren Ketten (CH2, CH3), die mit je einer variablen, antigenbindenden Domäne (VHH) verbunden sind. Diese variable Domäne wird auch als nanobody bezeichnet. (C) Der extrazelluläre Anteil des SyCyRs wird hauptsächlich aus nanobodies gebildet, die gegen die fluoreszierenden Proteine GFP (grün) und mCherry (rot) gerichtet sind, während wenige Aminosäuren der extrazellulären Domäne, die vollständige Transmembrandomäne und die intrazelluläre Rezeptordomäne denen des jeweiligen Wildtyprezeptors entsprechen. Mit BioRender.com erstellt.

Aufgrund der zahlreichen Vorteile der *nanobodies* gegenüber monoklonalen Antikörpern werden vermehrt klinische Studien zu deren Anwendbarkeit in Diagnostik und Therapie bestimmter Erkrankungen durchgeführt [81]. Ein Beispiel hierfür sind Studien zu *nanobodies*, die gegen den *human epidermal growth factor receptor* (HER2) gerichtet sind, um Brustkrebs zu detektieren und zu therapieren [82, 83]. Für die Therapie der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura wurde der *nanobody* Caplacizumab 2018 durch die *european medicines agency* (EMA) sowie 2019 durch die *food and drug administration* (FDA) zugelassen [84].

Ziel der Arbeiten zu den SyCyRs war es, ein System von synthetischen Zytokinrezeptoren zu schaffen, das einerseits hintergrundfrei aktivierbar ist, sowie andererseits auch eine Kontrolle darüber bietet, ob sich die Rezeptoruntereinheiten als Homo- bzw. Heterodimere etc. anordnen [1]. Die Ergebnisse von Engelowski et al. zeigten, dass die Signalkaskade der so geschaffenen synthetischen Rezeptoren nach Stimulation mit synthetischen Liganden *in vitro* und *in vivo* vergleichbar mit der Signalkaskade von Wildtyprezeptor und Wildtyp-Ligand war [1]. Durch das System von synthetischen Zytokinrezeptoren mit den oben genannten Eigenschaften können laut Engelowski et al. die biochemischen Eigenschaften verschiedener Rezeptoren besser untersucht werden [1]. Außerdem könnten die synthetischen Zytokinrezeptoren einen Grundstein für die Entwicklung zukünftiger, auf synthetischen Liganden basierender, Therapien bilden [1]. Für die synthetischen Interferonrezeptoren in dieser Arbeit wurde das gleiche Konstruktionsprinzip verwendet. Die Transmembran- und intrazelluläre Domäne sowie wenige Aminosäuren der Extrazellulären Domäne der Rezeptoren entsprechen dem jeweiligen untersuchten Wildtyprezeptor. Extrazellulär dienen *nanobodies* als Detektoren für die synthetischen Liganden [1].

1.7 Ziele der Arbeit

Das System der synthetischen Zytokinrezeptoren erlaubt eine hintergrundfreie Analyse der intrazellulären Signaltransduktion von Zytokinen und ermöglicht außerdem eine individuell steuerbare Zusammensetzung der Rezeptoruntereinheiten. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Anwendbarkeit des für IL-23 bereits erprobten Konzeptes der synthetischen Zytokinrezeptoren auf die Rezeptoren der Typ I und Typ II Interferone zu überprüfen. Hierzu wurden synthetische Typ I und Typ II Interferonrezeptoren entwickelt, deren extrazelluläre Domäne nahezu vollständig durch nanobodies, die gegen GFP und mCherry gerichtet sind, ersetzt wurde. Es ist bekannt, dass die Modifikation extrazellulärer Gegebenheiten, wie z.B. Mutationen des Liganden, zu einer Abweichung der intrazellulären Signalkaskade von der des Wildtyps führen kann [85]. Daher wurden zunächst die für die Signalkaskade charakteristischen STAT-Proteine, nach Stimulation von Wildtyp- und synthetischen Interferonrezeptoren durch ihren jeweiligen Liganden, im Western Blot analysiert und verglichen. Als Zellmodelle zur Untersuchung der Expression und Signaltransduktion der synthetischen Rezeptoren wurden Ba/F3-gp130, HEK293 und HEK293T Zellen verwendet. Weitere Fragestellungen befassten sich mit der Bedeutung der einzelnen Rezeptoruntereinheiten für die Signaltransduktion und mit der Funktionsfähigkeit von Rezeptor-Homodimeren, die durch Stimulation mit entsprechenden untersucht werden konnten. Abschließend synthetischen Liganden wurde die Signaltransduktion verschiedener Mutationsvarianten des synthetischen mIFNAR untersucht, um die Bedeutung der intrazellulären Tyrosine für die Signaltransduktion näher zu beleuchten, da diese in der Literatur bisher noch nicht vollständig geklärt ist [86-92].

Mit der Etablierung der *SyCyRs* für die Interferon-Signaltransduktion soll eine Grundlage für ein besseres Verständnis der Details des komplexen Interfon-*signaling* geschaffen werden, damit hierdurch der Weg für die Entwicklung von gezielteren, nebenwirkungsärmeren Interferonbasierten Therapien viraler oder onkologischer Erkrankungen geebnet werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Antibiotika

Die im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Antibiotika sind in Tabelle 1 gelistet.

Tabelle 1: Antibiotika

Antibiotikum	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O _{dd}	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{dd}	50 μg/ml
Penicillin G	10000 U/ml	100 U/ml
Streptomycin	10 mg/ml	100 µg/ml
Puromycin (puro)	1 mg/ml	1,5 μg/ml

2.1.2 Antikörper

Alle im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Antikörper

Antikörper	Ursprung	Stamm- konzentration	Verdünnungen	Hersteller	Bestell- nummer
Primärantikörpe	er				
α-HA (C29F4)	Kaninchen	k.A	1:1000	Cell Signaling Technology	#3724
α-myc (71D10)	Kaninchen	k.A.	1:1000	Cell Signaling Technology	#2278
α-STAT1	Kaninchen	k.A.	1:1000	Cell Signaling Technology	#9172
α-pSTAT1 (Y701) (58D6)	Kaninchen	k.A.	1:1000	Cell Signaling Technology	#9167
α-STAT2 (D9J7L)	Kaninchen	k.A.	1:1000	Cell Signaling Technology	#72604
α-pSTAT2 (Tyr690) (D3P2P)	Kaninchen	k.A.	1:1000	Cell Signaling Technology	#88410
α-STAT3 (124H6)	Maus	k.A.	1:1000	Cell Signaling Technology	#9139
α-pSTAT3 (Tyr705) (D3A7) XP	Kaninchen	k.A.	1:2000	Cell Signaling Technology	#9145

Antikörper	Ursprung	Stamm- konzentration	Verdünnungen	Hersteller	Bestell- nummer
α-STAT5 (D206Y)	Kaninchen	k.A.	1:1000	Cell Signaling Technology	#94205
α-pSTAT5 (Tyr694) (C11C5)	Kaninchen	k.A.	1:1000	Cell Signaling Technology	#9359
Sekundärantikörper					
α-mouse IgG HRP konjugiert	Ziege	0,4 mg/ml	1:2000	Thermo Waltham, USA	Scientific,
α-rabbit IgG HRP konjugiert	Ziege	0,4 mg/ml	1:2000	Thermo Waltham USA	Scientific,

2.1.3 Chemikalien

Die in dieser Doktorarbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller
Acrylamid-Mix 30% (Rotiphorese- Gel A)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Standard-Agarose	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxisulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Pierce [™] BCA [™] Reagent A	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pierce [™] BCA [™] Reagent B	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
BSA	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
GeneRuler Express DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
GeneRuler [™] DNA-Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
HDGreen Plus	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver Blotting Grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TurboFect Transfektionsreagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Substanz	Hersteller
PageRuler TM Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.1.4 Enzyme

Alle in dieser Arbeit für molekularbiologische Methoden verwendeten Enzyme stammten von der Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA.

2.1.5 Geräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 4 gelistet.

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	
Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
CO ₂ -Inkubator C 170	Binder, Tuttlingen, Deutschland	
BD FACSCanto™ II Cell Analyzer	BD Biosciences, California, USA	
ECL Chemo Cam Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland	
Wärmebad Aqualine AL 25	LAUDA-Brinkmann, New-Jersey, USA	
TC 20 [™] Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland	
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
Primovert Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland	
Laborfuge 400R Function Line	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland	
Platten-Reader Infinite [®] M200 PRO	Tecan, Männedorf, Schweiz	
Geldokumentationssystem	Intas Science Imaging Instruments GmBH, Göttingen, Deutschland	
Inkubator	Binder	
Inkubator 1000 & Titramax 1000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland	
Inkubator Midi	GFL (Gesellschaft für Labortechnik), Burgwedel, Deutschland	
Inkubator BD 400	Binder, Tuttlingen, Deutschland	
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
Kühlzentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	
Minizentrifuge	neoLab, Berlin, Deutschland	
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	
PCR Thermozykler peqStar	Peqlab, Erlangen, Deutschland	
Power Pac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland	

Gerät	Hersteller
Power Pac HC	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Präzisionswaage D6010	neoLab, Berlin, Deutschland
Pumpe für die Sterilbank	HCL Biotech, Göttingen, Deutschland
Präzisionswaage EMB 2000.2	Kern, Balingen-Frommern, Deutschland
Rollenmischer Intell-Mixer	neoLab, Berlin, Deutschland
Rollenmischer RM5 30V	Cat, Ballrechten-Dottingen, Deutschland
Spannungsquelle Power Pac™ Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Sterilbank ScanLaf Mars Safety Class 2	LaboGene, Allerød, Dänemark
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot Turbo™	Rie Red Laboratories Crably Foldbirghan, Doutschland
Transfersystem	BIO-Rad Laboratories Gribh, Feldkirchen, Deutschland
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland
Waage D6010	neoLab, Berlin, Deutschland
Waage EMB 2000-2	Kern, Balingen-Frommern, Deutschland

2.1.6 Kits

Die für die Durchführung der Doktorarbeit benötigten Kits sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Kits

Kits	Hersteller
NucleoSpin Gel & PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Genejet Miniprep Plasmid Scientific Kit	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
ECL Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
NucleoBond Xtra Midi kit for transfection-grade plasmid DNA	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

2.1.7 Medien

Alle in der Arbeit verwendeten Medien sind in Tabelle 6 gelistet.

Tabelle 6: Medien

Medium	Hersteller	Zusammensetzung
DMEM (Dulbecco's	Thermo Fisher Scientific Life	Thermo Fisher Scientific,
Modified Eagle Medium)	Technologies GmbH,	Waltham, Massachusetts,
-/-	Darmstadt, Deutschland	USA
DMEM (Dulbecco's	Thermo Fisher Scientific Life	DMEM
Modified Eagle Medium)	Technologies GmbH,	10% fetales Kälberserum
+/+	Darmstadt, Deutschland	(FCS)

Medium	Hersteller	Zusammensetzung
		Jeweils 1% Penicillin und Streptomycin
LB-Medium (Lysogeny- Broth, Luria/Miller)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	0,5% Hefeextrakt 1% NaCl 1% Trypton 100 μg/ml Ampicillin (Carl Roth)
LB-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	1,5% Agar-Agar 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl 1% Trypton 200 μg/mL Ampicillin (Carl Roth)

2.1.8 Oligonukleotide

Für die Sequenzierreaktionen und Amplifikationen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) mittels PCR wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Die Schmelztemperatur (T_m) wurde von Eurofins Genomics angegeben.

Tabelle 7:	Verwendete	Oligonukleotide
------------	------------	-----------------

Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	Tm
DF17	pcDNA3.1 rev	AGGCACAGTCGAGGCTG	57,0°C
DF38	pCR-Script fwd1	TGCTGCAAGGCGATTAAG	54,0°C
DF39	pCR-Script rev1	ATGCTTCCGGCTCGTATG	56,0°C
DF82	5' pcDNA3.1	GACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGC	68,0°C
DF85	5' pMOWS	AGCCCTTTGTACACCCTAAGC	61,0°C
DF86	3' pMOWS	AGCAATAGCATGATACAAAGG	55,0°C
DF403	SP_pF1	ACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTA	70,7°C
DF604	mIFNAR2-RP	CGATAGCGCTCTCGGACAGGC	65,7°C
DF605	mIFNAR2-FP	CAGCCTGGCCAGGAGAGCG	65,3°C
DF661	IFNAR2-Y510F-B	GATGTGGGCGATGGCTTCATCATGAGAAAGCTTA	69,5°C
DF676	hIFNGR1-EcoRI-FP	GACGAATTCAGCAAAGAAGTGTGCATCACCATC	68,2°C
DF677	hIFNGR1-HindIII-RP	GACAAGCTTGCTGAACTCTTTGCTGTCCTCG	69,5°C
DF678	hIFNGR2-XhoI-FP	GACCTCGAGAGCTGCTACGAGACAATGGC	70,9°C
DF679	hIFNGR2-NotI-RP	GACGCGGCCGCTCACAGGGTCTGCAGCACGTC	>75,0°C
DF680	hIFNGR2-RP	GTTAGGGAAGGGCCAGGCCA	63,1°C
DF681	hIFNGR1-FP	GAGCCCTGCTACAGTGCCTG	63,5°C
DF682	hIFNAR2-RP	GTTAGGGAAGGGCCAGGCCA	63,5°C
DF707	IFNAR1-V459 A-A	GGGGAGGGAAACACGCGTGGCACAGGTAC	73,7°C
DF708	IFNAR1-V459 A-B	GTACCTGTGCCACGCGTGTTTCCCTCCCC	73,7°C

2.1.9 Plasmide

Für den experimentellen Abschnitt der Arbeit wurden verschiedene Plasmide verwendet. Diese sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Plasmide

Plasmid	Referenz	Bakterieller Selektionsmarker
pCR-Script	Thermo Fisher Scientific (GeneART)	Ampicillin
pEGFP	Clontech	Kanamycin
pcDNA3.1-Flag-HmIL-23	Floss <i>et al.</i> (2013)	Ampicillin, Neomycin
pBS (pBluescript)	BioCat	Ampicillin
pMOWS-puro-GFP	Ketteler <i>et al.</i> 2010	Ampicillin
pcDNA3.1-mCherry-VHH-mIFNAR2-2A-GFP- VHH-mIFNAR1-IFNAR1 Y455F	Arbeitsgruppe von Prof. Scheller (AG Scheller)	Ampicillin
pcDNA3.1-mCherry-VHH-mIFNAR2-2A-GFP- VHH-mIFNAR1-IFNAR1 Y518F	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-mCherry-VHH-mIFNAR2-2A-GFP- VHH-mIFNAR1-IFNAR1 Y529F	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-mCherry-VHH-mIFNAR2-2A-GFP- VHH-mIFNAR1-IFNAR1 Y455F	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-mCherry-VHH-mIFNAR2-2A-GFP- VHH-mIFNAR1-IEE-> AAA	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-mCherry-VHH-mIFNAR2-2A-GFP- VHH-mIFNAR1-IFNAR2 Y510F	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-mCherry-VHH-mIFNAR2-2A-GFP- VHH-mIFNAR1-IFNAR2 Y335F	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-mCherry-VHH-mIFNAR2-2A-GFP- VHH-mIFNAR1-IFNAR1 Y518F Y529F	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-mCherry-VHH-mIFNAR2-2A-GFP- VHH-mIFNAR1-IFNAR2 Y335F Y510F	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-mCherry-VHH-mIFNAR2-2A-GFP- VHH-mIFNAR1	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-mCherry-VHH-mIFNAR2-2A-GFP- VHH-mIFNAR1 Δ16aa	AG Scheller	Ampicillin

2.1.10 Puffer und Lösungen

Für die Arbeit wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Puffer und Lösungen verwendet.

Tabelle 9:	Puffer und	Lösungen
------------	------------	----------

Lösung/Puffer	Bestandteile
10% APS	5 g APS auf 50 ml H_2O_{dd}
DNA-Ladepuffer (6x)	30% Glycerin 50 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 0,25% Orange G
Laemmli-Puffer (5x)	0,4 M Tris-HCl (pH 6,8) 40% Glycerin 8% SDS 65 mM β-Mercaptoethanol 0,02% Bromphenolblau
LB-Agarplatten	0,5% Hefeextrakt 1% NaCl 1% Trypton 1,5% Agar-Agar 200 μg/mL Ampicillin (Carl Roth)
JAK2-Lysispuffer	10 mM Tris-HCl pH7,5 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 10 mM MgCl ₂ 1 mM Na ₃ VO ₄ 0,5% NP-40 1 Tablette Proteaseinhibitoren pro 50 ml Puffer
PBS (phosphate buffered saline)	1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 137 mM NaCl (pH 7,4)
10x running buffer für SDS-Page	0,4 M Tris-HCl (pH 8,25) 0,1 M Glycin 0,1% SDS
S1-Puffer für DNA-Minipräparation	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0) 1:1000 RNase
S2-Puffer für DNA-Minipräparation	0,2 M NaOH 1% SDS
S3-Puffer für DNA-Minipräparation	3 M Kaliumacetat (C ₂ H ₃ KO ₂) 11,5% Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂) 28,5 ml H ₂ O
Sammelgelpuffer	500 mM Tris 0,4% SDS pH 6,8

Lösung/Puffer	Bestandteile
SDS Puffer	25 mM Tris 0,1% SDS 192 mM Glycine
stripping buffer	62,5 mM Tris-HCR (pH 6,8) 2% SDS 0,1% β-Mecaptoethanol
TAE (Tris-Acetat-EDTA)	0,4 M Tris-HCl (pH 8,8) 0,01 M EDTA 0,2 M Essigsäure
10x TBS (Tris-buffered-saline)	150 mM NaCl 200 mM Tris-HCl (pH 7,5)
TBS-T (TBS mit Tween20)	TBS-Puffer mit 0,05% Tween20
Transferpuffer	250 mM Tris-HCL (pH 7,5) 2 M Glycerin 0,01% SDS 5% Methanol
Trenngelpuffer	1,5 M Tris 0,4% SDS pH 8,8

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wie Einwegpipettenspitzen, Reaktionsgefäße etc. wurden von den Firmen StarLab (Hamburg, Deutschland) und Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) bezogen.

2.1.12 Zytokine und synthetische Liganden

Als Liganden für die in der Arbeit erstellten synthetischen Rezeptoren wurden die in Tabelle 10 genannten rekombinanten Proteine verwendet.

Tabelle 10: Rekombinante Proteine

Rekombinantes Protein	Ursprung
Hyper Interleukin-6 (HIL-6) (0,2% entsprechen 10 ng/ml)	Konditionierter Zellkulturüberstand einer stabilen CHO-K1 Zelllinie
Interferon α4	Bio-Techne, Minneapolis, USA
GFP-Fc (GG)	[93]
mCherry-Fc (CC)	[93]
GFP-mCherry-Fc (GCCG)	[93]
GFP-mCherry rekombinant (GC)	[93]
2x GFP-mCherry-Fc (GGCCGG)	[93]

2.1.13 Zelllinien und Bakterienstämme

Für die Amplifikation der in dieser Arbeit untersuchten Plasmide wurden *Escherichia coli* (*E. coli*)-Zellen vom Stamm XL1-blue von Stratagene (La Jolla, CA, USA) in LB-Medium verwendet.

Die in der Arbeit für die Untersuchung der Rezeptorexpression und der Signaltransduktion benutzten eukaryotischen Zelllinien sind in Tabelle 11 gelistet.

Zelllinie/ Bakterienstamm	Ursprung	Wachstumsbedingungen	Zellart
HEK293 (ACC 305)	Leibniz Institut DMSZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	DMEM+10% FCS+ Penicillin (60 mg/l) Streptomycin (100 mg/l)	Adhärente, eukaryotische Zellen, human
HEK 293-T (ACC 635)	Leibniz Institut DMSZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	DMEM+10% FCS+ Penicillin (60 mg/l) Streptomycin (100mg/l)	Adhärente, eukaryotische Zellen, human
Phoenix-Eco	DKFZ, Ursula Klingmüller (Heidelberg, Deutschland) (Ketteler <i>et al.</i> 2002)	DMEM + 10% FCS + Penicillin (60 mg/l) (Streptomycin (100 mg/l))	Adhärente, eukaryotische Zellen, human
Ba/F3-gp130	Immunex.,Seattle, USA	DMEM + 10% FCS und 10ng/ml HIL-6 (Puromycin 1,5 μg/ml)	Suspensionszellen, murin

Tabelle 11: Zelllinien und Bakterienstämme

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation von chemisch kompetenten E. coli

Bei einer Transformation wird Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* Bakterien eingebracht. In dieser Doktorarbeit wurde hierzu das Verfahren der *heat shock* Transformation angewandt. Durch das *heat shock* Verfahren wird die Zellwand der Bakterien durch eine kurze Erhitzung auf 42°C für die hinzugegebene DNA durchlässig. Zunächst wurden hierfür die als 30 μ l Aliquots vorliegenden, chemisch kompetenten *E. coli* XL-1 blue Zellen für 5-10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die DNA, die in die Bakterien überführt werden sollte, hinzugegeben (1-2 μ l Plasmid-DNA oder 10 μ l Ligationsansatz). Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation für 5 Minuten auf Eis, gefolgt vom Hitzeschock bei 42°C für 1 Minute. Nach Abschluss des Hitzeschocks folgten weitere 5 Minuten Inkubation auf Eis. Abschließend wurden 500 μ l zuvor erwärmtes LB-Medium zu jeder Probe gegeben und diese für eine Stunde bei 37°C und 1200 Rotationen pro Minute (*rpm*) inkubiert. 100 μ l bis 200 μ l der Bakteriensuspension wurden anschließend auf einer LB-Agar-Platte mit jeweiligem Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die abschließende Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

2.2.2 PCR (polymerase chain reaction/Polymerasekettenreaktion)

Zur Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen wurde eine PCR durchgeführt. Hierfür wird ein PCR-Ansatz, bestehend aus für die Sequenz spezifischen Oligonukleotiden (*primer*), freien Desoxyribonukleotiden (dNTPs), Puffern, einer hitzestabile DNA-Polymerase und der das zu amplifizierende Fragment erhaltenden DNA (*template*) benötigt. In einem mehrschrittigen Prozess wird die *template* DNA denaturiert und die gewünschte Sequenz nach dem annealing, der Bindung der *primer* an die *template* DNA, durch Elongation mit Hilfe der DNA-Polymerase in mehreren Zyklen amplifiziert. In dieser Arbeit wurden zwei Sonderformen der PCR, die *colony* PCR und die *site-directed-mutagenesis* PCR (SDM-PCR), durchgeführt, die in den folgenden Unterpunkten näher erläutert sind.

Colony PCR

Die Analyse von *E. coli* XL-1 blue Zellen nach Transformation wurde mittels *colony* PCR durchgeführt. Hierfür wurde zunächst 20 μ l H₂O_{dd} mit je einer Bakterienkolonie beimpft. Als Kontrollen dienten eine Kolonie einer Kontrollplatte und H₂O_{dd}. Die Bakterien wurden bei 95°C für 5 Minuten aufgeschlossen und anschließend mit dem in Tabelle 12 aufgeführten PCR-Ansatz vermengt. Die bei der PCR durchlaufenen Reaktionsschritte sind in Tabelle 13 aufgeführt. Abschließend wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.4) analysiert. Die zur Isolation der Bakterien verwendeten Pipettierspitzen wurden in je 2 ml flüssigem LB-Medium abgeworfen und bei 37°C und 1400 rpm über Nacht inkubiert, um die putativ korrekt transformierten Bakterien zu identifizieren und deren Plasmid-DNA bei Bedarf isolieren zu können (siehe Punkt 2.2.3).

Tabelle 12:	PCR-Ansatz zur	Durchführung	einer	colony PCR
-------------	----------------	--------------	-------	------------

5x Dream Taq Puffer	5 μl
MgCl ₂ (25 mM)	4 μl
<i>forward primer</i> (100 pmol/μl)	0,25 μl
reverse <i>primer</i> (100 pmol/µl)	0,25 μl
dNTPs (10 mM)	1 μl
Dream Taq Polymerase (5 U/μl)	0,2 μΙ
H ₂ O _{dd}	ad 30 µl

Tabelle 13: Reaktionsschritte der colony PCR

Reaktionsschritt	Dauer (min)	Temperatur	Anzahl der Zyklen	
Initiale Denaturierung	5 min	95°C		
Denaturierung	1 min	95°C		
annealing	1 min	60°C	25 20 Julion	
Elongation	1 min pro Kilobase (kB)	72°C	25 – 30 Zykien	
Finale Elongation	5 min	72°C		

Site directed mutagenensis PCR

Die *site directed mutagenesis* PCR wurde angewandt, um gezielte Änderungen in der codierenden DNA hervorzurufen. Hierzu wurden *sense*- und *antisense*-Primer erstellt, die die gewünschte Mutation spezifischer Basenpaare enthielten, und diese in je einen PCR-Reaktionsansatz gegeben (siehe Tabelle 14). Dies sorgte bei der Amplifikation der DNA durch PCR dafür, dass in auf Basis des Primers synthetisierter DNA die gewünschte Mutation vorhanden war. Das zugehörige PCR-Programm ist in Tabelle 15 aufgeführt.

	Reaktionsansatz A	Reaktionsansatz B
template DNA (1:100)	1 µl	1 μl
5x HF-Puffer	10 μl	10 μl
sense Primer	0,4 μl	/
antisense Primer	/	0,4 μl
dNTPs	1 μΙ	1 μl
Phusion Polymerase	1 µl	1 μl
H ₂ O _{dd}	ad 50 µl	ad 50 μl

Tabelle 14: Reaktionsansatz der SDM-PCR

Tabelle 15:	Reaktionsschritte	der SDM-PCR
-------------	-------------------	-------------

Reaktionsschritt	Dauer (min)	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	4 min	98°C	
Denaturierung	1 min	98°C	
annealing	1 min	55°C	15 Zyklen
Elongation	15-30 s/kB	72°C	
Finale Elongation	12 min	72°C	

Nach Abschluss der PCR wurden beide Reaktionsansätze gemischt und die PCR nach Zugabe von Phusion Polymerase erneut gestartet. Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte gemäß dem Protokoll des *Nucleo-Spin Gel and PCR Clean-up*-Kits von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland). Die Eluation der DNA erfolgte mit 30 µl H₂O_{dd}. Abschließend erfolgte die Dpnl Spaltung für 2 h bei 37°C, wordurch die methylierte Wildtyp-DNA aus der Suspension entfernt wurde und somit nur die veränderten PCR-Produkte zurückblieben. Das Enzym wurde für 20 Minuten bei 80°C inaktiviert und der Ansatz auf Eis inkubiert. Abschließend wurden chemisch kompetente *E. coli* XL-1 blue Zellen mit dem neu synthetisierten Plasmid transformiert (siehe Punkt 2.2.1) und putative Klone nach Präparation der DNA (siehe Punkt 2.2.3) von einem externen Labor sequenziert (siehe Punkt 2.2.11). Das Prinzip der *site directed mutagenesis* PCR ist in Abb. 4 dargestellt.



5

Abb. 4: Site directed mutagenesis PCR (Angelehnt an [94])

In schwarz ist das nicht-mutierte Ausgangsplasmid, in hell- bzw. dunkelblau sind die Punktmutationtragenden Plasmide dargestellt. Das Dreieck kennzeichnet die Punktmutation, die Lücke im farbigen Plasmid einen Einzelstrangbruch. Zunächst wurde eine PCR mit zwei verschiedenen Ansätzen, die je einen *forward*und einen *reverse-primer* enthielten, durchgeführt. Diese trugen beide die gleiche Punktmutation. Es entstand ein doppelsträngiges Plasmid mit je einem mutationstragenden- und einem Wildtyp-Strang. Nach Vereinigung beider PCR Ansätze fand eine erneute Amplifikation der Plasmide durch PCR statt. Die Anordnung der Plasmide bei Religation erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Um die mutationstragenden Plasmide zu isolieren, wurde eine enzymatische Restriktion mit Dpnl durchgeführt. Das Enzym schneidet ausschließlich die methylierten Wildtyp-DNA-Stränge. Die verbliebenen Plasmide wurden in chemisch kompetente *E. coli* XL-1 blue Zellen transformiert.

2.2.3 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA-Mini-Präparation

Um den Erfolg der Transformation chemisch kompetenter *E. coli* XL-1 blue Zellen überprüfen zu können, wurde deren Plasmid-DNA mittels Mini-Präparation isoliert. Hierfür wurden 2 ml LB Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum mit je einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (1100 rpm) inkubiert. 500 µl der Lösung wurden bei 13000 rpm und Raumtemperatur (RT) für 3-5 Minuten zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Bakterien-Pellets wurden in 100 µl 4°C kaltem S1-Puffer, der zuvor mit RNase versetzt wurde, resuspendiert, um vorhandene Ribonukleinsäure (RNA) zu eliminieren. Anschließend erfolgte die Lyse der Bakterien durch Zugabe von 200 µl alkalischem S2-Puffer und Invertieren. Nach 4-5 Minuten wurde die Lyse der Bakterien durch Zugabe von 150 µl des neutralisierenden 4°C kalten S3-Puffers gestoppt und die Lösung für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Bei erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 10 Minuten, 4°C) wurden die denaturierten Proteine von der im Überstand enthaltenen DNA getrennt. Diese wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden 900 µl 96%iger Ethanol hinzugegeben und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Durch erneutes

Zentrifugieren bei 13000 rpm für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur konnte anschließend der Überstand entfernt und die DNA-Pellets isoliert werden. Die Pellets wurden mit 500 µl 70% igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert (13000 rpm, 5 Minuten bei Raumtemperatur) und getrocknet. Abschließend wurden sie in 30 µl H₂O_{dd} gelöst und nach Restriktion mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (siehe Punkt 2.2.4 und 2.2.8).

Midi-Präparation

Die Midi-Präparation wurde durchgeführt, wenn größere Mengen Plasmid-DNA benötigt wurden. Hierfür wurden zunächst 100 ml flüssiges LB-Medium mit dem für den Versuch nötigen Selektionsantibiotikum (in diesem Fall Ampicillin bzw. Kanamycin) versetzt und in einen 1 Liter Erlenmeyerkolben gegeben. Jeder Kolben wurde mit einer Bakterienkolonie beimpft. Diese stammten bei einer Retransformation direkt von einer LB-Agar-Platte und wurden mit der Pipettenspitze in den Kolben übertragen. Bei zuvor durchgeführter Plasmid-DNA-Mini-Präparation stammten die Bakterien von je einer Bakterienkolonie, die in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1,5 ml LB-Medium vor der Plasmid-DNA-Mini-Präparation durch Wärme und Schütteln vermehrt wurde (2.2.3). Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C und 140 rpm inkubiert und anschließend bei einer 15 bis 20-minütigen Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C geerntet. Die Isolation der Plasmid-DNA aus den Bakterien erfolgte mit Hilfe des Kits NucleoBond[®] Xtra plasmid purification der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Das nach der Reinigung und Trocknung erhaltene DNA-Pellet wurde in 100 µl H₂O_{dd} gelöst. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde anschließend mit dem Gerät NanoDrop 2000c (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland) überprüft. Anschließend erfolgte eine weitere Kontrolle der Plasmid-DNA mittels analytischer Restriktion (siehe Punkt 2.2.8) und einer Analyse per Agarose-Gelelektrophorese (siehe Punkt 2.2.4).

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente zu analysieren, wurden diese in ein Agarosegel überführt und durch elektrische Spannung ihrer Größe nach voneinander getrennt. Die Konzentration der hier verwendeten Agarosegele variierte je nach Größe der darzustellenden Fragmente von 1% bis 2% Agarose. Die Anfärbung der DNA-Fragmente im Agarosegel erfolgte mit Hilfe des DNA-Farbstoffes *HDGreen Plus* der Firma Intas Science Imaging Instruments GmbH, der vor der Erkaltung der Agaroselösung hinzugefügt wurde. Vor Beladen der Proben in das Agarosegel wurden diese mit OrangeG-Ladepuffer (6x) versetzt und auch DNA-Marker (GeneRuler[™] und GeneRuler Express, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) wurde geladen. Anschließend erfolgte die Größentrennung der Fragmente bei konstant 120 V. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Auswertung das Geldokumentationssystem der Firma Intas Science Imaging Instruments GmbH verwendet.

2.2.5 Gelextraktion – Isolation von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Zur Isolation eines gewünschten DNA-Fragmentes aus dem Agarosegel wurden zunächst die Fragmente unter ultraviolettem (UV-) Licht (365 nm) sichtbar gemacht. Anschließend wurde das gewünschte Fragment mit einem sauberen Skalpell exzidiert und in ein 2 ml-
Reaktionsgefäß überführt. Die Gelextraktion erfolgte mit Hilfe des *Nucleo-Spin Gel and PCR Clean-up*-Kits von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die Elution der DNA erfolgte mit H_2O_{dd} . Abschließend wurde die DNA-Konzentration mittels NanoDrop (siehe Punkt 2.2.7) bestimmt.

2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation wurde ein DNA-Fragment (*insert*) mit einem Plasmid (Vektor) verknüpft. Nach enzymatischer Restriktion des *inserts* und des Vektors durch das gleiche Enzym (siehe Punkt 2.2.8) erfolgte die Ligation der Fragmente. Hierzu wurde der in Tabelle 16 dargestellte Ligationsansatz verwendet.

Vektor DNA	ca. 100 ng
insert DNA	Rechnerisch ermittelte Menge
10x T4-Ligase-Puffer	2 μΙ
PEG4000 (nur bei <i>blunt-end)</i>	2 μΙ
T4 DNA-Ligase	2 μΙ
H ₂ O _{dd}	<i>ad</i> 20 μl

Tabelle 16: Ligationsansatz

Die Menge des benötigten *inserts* wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{5 * Länge insert (bp)}{Länge Vektor (bp)} = Masse insert (ng)$$

Abschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C (*blunt end*) bzw. bei Raumtemperatur für 2 h (*sticky end*) und eine Transformation in chemisch kompetente *E. coli* XL-1 blue Zellen (siehe Punkt 2.2.1)

2.2.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Analyse der DNA-Konzentration wurde in dieser Doktorarbeit das Spektralphotometer "Nanodrop 2000c" (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) mit der hierzu passenden Software verwendet. Als Kalibrierung wurden zunächst 1 μ l H₂O_{dd} aufgetragen. Anschließend wurde 1 μ l der DNA-haltigen Lösung aufgebracht und sowohl deren Konzentration als auch deren Reinheitsgrad analysiert. Die Konzentration wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt, da diese je nach DNA-Konzentration unterschiedlich stark ist. Die Bestimmung des Reinheitsgrades erfolgte einerseits durch Betrachtung des Quotienten der Extinktion bei 260 nm und bei 280 nm, der eine eventuelle Verunreinigung mit Proteinen detektiert. Andererseits konnten durch Auswertung des Quotienten der Extinktion bei 260 nm Verunreinigungen durch Salze, organische Lösungsmittel oder Polysaccharide angezeigt werden.

2.2.8 Restriktion der DNA

Bei der Restriktion wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe von verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten. Hierbei entstehen, je nach verwendetem Enzym, *blunt ends* oder *sticky ends*. Die verwendeten Enzyme stammten von der Firma Thermo Fisher Scientiefic (Darmstadt, Deutschland) und wurden nach Angaben des Herstellers verwendet. 1 µg Plasmid- DNA wurden mit 1 U des gewünschten Enzyms und dem hierfür benötigten Puffer in 20 µl Gesamtvolumen für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (siehe Punkt 2.2.5). Bei einer größeren Menge von 10 µg Plasmid-DNA erfolgte die Inkubation bei einem Gesamtvolumen von 40 µl über Nacht bei 37°C. Die enzymatische Restriktion wurde durch Hitze-Inaktivierung des Restriktionsenzyms bei 60°C oder 80°C für 20 Minuten oder durch die Zugabe von DNA-Ladepuffer gestoppt.

2.2.9 Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung verhinderte im Rahmen von Klonierungen die Religation eines Vektors nach enzymatischer Spaltung vor Ligation mit dem *insert*. Nach Restriktion und Hitze-Inaktivierung des Enzyms (siehe Punkt 2.2.8) wurden dem gespaltenen Vektor 2 µl *alkaline phosphatase* (AP) (FastAP[™], Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) sowie die gleiche Menge zugehöriger Puffer hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, im Agarosegel voneinander getrennt und das gewünschte Fragment zur Ligation exzidiert (siehe Punkt 2.2.5).

2.2.10 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Phosphorylierung der 5' Enden eines DNA-Fragmentes durch Polynukleotidkinasen (PNK-Behandlung) ermöglicht die Ligation mit verschiedenen Vektoren. Für die PNK-Behandlung wurden die in Tabelle 17 aufgeführten Komponenten benötigt:

Tabelle 17: Ansatz für die PNK-Behandlung

PCR-Produkt	132 μl
PNK (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland)	3 μl
T4 Ligase Puffer	15 μl

Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 30 Minuten gefolgt von 5 min bei 75°C. Abschließend wurden die DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt, vom Gel extrahiert und weitere Klonierungsschritte durchgeführt (Siehe Punkt 2.2.5).

2.2.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma Microsynth Seqlab, Göttingen, Deutschland. Hierfür wurden spezifische *primer* verwendet, die in Tabelle 7 aufgeführt sind. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Clustal Omega (https://ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Passagieren von Zellen

Damit die Zellen ihre Wachstumsfähigkeit beibehielten, wurden diese alle 3-4 Tage passagiert. Zuvor wurden alle Zelllinien unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Alle Zelllinien wurden in 10-cm-Zellkulturschalen in 10 ml DMEM (+/+) kultiviert. Schwach adhärente Zelllinien (z.B. Phoenix-Eco oder HEK293T) wurden mit 2 ml sterilem PBS, Stark adhärente Zellen (z.B. CHO-K1 oder HEK293) mit 2 ml Trypsin/EDTA enzymatisch von der Zellkulturschale abgelöst und im Verhältnis 1:1000 auf eine neue 10-cm-Zellkulturschale mit DMEM^(+/+) überführt.

Ba/F3-gp130 Zellen sind IL-3 abhängig proliferierende, murine pro-B-Zellen [95, 96]. Zum Erhalt der Proliferationsfähigkeit wurden die Ba/F3-gp130 Zellen wöchentlich passagiert. Hierzu wurden die Ba/F3-gp130 Zellen im Verhältnis von 1:40000 in DMEM^(+/+) verdünnt. Zur Proliferation der Zellen wurden 20 μ l HIL-6 und zur Selektion von allen transduzierten Zellen 15 μ l Puromycin hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C bei 5% CO₂.

2.3.2 Transfektion von HEK-293T und HEK-293 Zelllinien

Die Zellen wurden von der Zellkulturschale abgelöst und in DMEM^(+/+) überführt. Sie wurden mit Trypanblau angefärbt und durch den TC 20TM Automated Cell Counter (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland) gezählt. Pro 10 cm Zellkulturschale wurden 2 x 10⁶ Zellen ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für die Transfektion wurden 1 ml DMEM^(-/-) und je 5 µg der jeweiligen Plasmid-DNA mit je 10 µl TurboFect[™]-Zell-Transfektionsreagenz von Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vermengt.

Anschließend erfolgte eine Inkubation für 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur.

Nach der Inkubation wurde die Lösung tröpfchenweise auf die Zellkulturschalen mit den jeweiligen Zellen gegeben. Die Schalen wurden für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Bei HEK293 Zellen erfolgte nach Ablauf von ca. 4-6 h ein Mediumswechsel.

2.3.3 Retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen

Für die retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen wurde zunächst die Verpackungszelllinie Phoenix-Eco mit der Plasmid-DNA transfiziert. Hierfür wurden am Tag zuvor 600000 Zellen pro Vertiefung einer 6-*well*-Platte in 2 ml DMEM^(+/+) ausgesät. Phoenix-Zellen wurden analog zu Punkt 2.3.2 transfiziert (nach Angaben des Herstellers erfolgten einige Änderungen). Ba/F3-gp130 Zellen wurden bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und auf eine Zellzahl von 2x10⁶ Zellen/ml in DMEM +/+ verdünnt. 50 µl dieser Suspension (1x 10⁵ Zellen) wurden mit 250 µl des Überstandes der Phoenix-Zellen und 3 µl Prolybrene (Sigma Aldrich, 800 µg/ml) vermischt. Die finale Polybrenkonzentration entsprach 8 µg/ml. Nach 2 Stunden Zentrifugieren bei Raumtemperatur und 1800 rpm wurde das entstandene Zellpellet in 5 ml DMEM^(+/+) mit 10% FCS und 10 ng/ml HIL-6 resuspendiert. Die Zellen wurden auf einer 6-*well*-Platte für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 48 Stunden wurde zur Selektion der transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen Puromycin (1,5 µg/ml) hinzugefügt.

2.3.4 Stimulationsassay

Zur Analyse der intrazellulären Signaltransduktion nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen bzw. Proteinen wurden Stimulationsassays mit Ba/F3-gp130 sowie HEK293 Zellen durchgeführt. Ba/F3-gp130 Zellen wurden hierzu drei Mal mit sterilem PBS gewaschen (1500 rpm, 5 min, Raumtemperatur (RT)), anschließend in je 1 ml DMEM^(-/-) auf einer 12-*well*-Platte resuspendiert und für 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Stimulation erfolgte mit den entsprechenden Zytokinen, bzw. Proteinen für 30 Minuten. Als Positivkontrolle wurde 10 ng/ml HIL-6 verwendet. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet (1500 rpm, 5 min, RT). Die Ba/F3-gp130 Zellen wurden in flüssigem N₂ schockgefroren und bis zur Lyse (siehe 2.4.1) bei -80°C gelagert. HEK293 Zellen wurden ca. 48 Stunden nach Transfektion (siehe Punkt 2.3.2) für 30 Minuten mit den entsprechenden Zytokinen, bzw. Proteinen direkt lysiert.

2.3.5 Proliferationsassay von Ba/F3-gp130 Zellen

Zur Analyse der Proliferation nach Stimulation wurde ein Proliferationsassay, auch Zellviabilitätsassay, durchgeführt. Hierfür werden Zellen mit dem Farbstoff Resazurin, enthalten im CellTiter-Blue[®] (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland), versetzt, der von diesen zu Resofurin umgewandelt wird. Letzteres hat fluoreszierende Eigenschaften und kann durch die Messung der Fluoreszenz detektiert werden. Zur Proliferationsanalyse wurden Ba/F3-gp130 Zellen drei Mal in PBS gewaschen (1500 rpm, 5 min bei Raumtemperatur). Mit einer Konzentration von 5 x 10⁴ Zellen pro ml wurden die Zellen in DMEM^(+/+) resuspendiert und eine entsprechende Menge Zytokin hinzugegeben. 100 μ l der Suspension wurden auf je drei *wells* einer 96-*well*-Platte aufgetragen und diese bei 37°C und 5% CO₂ für 48 Stunden inkubiert. 20 μ l CellTiter Blue wurden für zur Initiation der Reaktion in jedes *well* gegeben. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte durch das Fluorometer Infinite[®] M200 PRO (Tecan, Männedorf, Schweiz) (Referenzwellenlänge 560 nm Wellenlänge (Exzitation), 590 nm Wellenlänge (Emission)) zum Zeitpunkt 0 und alle weiteren 20 Minuten bis maximal 120 Minuten.

2.3.6 Analyse der Expression von Rezeptoren an der Zelloberfläche von Ba/F3-gp130 Zellen

Für die Analyse der Expression von Rezeptoren auf der Zelloberfläche wurden $5x10^5$ Ba/F3gp130 Zellen in sterilem PBS gewaschen und zunächst für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 2000 rpm zentrifugiert und anschließend in 1 ml FACS Puffer resuspendiert. Nach weiteren 5 Minuten Zentrifugation bei Raumtemperatur und 2000 rpm wurden die Zellen in 50 µl FACS Puffer, der mit dem primären Antikörper versetzt war, resuspendiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut 1 ml FACS Puffer hinzugegeben, ein weiteres Mal zentrifugiert und die Zellen in 50 µl FACS Puffer, der mit dem sekundären Antikörper versetzt war, gelöst. Nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut mit FACS Puffer gewaschen, zentrifugiert und in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert. Abschließend erfolgte eine Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung des FACSCanto[™] II Cell Analyzer (BD Biosciences, California, USA). Zur Auswertung der Daten wurde die Software FCS Express verwendet.

2.4 Proteinbiolchemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Die transfizierten Zellen wurden mit PBS (schwach adhärente Zellen) bzw. einem Zellschaber (stark adhärente Zellen) von den Zellkulturplatten gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit PBS gewaschen (14000 rpm, 4°C, 3 min). Das Zellpellet wurde anschließend in 200 µl des hierfür vorgesehenen Lysepuffers bei 4°C unter leichter Rotation für 1-2 Stunden lysiert. Nach der Lyse wurde der Überstand isoliert (14000 rpm, 4°C, 20 min). Die Konzentration an Gesamtprotein wurde mittels BCA-Assay bestimmt (siehe 2.4.2). Die Zellepellets der Ba/F3-gp130 Zelllinie wurden mit 100 bis 200 µl Lysepuffer lysiert. Die weiteren Schritte entsprachen denen der oben beschriebenen Herstellung von Zelllysaten nach Hinzufügen des Lysepuffers.

2.4.2 BCA Assay

Für die Erstellung des BCA-Assays wurde eine 1:20 Verdünnung aller Lysate und des bei Erstellung der Lysate verwendeten Lysepuffers in H₂O_{dd} benötigt. In die Vertiefungen einer 96*well*-Platte wurden jeweils 25 µl der jeweiligen Verdünnung in Duplikaten aufgetragen. Es wurde gegen bovines Serumalbumin standardisiert. Anschließend wurden 200 µl einer Mischung von Pierce[®] *BCA-Assay Reagent A* (50-fach) *und B* (einfach) (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland) zum Start der Reaktion hinzugegeben. Die Proben wurden mit einem lichtundurchlässigen Deckel abgedeckt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Lösungen erfolgte mit Hilfe des Fluorometer Infinite[®] M200 PRO (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 562 nm Wellenlänge. Anhand der Extinktionswerte der BSA-Referenzwerte wurde eine Geradengleichung erstellt und die Gesamtproteinkonzentration der Lysate errechnet. Für die Analyse per Western Blot wurden die Lysate mit 5x Laemmli-Puffer auf eine Gesamtproteinkonzentration von 2,5 µg/µl verdünnt. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 95°C inkubiert.

2.4.3 Western Blot

SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurden jeweils am Tag zuvor 10%- bzw. 15%-ige SDS-Gele hergestellt, deren Zusammensetzung in Tabelle 18 ersichtlich ist.

	Trenngel 10%	Trenngel 15%	Sammelgel
Acrylamid 30%	4 ml	6 ml	0,67 ml
Sammel-/Trenngelpuffer	2,6 ml	2,6 ml	1 ml
H_2O_{dd}	3,3 ml	1,3 ml	2,28 ml
TEMED	4 μl	4 μl	4 μl
APS, 10%	100 µl	100 µl	40 µl

Tabelle 18: Zusammensetzung der SDS-Gele

Die Taschen der SDS-Gele wurden mit den jeweiligen Proben in entsprechender Menge beladen. Als Marker wurde *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen. Die Gelkammern wurden mit *running buffer* befüllt und die Analyse erfolgte bei einer Spannung von 95 V für 2 Stunden. Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran.

Transfer der Proteine

Für den Proteintransfer wurden die SDS-Gele auf eine PVDF-Membran aufgebracht, die zuvor für 2 Minuten in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer gewaschen wurde. Die Schichtung der Komponenten erfolgte in der Kassette des Trans-Blot Turbo[™] Transfersystems (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland) und wurde in folgender Reihenfolge, von unten nach oben, durchgeführt: 3-4 Lagen in Transferpuffer getränktes *whatman paper*, PVDF-Membran, SDS-Gel und weitere 3-4 Lagen in Transferpuffer getränktes *whatman paper*. Der Transfer erfolgte bei 1 A und konstant 20 V für eine Stunde. Anschließend wurden die freien Bindestellen der Membranen für 2-3 Stunden mit 5% Milchpulver in TBS-T geblockt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Membranen drei Mal für 5 bis 10 Minuten unter Rotation bei Raumtemperatur in TBS-T gewaschen.

Immundetektion

Nach dem Waschen der Membranen wurden, je nach Antikörper, 5% Milchpulver oder 5% BSA in TBS-T auf die Membran gegeben, mit dem jeweiligen Primärantikörper vermengt (1:1000) und unter leichter Rotation bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Membranen erneut drei Mal bei Raumtemperatur (RT) in TBS-T gewaschen und mit 5% Milchpulver in TBS-T sowie dem Sekundärantikörper versehen. Dieser wurde, je nach zuvor verwendetem Primärantikörper, über einen Zeitraum von 2 h bis zu einem Tag bei 4°C unter leichter Rotation auf der Membran belassen. Abschließend wurde die Membran zwei Mal mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen. Für die Auswertung wurde die Membran mit je 200 µl der beiden Lösungen aus dem hierfür vorgesehenen *ECL Western Blotting Detection Kit* (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland) benetzt und im ECL Chemo Cam Imager (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) ausgewertet.

2.4.4 Stripping der Western Blot Membran

Ein an die Membran gebundener Primärantikörper kann wieder von dieser entfernt werden (*stripping*). Die Membran wurde hierzu für 30 Minuten bei 60°C in einer Lösung aus *stripping*

buffer (siehe Tabelle 9) und β-Mercaptoethanol inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen der Membran für 5 bis 10 Minuten mit TBS-T. Nach dem Waschen wurde die Membran mit 5% Milch in TBS-T für 1 bis 3 Stunden geblockt und weitere drei Mal mit TBS-T gewaschen. Die Zugabe des primären Antikörpers sowie die darauffolgenden Schritte entsprechen der Beschreibung in Punkt 2.4.3.

3 Ergebnisse

3.1 Synthetische humane IFNα-Rezeptoren werden durch synthetische Liganden aktiviert

Um die Hypothese einer vergleichbaren Signaltransduktion von synthetischen- und Wildtyprezeptoren bei Stimulation durch synthetische Liganden zu überprüfen, wurden zunächst die entsprechenden synthetischen Rezeptoren erzeugt. Hierfür wurde die Konstruktionsstrategie der synthetischen Zytokinrezeptoren aus vorherigen Arbeiten der AG Scheller für die Typ I IFN-Rezeptoren adaptiert [1] (de Vos, Frederik, Dissertation, bisher nicht veröffentlicht). Während die intrazellulären- und Transmembrandomänen des humanen IFNα-Rezeptors unverändert blieben, wurde die extrazelluläre Domäne bis auf 15 Aminosäuren durch je einen *nanobody* ersetzt. Die *nanobodies* waren gegen je ein synthetisches, fluoreszierendes Protein (GFP bzw. mCherry) gerichtet und wurden mit den verbliebenen Anteilen des Wildtyprezeptors verbunden (siehe Abb. 5 A und B). Die für die synthetischen hIFNα-Rezeptoren codierenden cDNAs wurden von BioCat (Heidelberg, Deutschland) als 2A-Funktionskonstrukt synthetisiert und im Klonierungsvektor *pBluescript* (pBS) zur Verfügung gestellt. Abb. 5 C gibt eine Übersicht über den genauen Aufbau der Expressionskassette.



Abb. 5: Die Konstruktionsstrategie der SyCyRs wurde aus vorherigen Arbeiten auf die humanen IFNα-Rezeptoren adaptiert.

Die extrazelluläre Domäne des endogenen Rezeptors (A) wurde fast vollständig durch gegen die synthetischen fluoreszierende Proteine GFP und mCherry gerichtete *nanobodies* (V_G bzw. V_C) ersetzt (B). Der gegen GFP gerichtete *nanobody* ist grün, der gegen mCherry gerichtete *nanobody* rot dargestellt. Die Expressionskassette der synthetischen hIFN α -Rezeptoren (C) besteht aus zwei, durch das 2A-Peptid und die Furin-Schnittstelle getrennten, Anteilen. Diese wiederum umfassen je ein Signalpeptid, die Sequenzen für intrazelluläre- und Transmembrandomänen sowie 15 Aminosäuren der extrazellulären Domäne einer der Rezeptoruntereinheiten hIFNAR1 und hIFNAR2, einen myc- bzw. HA-*tag* und je einen *nanobody* (V_G bzw. V_C). (D) Das 2A-Peptid spaltet sich Enzym-unabhängig cotranslational selbst in einen Rest aus 23 Aminosäuren (AS) und einen aus 1 AS. Bei der Prozessierung und Integration in die Plasmamembran werden die Signalpeptide entfernt, sowie die Furin-Schnittstelle durch das Enzym Furin gespalten und somit auch die 2A-Reste entfernt. Durch die 2A-Konstruktionsstrategie wurde die Translation beider Rezeptorkomplexe in einem *open reading frame* ermöglicht, um Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Untereinheiten zu verringern [97-99]. Die Furin-Schnittstelle sorgte für die Eliminierung von Aminosäuren des 2A-Peptids durch das im *trans golgi network* lokalisierte Enzym Furin [98, 99] (siehe Abb. 5d). Die jeweiligen Rezeptoruntereinheiten und die *nanobodies* wurden für den Nachweis durch Western Blot mit je einem Protein *tag* versehen (HA bzw. myc).

In vorausgegangenen Forschungsarbeiten wurde nachgewiesen, dass die Signaltransduktion der murinen IFNα-Rezeptoren mit denen der synthetischen murinen IFNα-Rezeptoren vergleichbar ist [2]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher der synthetische mIFNα-Rezeptor als Kontrolle verwendet.

3.1.1 Synthetische hIFNa-Rezeptoren werden in eukaryotischen Zellen exprimiert

Um die Rezeptorproteine und deren Eigenschaften in verschiedenen Zellmodellen untersuchen zu können, wurde die Expressionskassette zunächst in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland) kloniert. Der Expressionsvektor pcDNA3.1-FLAG-HmIL23 lag in der AG Scheller vor und wurde mittels Pmel gespalten und anschließend dephosphoryliert (siehe Punkt 2.2.9). Hierbei verhinderte die Dephosphorylierung eine Religation des Vektors. Das *insert* wurde ebenfalls zunächst mit Pmel gespalten. Anschließend wurden die gewünschten Fragmente ligiert (siehe Abb. 6).



Abb. 6: Klonierung des Expressionsvektors für die *complementary* DNA (cDNA) von $V_chIFNAR2-2A-V_chIFNAR1$.

Die Ausgangsplasmide pcDNA3.1-FLAG-HmIL-23 und pBS-V_chIFNAR2-2A-V_GhIFNAR1 wurden mit Pmel gespalten und die Fragmente pcDNA3.1 (Vektor) und V_chIFNAR2-2A-V_GhIFNAR1 (*insert*) ligiert. Der isolierte pcDNA3.1-Vektor wurde vor der Ligation dephosphoryliert. Das entstandene Plasmid wurde pcDNA3.1-SyCyR-V_chIFNAR2-2A-V_GhIFNAR1 genannt.

Zur Kontrolle des Ligationsproduktes wurden chemisch kompetente *E. coli* XL-1 blue Zellen transformiert (siehe Punkt 2.2.1). Die Bakterienkolonien wurden mittels *colony* PCR (siehe Punkt 2.2.2) analysiert (siehe Abb. 7 A) und die Plasmid-DNA der putativen Klone durch Mini-Präparation (siehe Punkt 2.2.3) isoliert (siehe Abb. 7 B). Die isolierte Plasmid-DNA der putativen Klone wurde anschließend mittels enzymatischer Restriktion (siehe Punkt 2.2.8) durch Nhel analysiert. Von Klonen mit den erwarteten DNA-Fragmenten (1508 Basenpaare (bp) + 6210 bp)

wurde anschließend die Plasmid-DNA mittels Plasmid-Midi-Präparation (siehe Punkt 2.2.3) isoliert. Die Kontrolle erfolgte mittels Restriktionsspaltung durch drei verschiedene Enzyme, Nhel, EcoRV und Spel. Die Fragmentgrößen (Nhel 1508 bp + 6210 bp; EcoRV 2378 bp + 5340 bp und Spel 2262 bp + 5456 bp) stellten sich in der Agarosegelelektrophorese wie erwartet dar. Das gewünschte Plasmid pcDNA3.1-SyCyR-V_chIFNAR2-2A-V_GhIFNAR1 wurde erfolgreich erzeugt.



Abb. 7: Klonierung des Expressionsvektors für die cDNA von VchIFNAR2-2A-VghIFNAR1 (VghIFNAR1+VchIFNAR2)

(A) Nach Transformation der Ligationsprodukte in chemisch kompetente *E. coli* XL-1 blue Zellen wurden putative Klone nach erfolgter *colony* PCR durch Agarosegelelektrophorese überprüft (Fragmentgrößen 1039 bp). (B) Die Plasmid-DNA der putativen Klone wurde mittels Mini-Präparation isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde durch das Restriktionsenzym Nhel enzymatisch gespalten (Nhel 1508 bp + 6210 bp). Anschließend wurden die Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt und hinsichtlich ihrer Größe analysiert. Bei den verwendeten Markern handelte es sich um GeneRuler Express DNA Ladder (rechts) und GeneRuler™ DNA Ladder (links), Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA.

Im nächsten Schritt wurden HEK293T Zellen transient mit pcDNA3.1-SyCyR-V_chIFNAR2-2A-V_GhIFNAR1 transfiziert (siehe Punkt 2.3.2). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (siehe Punkt 2.4) und die Zelllysate mittels SDS-PAGE und Western Blot auf Expression der Rezeptoren analysiert (siehe Punkt 2.4.2). Für die Analyse wurden die Antikörper α -HA und α -myc verwendet, die gegen die entsprechenden Protein *tags* gerichtet sind. Als Negativkontrolle diente das Zelllysat von Zellen, die mit pEGFP transfiziert wurden. Das Ergebnis der Western Blot Analyse zeigte, dass beide Rezeptoranteile aller Klone der synthetischen humanen IFN α -Rezeptoren von den HEK293T Zellen exprimiert wurden (siehe Abb. 8). Durch die Glykosylierung der Proteine weicht das errechnete Molekulargewicht (V_cIFNAR2 48.5 kDa; V_gIFNAR1 29.7 kDa) von der im Western Blot ersichtlichen Proteingröße ab.



Abb. 8: Die Untereinheiten des synthetischen hIFN α -Rezeptors (V_GhIFNAR1+V_ChIFNAR2) werden in HEK293T Zellen exprimiert.

HEK293T Zellen wurden transient mit drei Klonen von pcDNA3.1-SyCyR-V_chIFNAR2-2A-V_GhIFNAR1 (#3, #12, #16) transfiziert. Die erstellten Zelllysate wurden in gleicher Konzentration auf ein SDS-Gel geladen (50 μg Protein pro Spur) und mittels Western Blot Analyse ausgewertet. Transient mit pEGFP transfizierte Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet. Zur Detektion der Proteine wurden gegen den HA (A) und myc *tag* (B) gerichtete Antikörper verwendet. PageRuler[™] Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA diente als Proteinmarker.

Beide Rezeptoranteile des synthetischen Rezeptors konnten mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse in den Zelllysaten der transfizierten Zellen nachgewiesen werden.

Nach erfolgreichem Nachweis der Expression beider Rezeptoruntereinheiten durch die HEK293T Zellen wurde im nächsten Schritt die Signaltransduktion der synthetischen IFNα-Rezeptoren in HEK293 Zellen untersucht. Da der Rezeptor mit der Klonnummer #12 am stärksten exprimiert wurde, wurde dieser für alle weiterführenden Experimente verwendet.

3.1.2 Die Stimulation der synthetischen hIFNα-Rezeptoren führt in transient transfizierten eukaryotischen Zellen zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges

Nach erfolgreicher Expression in HEK293T Zellen wurde die nach Stimulation ausgelöste Signalkaskade des synthetischen hIFNα-Rezeptors mit der des synthetischen mIFNα-Rezeptors verglichen. Hierbei wurde die JAK/STAT-Signaltransduktion untersucht, die von den WildtyphIFNα-Rezeptoren hauptsächlich aktiviert wird (zusammengefasst in [4]). Zunächst wurden transient transfizierte HEK293 Zellen stimuliert (siehe Punkt 2.3.2). Diese Zellen exprimierten entweder die murinen oder die humanen synthetischen IFNα-Rezeptoren. Als Positivkontrolle diente das in der AG Scheller vorliegende Designeryztokin Hyper-IL-6 (HIL-6) in 0,2%iger Konzentration (10 ng/ml). HIL-6 besteht aus dem löslichen Interleukin-6 Rezeptor (sIL-6R), der durch einen Peptidlinker mit Interleukin-6 (IL-6) verbunden ist [100]. Durch Bindung an membranständiges Glykoprotein 130 (gp130) aktiviert HIL-6 die intrazelluläre IL-6 Signaltransduktion, ohne dass der IL-6R membranständig vorliegt (IL-6 trans-*signaling*), weshalb es in dieser Arbeit bevorzugt als Positivkontrolle eingesetzt wurde [101]. Als Negativkontrolle dienten die Lysate unstimulierter Zellen. Für die Stimulation der synthetischen Zytokinrezeptoren wurden in der AG Scheller etablierte synthetische Liganden verwendet [93]. Diese setzen sich aus den fluoreszierenden Proteinen *green fluorescent protein* (GFP) und *mCherry* zusammen, die über den Fc-Teil eines humanen IgG Antikörpers verknüpft wurden [93]. Sie binden an die jeweiligen gegen sie gerichteten *nanobodies* der synthetischen Zytokinrezeptoren. In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Varianten der synthetischen Liganden verwendet (siehe Abb. 9). Diese stimulierten die Untereinheiten der synthetischen Zytokinrezeptoren sowohl als Homo- (GG und CC) als auch als Heterodimere (GCCG, GC).



Abb. 9: Schematischer Aufbau des synthetischen hIFN α -Rezeptors (V_GhIFNAR1 V_ChIFNAR2) mit den verwendeten synthetischen Liganden.

Die extrazelluläre Domäne der Wildtyprezeptoren wurde bis auf 15 Aminosäuren durch gegen synthetische, fluoreszierende Proteine gerichtete *nanobodies* (V_G bzw. V_C) ersetzt. In grün ist der gegen GFP gerichtete *nanobody* dargestellt, in rot der gegen mCherry gerichtete. Die synthetischen Liganden setzen sich aus den jeweiligen grün- bzw. rot fluoreszierenden Proteinen GFP (grün) und mCherry (rot) zusammen. Die Proteine wurden mit dem Fc-Teil von humanen IgG-Antikörpern fusioniert und bilden Hetero- (GC) und Homodimere (GG, CC), bzw. Tetramere (GCCG) [93].

Nach Stimulation der HEK293 Zellen wurden deren Lysate unter Verwendung von gegen pSTAT1, STAT1, pSTAT2, STAT2, pSTAT3, STAT3, pSTAT5, STAT5, HA und myc gerichteten Antikörper mittels Western Blot analysiert (siehe Punkt 2.4.2). Durch die gegen nichtphosphorylierte STAT-Proteine gerichteten Antikörper wurde die vom Lysat aufgetragenen Menge kontrolliert. Der Nachweis von HA und myc repräsentiert die Rezeptorexpression.



Abb. 10: Die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges der synthetischen hIFNα-Rezeptoren und der mIFNα-Rezeptoren ist vergleichbar.

HEK293 Zellen wurden 30 Stunden nach erfolgter Transfektion bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Nach einem Mediumswechsel mit FCS-freiem Medium wurden sie für weitere 16 bis 20 Stunden unter gleichen Bedingungen inkubiert (*starving*). Vor Herstellung der Zelllysate erfolgte eine Stimulation der Zellen für 30 Minuten mit 10 ng/ml HIL-6 und 100 ng/ml der jeweiligen synthetischen Liganden. Nach Herstellung der Zelllysate wurden diese mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse ausgewertet. Bei der SDS-PAGE wurden pro Spur 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Für die Western Blot Analyse wurden gegen pSTAT1, STAT1, HA und myc (n=3) sowie gegen pSTAT2, STAT2, pSTAT3, STAT3, pSTAT5 und STAT5 (n=1) gerichtete Antikörper verwendet. Marker: PageRuler[™] Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA.

Die Stimulation mit HIL-6 diente als Positivkontrolle und induzierte bei beiden Zelllinien durch Bindung an den Rezeptor gp130 auf der Oberfläche der HEK293 Zellen eine Phosphorylierung von STAT1, STAT3 sowie STAT 5. Die Bindung des Liganden GCCG induzierte bei beiden Rezeptoren eine Phosphorylierung von STAT1, STAT2 und STAT3, nicht jedoch von STAT5. Eine Stimulation mit GG resultierte bei keinem Rezeptor in einer Phosphorylierung eines der STAT-Proteine. Die Liganden CC und GC induzierten bei beiden Rezeptoren eine Phosphorylierung der STAT-Proteine 1, 2 und 3. GC induzierte, neben HIL-6, als einziger Ligand beim humanen Rezeptor eine Phosphorylierung von STAT5. Die Ergebnisse der Analyse lassen darauf schließen, dass bei Stimulation der synthetischen mIFNα- und hIFNα-Rezeptoren im Allgemeinen eine vergleichbare Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges stattfindet (siehe Abb. 10). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse vorheriger Forschungsarbeiten [2], die die analoge Signaltransduktion von synthetischen mIFNα-Rezeptoren und Wildtyp mIFNα-Rezeptoren zeigten, kann somit schlussfolgernd angenommen werden, dass die Signaltransduktion der synthetischen hIFNα-Rezeptoren ebenfalls vergleichbar mit der Signaltransduktion der Wildtyp-Rezeptoren ist. Interessanterweise zeigte sich, dass auch durch die Stimulation der Rezeptoren mit dem synthetischen Liganden CC erzeugte Homodimere der IFNAR2 Untereinheiten eine Aktivierung der STAT1 und STAT2 Proteine hervorriefen. Dies legt nahe, dass die Stimulation eines IFNAR2-Homodimers ebenfalls zu einer Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges führt. Synthetisch erzeugte Homodimere der IFNAR1 Untereinheiten (vgl. Stimulation mit GG) waren hingegen dazu nicht in der Lage. HIL-6 wurde als Stimulationskontrolle verwendet und aktivierte mit Ausnahme von STAT2 alle anderen STAT-Proteine mit unterschiedlicher Intensität.

3.1.3 Erzeugung von stabilen Ba/F3-gp130 Zellen mit Expression synthetischer humaner Typ I IFN-Rezeptoren

Die Ergebnisse der Stimulation transient transfizierter Zellen wurden im nächsten Schritt in stabil transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen überprüft. Diese lagen bereits in der AG Scheller vor. Bei Ba/F3-gp130 Zellen handelt es sich um murine pro-B-Lymphozyten, die durch nachträgliche genetische Modifikation gp130-Rezeptoren exprimieren [95]. Durch diese genetische Modifikation sind Ba/F3-gp130 Zellen in der Lage, faktorabhängig durch Stimulation mit HIL-6 zu proliferieren [100]. Ba/F3-gp130 Zellen wurden zunächst mit der Rezeptor-DNA retroviral transduziert. Für die retrovirale Transduktion wurde die cDNA zuvor in den retroviralen pMOWS-puro-Vektor kloniert (siehe Abb. 11). Der hierfür verwendete Vektor pMOWS-puro lag in gespaltener (Pmel) und dephosphorylierter Form in der AG Scheller vor. Das Ligationsprodukt wurde in chemisch kompetente E. coli XL-1 blue Zellen transformiert (siehe Punkt 2.2.1) und mittels colony PCR kontrolliert (siehe Punkt 2.2.2). Die Plasmid-DNA putativer Klone wurde mittels Mini-Präparation isoliert (siehe Punkt 2.2.3) und durch Restriktionsanalyse überprüft (siehe Punkt 2.2.8). Die Plasmid-DNA der in der Restriktionsanalyse korrekten Bakterienkolonien wurde mittels Midi-Präparation isoliert (siehe Punkt 2.2.3). Abschließend wurde die in der Midi-Präparation isolierte Plasmid-DNA mit Hilfe einer Restriktion durch drei verschiedene Enzyme auf ihre Korrektheit überprüft (siehe Abb. 11).





pcDNA3.1-SyCyR-V_chIFNAR2-2A-V_GhIFNAR1 wurde mit Pmel geschnitten. Das *insert* wurde mit dem Vektor pMOWS-puro, der in der AG Scheller vorlag, ligiert (siehe Punkt 2.2.6). Das klonierte Plasmid wurde als pMOWS-puro-SyCyR-V_chIFNAR2-2A-V_GhIFNAR1 bezeichnet. Chemisch kompetente *E. coli* XL-1 blue Zellen wurden mit dem Ligationsprodukt transformiert und putative Klone mittels *colony* PCR analysiert. Die Plasmid-DNA der korrekten Klone wurde mittels Midi-Präparation isoliert und durch je drei Restriktionsenzyme gespalten (XhoI 1041 + 7073 bp; XbaI 1338 + 6776 bp; HindIII 1962 + 6152 bp). Als Kontrolle diente das ungespaltene Plasmid (Kontrolle). Die Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Bei den verwendeten Markern handelte es sich um GeneRuler Express DNA Ladder (rechts) und GeneRuler[™] DNA Ladder (links), Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA.

Das Plasmid wurde erfolgreich kloniert und als pMOWS-puro-SyCyR-V_chIFNAR2-2A-V_GhIFNAR1 bezeichnet. Abschließend erfolgte eine Testexpression der Rezeptorproteine in transient transfizierten HEK293T Zellen (siehe Punkt 2.3.2). Hierbei wurden deren Zelllysate mittels Western Blot Analyse (siehe Punkt 2.4.3) im Hinblick auf Expression der Rezeptoranteile analysiert. Für die Auswertung wurden gegen den in der Expressionskassette vorhandenen HAund myc-*tag* gerichtete Antikörper verwendet. Als Negativkontrolle wurden Zelllysate von mit pEGFP und pMOWS-puro-GFP transfizierten, bzw. von untransfizierten HEK293T Zellen (K) verwendet (siehe Abb. 12).





HEK293T Zellen wurden transient mit der Rezeptor-DNA der synthetischen hIFNα-Zytokinrezeptoren im retroviralen pMOWS-puro-Vektor transfiziert. Gleiche Proteinmengen der Zelllysate wurden auf SDS-Gele aufgetragen (50 µg/Spur) und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Als Negativkontrolle dienten mit pEGFP und pMOWS-puro-GFP transfizierte Zellen, sowie untransfizierte Zellen (K). Als Marker wurde PageRulerTM Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA verwendet.

Die Ergebnisse zeigten sowohl für die mit α-myc als auch für die mit α-HA behandelten Membranen die entsprechenden Proteinbanden, deren Molekulargewicht unter Berücksichtigung posttranslationaler Glykosylierungen dem der synthetischen hIFNAR-Untereinheiten entsprach. Dies zeigt, dass beide Rezeptoruntereinheiten von den HEK293T Zellen exprimiert wurden. Im nächsten Schritt wurden Ba/F3-gp130 Zellen stabil mit der Rezeptor-cDNA transduziert, um hier sowohl die Signaltransduktion als auch das ligandenabhängige Proliferationsverhalten der Zellen zu untersuchen (siehe Punkt 2.3.3).

Die Rezeptorexpression auf den Ba/F3-gp130 Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie (siehe Punkt 2.3.6) überprüft (siehe Abb. 13). Hierfür wurden gegen den mit den Rezeptoruntereinheiten verbundenen HA- und myc-*tag* gerichtete Antikörper verwendet. Während das grau hinterlegte Histogramm die nativen Ba/F3-gp130 Zellen repräsentierte, wurden die mit den jeweiligen Rezeptoren versehenen Ba/F3-gp130 Zellen durch die schwarzen Histogramme dargestellt. Es war in allen Histogrammen eine deutliche Verschiebung der schwarzen Histogramme auf der Abszisse (Fluroeszenzintensität) nach rechts erkennbar. Dies ist mit einer erhöhten Emission von Fluoreszenz, ausgelöst durch die an die synthetischen Rezeptoren gebundenen fluoreszierenden Antikörper, zu begründen. Die Menge der exprimierten Rezeptoren ist proportional zur Stärke der gemessenen Fluoreszenz, da die fluoreszierenden Antikörper an die synthetischen Rezeptoren binden. Die Ergebnisse der Analyse veranschaulichen demnach, dass beide Rezeptoruntereinheiten des synthetischen mIFNα-Rezeptoren zeigte sich ein heterogenes Bild, wonach die hIFNAR2-Untereinheit scheinbar stärker auf der Zelloberfläche exprimiert wurde als die hIFNAR1-Untereinheit.



Abb. 13: Synthetische mIFNα- und hIFNα-Rezeptoren werden auf der Oberfläche von Ba/F3-gp130 Zellen exprimiert.

Nach Zugabe von spezifischen Antikörpern wurden die Ba/F3-gp130 Zellen mittels Durchflusszytometrie auf Fluoreszenz untersucht. Die Ergebnisse wurden als Histogramme dargestellt. Auf der Ordinatenachse ist die bei jeweiliger Fluoreszenzstärke gemessene Zellzahl aufgetragen, auf der Abszissenachse wird die Fluoreszenzstärke abgebildet. Als Negativkontrolle wurden nicht transduzierte Ba/F3-gp130 Zellen verwendet. Sie wurden in der Auswertung als graues Histogramm dargestellt. Als schwarze Histogramme wurden die mit den jeweiligen Rezeptoren transduzierten Zellen dargestellt. Je größer die Verschiebung der jeweiligen schwarz umrandeten Kurve nach rechts war, desto mehr Rezeptoren wurden auf der Zelloberfläche detektiert. Das Experiment wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. rer. nat. Doreen Manuela Floß durchgeführt. (n=1)

3.1.4 Die Stimulation von synthetischen hIFNα-Rezeptoren führt in stabil transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen zu einer Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges.

Zur Analyse der faktorabhängigen Ba/F3-gp130 Zellen wurde deren Zellproliferation nach Stimulation durch synthetische Liganden untersucht (siehe Punkt 2.3.5). Zur Stimulation wurden die synthetischen Liganden GCCG, GG, CC und GC verwendet. Ba/F3-gp130 Zellen können durch ihre zusätzlichen gp130 Rezeptoren nicht nur IL-3-abhängig proliferieren, die durch Bindung von HIL-6 an membranständiges gp130 ausgelöste IL-6 Signalkaskade führt ebenfalls zur Proliferation der Zellen. Daher wurde HIL-6 (10 ng/ml) als Positivkontrolle verwendet. Als Negativkontrolle dienten nicht-transduzierte Ba/F3-gp130 Zellen sowie je eine unstimulierte Variante der transduzierten Zellen (siehe Abb. 14).



Abb. 14: Stabil transduzierte Ba/F3-gp130 Zelllinien zeigen keine ligandenabhängige Proliferation.

Stabil transduzierte Ba/F3-gp130 Zellen wurden für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ mit den synthetischen Liganden in einer Konzentration von 100 ng/ml stimuliert. Die Proliferation wurde mit CellTiter Blue (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) detektiert. Als Positivkontrolle diente HIL-6 (10 ng/ml). Die Negativkontrolle bildeten unstimulierte Zellen, sowie untransduzierte Ba/F3-gp130 Zellen. Das Diagramm zeigt die Proliferation untransduzierter Ba/F3-gp130 Zellen sowie von mit den synthetischen mIFN α - und hIFN α -Rezeptoren transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen nach Ligandenbindung. Auf der Abszissenachse sind die Zelllinien mit den jeweils verwendeten Liganden aufgetragen, auf der Ordinatenachse die detektierte Fluoreszenz lebender Zellen. Von dem dreifach durchgeführten Experiment ist ein repräsentatives Ergebnis gezeigt (n=3).

Keine der Zelllinien zeigte eine ligandenabhängige Proliferation. Da bereits 1999 beschrieben wurde, dass die Aktivierung von Interferonen die Proliferation von Ba/F3 Zellen inhibiert, war dieses Resultat zu erwarten [102]. In einer vorhergegangenen Arbeit der AG Scheller zu den synthetischen mIFNα-Rezeptoren führte die Stimulation der Wildtyprezeptoren mit natürlichen Liganden ebenfalls zu keiner Proliferation (de Vos, Frederik, Dissertation, bisher nicht veröffentlicht).

Um darzustellen, welche Signalwege durch die Stimulation der synthetischen Rezeptoren aktiviert werden, wurde ein Stimulationsassay durchgeführt (siehe Punkt 2.3.4). Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Mit HIL-6 stimulierte Zellen wurden als Positivkontrolle verwendet. GCCG, GG und CC wurden als synthetische Liganden eingesetzt. Die Zelllysate wurden durch Western Blot Analyse mit gegen pSTAT1, STAT1, pSTAT2 und STAT2 gerichteten Antikörpern untersucht. Hierbei dienten unphosphorylierte STAT-Proteine der Kontrolle, ob von allen Zelllysaten vergleichbare Proteinkonzentrationen aufgetragen wurden. Durch die gegen pSTAT1 und pSTAT2 gerichteten Antikörper war eine Kontrolle der aktivierten Signaltransduktion möglich (siehe Abb. 15).



Abb. 15: Die aktivierten Signalkaskaden von synthetischen mIFNα- und hIFNα-Rezeptoren sind vergleichbar.

Die transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen wurden für 30 Minuten mit den Liganden HIL-6, GCCG, GG und CC stimuliert. HIL-6 wurde mit einer Konzentration von 10 ng/ml verwendet, die synthetischen Liganden mit einer Konzentration von 100 ng/ml. Nach Ernte wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Die Zelllysate wurden erstellt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Für die SDS-PAGE wurden je 50 µg Protein pro Spur aufgetragen. Die bei der Western Blot Analyse verwendeten Antikörper waren gegen pSTAT1, STAT1, pSTAT2 und STAT2 gerichtet (n=3). PageRulerTM Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA wurde als Proteinmarker verwendet.

Für pSTAT1 ist nur bei HIL-6, GCCG und CC die Aktivierung von STAT1 nachweisbar. Die Stärke der Aktivierung ist bei beiden Western Blots vergleichbar. Die Aktivierung von α-pSTAT2 ist für GCCG beim synthetischen hIFNAR stärker und für CC schwächer ausgeprägt als beim synthetischen mIFNAR. Dies legt nahe, dass die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs beider Rezeptoren besonders im Hinblick auf die STAT1-Aktivierung vergleichbar ist. Lediglich in der Intensität der Aktivierung von STAT2 durch die Liganden GCCG beziehungsweise CC zeigten sich leichte Unterschiede. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der Signaltransduktionsanalyse sowohl von transient transfizierten als auch von stabil transduzierten Zellen, dass die Signalkaskaden beider Rezeptoren nach Aktivierung durch einen synthetischen Liganden miteinander vergleichbar sind. Dies spiegelte sich auch in der fehlenden Proliferation wider. Interessanterweise wurde in beiden Zellmodellen deutlich, dass die Aktivierung durch den Liganden CC zu einer Signaltransduktion führt. Dies lässt vermuten, dass auch synthetisch erzeugte Homodimere aus den Rezeptoruntereinheiten IFNAR2 in der Lage sind, die Signaltransduktion zu aktivieren.

Durch die Ergebnisse wurde die Phänokopie von synthetischen mIFNAR durch synthetische hIFNAR in Bezug auf die Aktivierung von STAT1 und STAT2 sowie auf das fehlende Proliferationsverhalten gezeigt. Außerdem wurde eine Aktivierung der Signalkaskade durch synthetisch erzeugte Homodimere aus IFNAR2-Untereinheiten beobachtet. Weiterführende Untersuchungen zu den synthetischen hIFNα-Rezeptoren sollten sich mit der Aktivierung von STAT3 und STAT5 Proteinen befassen. Hier muss geprüft werden, ob die Aktivierung von STAT3 und STAT5-Proteinen durch die synthetischen hIFNα-Rezeptoren generell stattfindet, aber möglicherweise bei transient transfizierten Zellen nicht detektierbar ist. Hierzu müssen die stabil mit dem Rezeptor transduzierten Zellen erneut stimuliert und auf diese Anteile der Signaltransduktion hin untersucht werden. Sollte bei diesem Versuch eine Aktivierung der STAT3 und STAT5 Proteine detektiert werden können, wie es in der vorherigen Arbeit zu diesem Thema der Fall war (de Vos, Frederik, Dissertation, bisher nicht veröffentlicht), würde dies die Analogie der Signaltransduktionen vom synthetischen mIFNAR und hIFNAR mit der des Wildtyp mIFNARs weiter bestätigen.

3.2 Mutationsvarianten des synthetischen mIFNα-Rezeptors zeigen unterschiedliche Aktivierungen des JAK/STAT-Signalweges.

In einer Reihe von wissenschaftlichen Veröffentlichungen zu den intrazellulären Tyrosinresten der IFNARs wurde beschrieben, dass Mutationen in diesen Bereichen zu Änderungen der Signaltransduktion führten, wobei die Tyrosine Y335 und Y510 der mIFNAR2 Untereinheit hierbei eine besonders wichtige Rolle spielten [86-92]. Um die teils widersprüchlichen Ergebnisse im Hinblick auf die JAK/STAT-Signalkaskade zu verifizieren, wurden verschiedene Mutationsvarianten des synthetischen mIFNAR erstellt. Das in der AG Scheller etablierte System der synthetischen Zytokinrezeptoren wurde für die erneute Untersuchung dieser Thematik als besonders geeignet befunden, da das System es ermöglicht, die Signaltransduktion ohne Hintergrundaktivitäten zu untersuchen und so eventuelle Änderungen der Signalkaskade präziser darzustellen [1]. Für die Untersuchung der Mutationsvarianten des synthetischen mIFNAR wurden im Rahmen einer vorausgegangenen Doktorarbeit Plasmide erstellt (de Vos, Frederik, Dissertation, bisher nicht veröffentlicht). Die Mutationen befanden sich an verschiedenen intrazellulär gelegenen Aminosäuren der IFNAR1 bzw. IFNAR2 Untereinheit des Rezeptors. Zwischen der Aminosäurensequenz der in den Publikationen beschriebenen hIFNAR und der der hier verwendeten mIFNAR bestehen geringfügige Unterschiede. Daher wurden in der vorausgegangenen Arbeit zunächst die Aminosäurensequenzen beider Rezeptoren verglichen (siehe Anhang) (de Vos, Frederik, Dissertation, bisher nicht veröffentlicht). So konnte gewährleistet werden, dass die Mutationen an den Positionen vorgenommen wurden, die den in den wissenschaftlichen Publikationen beschriebenen Mutationen entsprachen. Einen grafischen Überblick über die intrazellulären Tyrosine von mIFNAR und hIFNAR bietet Abb. 16.



Abb. 16: Schema der intrazellulären Tyrosine des synthetischen mIFNAR und hIFNAR

Schematische Darstellung der intrazellulären Tyrosine der mIFNAR1 und mIFNAR2 Rezeptoruntereinheit (A) sowie der hIFNAR1 und hIFNAR2 Rezeptoruntereinheit (B) sowie Gegenüberstellung der in murinem und humanem Rezeptor homologen Tyrosinreste in einer Tabelle (C), angelehnt an [2].

3.2.1 Die Mutationsvarianten des synthetischen mIFNα-Rezeptors werden von eukaryotischen Zellen exprimiert.

Vor der Expressionskontrolle der Mutationsvarianten in HEK293T Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine weitere Variante erstellt. In der Literatur wurde der Aminosäure Valin an der Position 467 eine wichtige Bedeutung für die Bindung von STAT2 an den hIFNAR1 zugeschrieben, da nach Austausch der Aminosäure Valin durch Alanin eine stark verringerte Aktivierung der Signaltransduktion beobachtet wurde [90]. Da sich die Veröffentlichung auf den humanen IFNAR1 bezieht, wurde zunächst eine Analyse der sich geringfügig unterscheidenden Aminosäurensequenzen der humanen und murinen IFNAR1 vorgenommen (siehe Anhang). So konnte die im murinen IFNAR1 korrespondierende Aminosäure ausfindig gemacht werden, die sich an Position 459 befand. Die gewünschte Mutation fand mittels *site directed mutagenesis* PCR statt (siehe Punkt 2.2.2). Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Mini-Präparation mit dem Kit *Genejet Miniprep Plasmid Scientific Kit* (Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) isoliert und mit Hilfe einer Restriktionsanalyse kontrolliert. Die korrekten Klone wurden abschließend zusätzlich von einem externen Labor sequenziert. Die Plasmid-DNA der sequenzierten Klone wurde

vervielfältigt und mittels Midi-Präparation isoliert (siehe Punkt 2.2.3). Zur Kontrolle erfolgte eine Restriktionsanalyse mit Spel (5576 + 2259 bp), HindIII (7835 bp) und EcoRV (5340 + 2495 bp) (siehe Abb. 17).



Abb. 17: Klonierung der Mutationsvariante pcDNA3.1-SyCyR-VcmIFNAR2-2A-VgmIFNAR1-V459A.

Für die *site directed mutagenesis*-PCR (siehe Punkt 2.2.2) wurde ein *primer* mit der gewünschten Mutation erstellt. Durch PCR wurde die Mutation in die Plasmid-DNA eingebaut und vervielfältigt. Mittels DpnI-Verdau wurde der methylierte Vektor mit der Wildtyp-DNA aus dem DNA-Gemisch entfernt, sodass nur das mutierte PCR-Produkt zurückblieb. Die Plasmid DNA wurde in chemisch kompetente E. *coli* XL-1 blue Zellen transformiert. Die Plasmid-DNA wurde isoliert und nach Restriktionsanalyse im Agarosegel getrennt. (pcDNA3.1-SyCyR-VcmIFNAR2-2A-VgmIFNAR1-V459A + SpeI (5576 + 2259 bp); + HindIII (7835 bp); + EcoRV(5340 + 2495 bp)). Als Marker wurde GeneRuler Express DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA verwendet.

Nach erfolgreicher Synthese des Plasmids pcDNA3.1-SyCyR-V_cmIFNAR2-2A-V_GmIFNAR1-V459A wurde eine Testexpression in HEK293T Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen transient mit dem Plasmid transfiziert (siehe Punkt 2.3.2) und deren Zelllysate im Western Blot analysiert (siehe 2.4.3). Zur Expressionskontrolle beider Rezeptoruntereinheiten wurden gegen den mycund HA-*tag* gerichtete Antikörper verwendet (siehe Abb. 18).



Abb. 18: Die Mutationsvariante pcDNA3.1-SyCyR-V $_{c}$ mIFNAR2-2A-V $_{G}$ mIFNAR1-V459A wird von HEK293T Zellen exprimiert.

(A) HEK293T Zellen wurden mit der Rezeptor-DNA und den Kontrollplasmiden transient transfiziert. Es wurden Zelllysate hergestellt, gleiche Proteinmengen auf SDS-Gele aufgetragen (50 μ g/Spur) und mittels Western Blot analysiert. Als Negativkontrolle dienten mit pEGFP transfizierte Zellen, als Positivkontrolle mit dem Wildtyp (pcDNA3.1-SyCyR-V_cmIFNAR2-2A-V_GmIFNAR1) transfizierte Zellen. Als Marker diente PageRulerTM Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA.

Weiterhin wurden HEK293T Zellen mit den bereits aus einer vorherigen Arbeit der AG Scheller vorliegenden Mutationsvarianten transfiziert, um deren Expression ebenfalls zu verifizieren (siehe Abb. 19).



Abb. 19: Die vorhandenen Mutationsvarianten werden von HEK293T Zellen exprimiert.

HEK293T Zellen wurden transient mit der Rezeptor-DNA der dargestellten Mutationsvarianten transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und gleiche Proteinmengen auf SDS Gele aufgetragen (50 μg/Spur). Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung der Antikörper gegen HA und myc. Als Negativkontrolle dienten mit pEGFP transfizierte Zellen sowie untransfizierte Zellen (Kontrolle), als Positivkontrolle mit dem Wildtyp (pcDNA3.1-SyCyR-V_cmIFNAR2-2A-V_GmIFNAR1) transfizierte Zellen. PageRulerTM Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA wurde als Marker verwendet.

Beide Rezeptoranteile aller Mutationsvarianten der synthetischen murinen IFNAR wurden von den HEK293T Zellen exprimiert. Das Molekulargewicht des mIFNAR1-Rezeptoranteils der Variante pcDNA3.1-SyCyR-V_cmIFNAR2-2A-V_GmIFNAR1 Δ16aa war durch die Deletion von 16 Aminosäuren in diesem Bereich erwartbar geringer als das der übrigen Varianten. Nachdem die Expression beider Rezeptoranteile bei allen Mutationsvarianten des synthetischen mIFNARs in eukaryotischen Zellen überprüft war, wurde im nächsten Schritt deren Signaltransduktion untersucht.

3.2.2 Die Stimulation verschiedener Mutationsvarianten der synthetischen mIFNα-Rezeptoren führt zu einer Änderung der Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges in transient transfizierten, eukaryotischen Zellen

Humane HEK293 Zellen wurden transient mit der Plasmid-DNA der unter Punkt 3.2 sowie Punkt 3.2.1 aufgeführten Varianten transfiziert (siehe Punkt 2.3.2). Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit den synthetischen Liganden stimuliert (siehe 2.3.4). Ziel der Stimulation war es, die in der Literatur beschriebenen Änderungen der Signaltransduktion zu verifizieren (siehe 3.2). Als synthetische Liganden zur Stimulation wurden GCCG und CC ausgewählt, da nur

diese in den zuvor durchgeführten Experimenten mit pcDNA3.1-SyCyR-V_CmIFNAR2-2A-V_GmIFNAR1 die Signalkaskade auslösen konnten (siehe Punkt 3.1.2). Die Stimulation von Homodimeren der IFNAR2 Untereinheit durch den Liganden CC führte zur Aktivierung der JAK/STAT-Signalkaskade, während GCCG diese nach Heterodimerisierung der Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 auslöste (siehe 3.1.4). Der synthetische Ligand GG, der zur Stimulation von IFNAR1 Homodimeren führen sollte, zeigte keine Aktivierung der Signaltransduktion und wurde daher für die folgenden Stimulationen nicht eingesetzt. Die verwendeten Liganden lagen bereits aus anderen Forschungsarbeiten in der AG Scheller vor [93]. Als Negativkontrolle dienten Zelllysate unstimulierter Zellen, während als Positivkontrolle Zelllysate von mit HIL-6 (10ng/ml) stimulierten Zellen verwendet wurden. Für die Auswertung wurden gegen HA, myc, STAT1 und pSTAT1 gerichtete Antikörper verwendet (siehe Abb. 20).



Abb. 20: Die Stimulation der Mutationsvariante V_GmIFNAR1 V_CmIFNAR2 Y335F Y510F führt zu einer verminderten Aktivierung von pSTAT1.

Nach transienter Transfektion mit den jeweiligen Plasmiden wurden die HEK293 Zellen für 30 Stunden bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumswechsel mit FCS-freiem DMEM sowie eine erneute Inkubation für 16 bis 20 Stunden bei 5% CO₂ und 37°C. Die Stimulation erfolgte für 30 Minuten vor dem Herstellen der Zelllysate mit den synthetischen Liganden (100 ng/ml) und der Positivkontrolle HIL-6 (10 ng/ml). Es wurden Zelllysate hergestellt und mittels SDS-PAGE und Western Blot (50 µg Protein pro Spur) analysiert. Für die Analyse wurden die Antikörper gegen pSTAT1, STAT1, HA und myc verwendet. Als Marker diente PageRuler[™] Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA (n=3; Variante V459A n=1).

Während α -myc und α -HA dazu dienten, die Expression der Rezeptoranteile zu kontrollieren, wurden die gegen STAT1 gerichteten Antikörper dazu verwendet, die aufgetragene Proteinmenge zu vergleichen. Mit α -pSTAT1 wurde das Vorhandensein und die Stärke der aktivierten Signaltransduktion detektiert. Die Expression des synthetischen Wildtyprezeptors (V_GmIFNAR1+V_CmIFNAR2) wurde in HEK293 Zellen bereits in vorhergegangenen Experimenten nachgewiesen (siehe Abb. 10). Die in Abb. 20 bei α -myc ersichtlichen Banden belegen die Expression der IFNAR1 Untereinheit. Durch die 2A-Technik kann davon ausgegangen werden, dass auch die IFNAR2 Untereinheit exprimiert wurde. Nach Stimulation der Mutationsvariante V_{G} mIFNAR1+ V_{C} mIFNAR2 Y335F Y510F mit GCCG und CC wurde eine im Vergleich zum Wildtyp verminderte STAT1-Aktivierung beobachtet. Der Ligand CC zeigte bei den Tyrosinmutationen der IFNAR1-Untereinheit keine Änderung der Signaltransduktion. Da dieser Ligand zur Homodimerisierung der in diesem Fall nicht von der Mutation betroffenen IFNAR2-Untereinheit führt, war dieses Ergebnis zu erwarten. Zur Verifizierung der beobachteten und zur Detektion weiterer Veränderungen in der Signalkaskade nach Stimulation mit den synthetischen Liganden bestand der nächste Schritt darin, stabil transduzierte Ba/F3-gp130 Zellen zu erstellen, um hier die Signaltransduktion zu analysieren.

3.2.3 Herstellung von stabilen Ba/F3-gp130 Zellen mit Expression der Mutationsvarianten der synthetischen Rezeptoren

Zunächst wurden die Plasmide der Mutationsvarianten in den retroviralen Vektor pMOWSpuro kloniert (siehe Abb. 21). Hierfür wurde das Ausgangsplasmid mit Pmel verdaut, das entstandene *insert* extrahiert (siehe Punkt 2.2.5) und mit dem bereits linearisierten Vektor pMOWS-puro ligiert (siehe Punkt 2.2.6). Der verwendete Vektor lag bereits in der AG Scheller vor.



Abb. 21: Klonierungsschema für die Plasmide der analysierten Mutationsvarianten.

Die für den Rezeptor kodierende cDNA aller Mutationsvarianten (hier repräsentativ als pcDNA3.1-SyCyR-VcmIFNAR2-2A-VGmIFNAR1 bezeichnet) wurde durch restriktive Spaltung mit Pmel aus dem Plasmid entfernt. Sie wurde mit dem vorliegenden linearisierten Vektor pMOWS-puro zum Plasmid pMOWS-puro-SyCyR-VcmIFNAR2-2A-VGmIFNAR1 ligiert.

Die Ligationsprodukte wurden in chemisch kompetente *E. coli* XL-1 blue Zellen transformiert (siehe Punkt 2.2.1). Putative Klone wurden mittels *colony* PCR ermittelt (siehe Punkt 2.2.2). Mittels Plasmid-DNA-Mini-Präparation (siehe Punkt 2.2.3) wurde die Plasmid-DNA der putativen Klone isoliert und durch Restriktionsanalyse mit Xhol überprüft (siehe Punkt 2.2.8).

Durch Midi-Präparation wurde die DNA der putativen Klone in größerer Menge isoliert (siehe Punkt 2.2.3) und mit dreifacher Restriktionsanalyse durch die Enzyme Xhol (1154 + 7076 bp), HindIII (2075 + 6142 bp) sowie Xbal (1331 + 6886 bp) überprüft (siehe Punkt 2.2.8) (siehe Abb. 22).





Zur Überprüfung der DNA-Midi-Präparation wurden alle Klone mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen Xhol (1154 + 7076 bp), HindIII (2075 + 6142 bp) und Xbal (1331 + 6886 bp) gespalten. Als Kontrolle wurden die unverdauten Plasmide 10-fach verdünnt und aufgetragen (Kontrolle). Als Marker wurde GeneRuler[™] DNA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA verwendet.

3.2.4 Die Mutationsvarianten der synthetischen Rezeptoren werden auf der Oberfläche von Ba/F3-gp130 Zellen exprimiert.

Zur Verifikation der beobachteten Veränderung der Signaltransduktion nach Stimulation der Variante V_GmIFNAR1+V_CmIFNAR2 Y335F Y510F (siehe Punkt 3.2.2) und zur weiteren Analyse aller erzeugten Mutationsvarianten, wurden Ba/F3-gp130 Zellen stabil transduziert. Anschließend wurde die Rezeptorexpression auf den Zelloberflächen mittels Durchflusszytometrie (siehe Punkt 2.3.6) überprüft.



Abb. 23: Synthetische, murine Typ I IFN-Rezeptorvarianten werden auf der Oberfläche von Ba/F3-gp130 Zellen exprimiert.

Die zu untersuchenden Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern versehen. Anschließend wurden sie mit Hilfe von Durchflusszytometrie auf ihre Fluoreszenz hin untersucht. Die Ergebnisse wurden als Histogramme dargestellt. Auf der Ordinatenachse ist die bei jeweiliger Fluoreszenzstärke gemessene Zellzahl aufgetragen, auf der Abszissenachse wird die Fluoreszenzstärke abgebildet. Als Negativkontrolle wurden nicht transduzierte Ba/F3-gp130 Zellen verwendet, die in der Auswertung als graues Histogramm dargestellt sind. Die schwarzen Histogramme stellen die mit den jeweiligen Rezeptoren transduzierten Zellen dar. Je größer die Verschiebung der jeweiligen schwarz umrandeten Kurve nach rechts war, desto mehr Rezeptoren wurden auf der Zelloberfläche detektiert. Das Experiment erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. rer. nat. Doreen Manuela Floß (n=1)

Die Resultate zeigten, dass beide Rezeptoranteile aller Mutationsvarianten auf den Zelloberflächen der Ba/F3-gp130 Zellen exprimiert wurden.

Die so erzeugten Zellen stehen nun für weitere Analysen zur Verfügung. Hierbei liegt das Hauptaugenmerk auf der Bedeutung der einzelnen Tyrosinreste für die Funktionsfähigkeit der erzeugten Rezeptoren. Die Signaltransduktion dieser Zellen konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht mehr analysiert werden und ist Gegenstand hierauf aufbauender Forschung.

3.3 Die Aktivierung synthetischer humaner IFNγ-Rezeptoren mit synthetischen Liganden führt zu einer intrazellulären JAK/STAT-Signaltransduktion.

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag auf der Etablierung des SyCyR-Konzeptes für den hIFNγ-Rezeptor. Dieser stellt in der Interferonfamilie eine Besonderheit dar, da er als einziger Rezeptor als Tetramer mit je zwei Untereinheiten von IFNGR1 und IFNGR2 vorliegt [32, 103]. Das System der synthetischen Zytokinrezeptoren wurde, wie in Punkt 3 für den hIFNα-Rezeptor beschrieben, ebenfalls auf den hIFNG-Rezeptor angewandt. Das Ausgangsplasmid pBS-SyCyR-V_chIFNGR2-2A-V_GhIFNGR1 wurde von der Firma BioCat GmbH (Heidelberg, Germany) synthetisiert. Da die Expression der Rezeptoren im nächsten Schritt in eukaryotischen HEK293T Zellen kontrolliert werden sollte, wurde die cDNA, die für die beiden Rezeptorketten codiert, zunächst in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert (siehe Abb. 24 A).



Abb. 24: Klonierung des Plasmids pcDNA3.1-SyCyR-VchIFNGR2-2A-VghIFNGR1.

(A) Beide Ausgangsplasmide wurden mit Pmel verdaut. Die Fragmente wurden ligiert und in chemisch kompetente *E. coli* XL-1 blue Zellen transformiert. (B) Restriktion des Plasmids pcDNA3.1-SyCyR-VchIFNGR2-2A-V_GhIFNGR1 mit EcoRI + HindIII (7220 + 321 bp); EcoRV (5340 + 2201 bp); AfIII und NotI (5353 + 2188 bp) und Ndel + HindIII (6258 + 1283 bp). Als Marker wurde GeneRuler[™] DNA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA verwendet.

Hierfür wurde der Vektor pcDNA3.1-FLAG-HmIL23, der in der AG Scheller bereits vorhanden war (de Vos, Frederik, Dissertation, bisher nicht veröffentlicht), als *backbone* verwendet. Die für die synthetischen Rezeptoranteile und die *nanobodies* codierende cDNA wurde nach enzymatischer Restriktion aus dem Plasmid pBS-SyCyR-V_chIFNGR2-2A-V_GhIFNGR1 entfernt (siehe Punkt 2.2.5) und mit dem ebenfalls durch enzymatische Restriktion isolierten Vektor pcDNA-3.1 ligiert (siehe Punkt 2.2.6). Nach Transformation des Ligationsproduktes in chemisch kompetente *E. coli* XL-1 blue Zellen (siehe Punkt 2.2.1) wurden die Kolonien mittels *colony* PCR

(siehe Punkt 2.2.2) kontrolliert. Putative Klone wurden mit Plasmid-DNA-Mini-Präparation (siehe Punkt 2.2.3) und Restriktionsanalyse (siehe Punkt 2.2.3) weiter überprüft. Schließlich erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA mittels Midi-Präparation (siehe Punkt 2.2.3). Eine abschließende Überprüfung der Plasmide bestand in einer weiteren Restriktionsanalyse mit verschiedenen Restriktionsenzymen, EcoRI + HindIII (7220 + 321 bp); EcoRV (5340 + 2201 bp); AflII und NotI (5353 + 2188 bp) und NdeI + HindIII (6258 + 1283 bp) (siehe Punkt 2.2.8). Das Ergebnis der Restriktionsanalyse ist in Abb. 24 B dargestellt und repräsentiert die erfolgreiche Generierung des Plasmids.

Durch die besondere Struktur des Rezeptors ergaben sich verschiedene Konfigurationen, in denen die natürlichen Rezeptoranteile mit den extrazellulär gelegenen *nanobodies* verknüpft werden konnten (siehe Abb. 25). Im Rahmen weiterer Klonierungsschritte wurde so eine zweite Variante des Rezeptors, pBS-SyCyR-V_chIFNGR1-2A-V_GhIFNGR2, erstellt, bei der die Verknüpfungen zwischen *nanobody* und jeweiliger Rezeptoruntereinheit getauscht wurden (siehe Abb. 25E). Bei dieser Modifikation wurden außerdem zwei weitere Rezeptoren kloniert, die Homodimere der Untereinheiten des hIFNGR darstellten, pBS-SyCyR-V_chIFNGR1-2A-V_GhIFNGR1 bzw. pBS-SyCyR-V_chIFNGR2-2A-V_GhIFNGR2 (siehe Abb. 25 C und D). Diese Homodimere bieten den Vorteil, dass sie, im Gegensatz zu den anderen Varianten, über den heterodimeren Liganden GC aktiviert werden. Über den Liganden GCCG können Tetramere erzeugt werden. Die homodimeren Varianten des synthetischen hIFNGR wurden ebenfalls in die anschließenden Experimente mit einbezogen.

Wildtyp hIFNGR JAK2 JAK2 / JAK1 JAK1 IFNGR2 IFNGR2 IFNGR1 V_chIFNGR2 V_chIFNGR1 V_GhIFNGR1 V_GhIFNGR2 JAK2 JAK2 JAK2 JAK2 / JAK1 / JAK1 JAK1 JAK1 1 IFNGR2 IFNGR2 IFNGR2 IFNGR1 IFNGR2 IFNGR1 V_chIFNGR1 V_chIFNGR2 V_GhIFNGR1 V_GhIFNGR2 IFNGR1 IFNGR1 IFNGR2 IFNGR2 JAK2 JAK2 JAK1 JAK1

Abb. 25: Erzeugung verschiedener Varianten des synthetischen hIFNGR.

Synthetischer IFNGR V_chIFNGR2+V_GhIFNGR1: Die extrazellulären mCherry *nanobodies* (rot) sind mit der IFNGR2 Untereinheit fusioniert, die GFP *nanobodies* (grün) mit der IFNGR1 Untereinheit. V_chIFNGR1 V_GhIFNGR2: Synthetischer IFNGR mit an die IFNGR1 Untereinheit fusioniertem mCherry und an die IFNGR2 Untereinheit fusioniertem GFP *nanobody*. V_chIFNGR1 V_GhIFNGR1: Homodimer aus zwei IFNGR1 Untereinheiten, die jeweils mit einem GFP (grün) und einem mCherry (rot) *nanobody* fusioniert sind. (D) V_chIFNGR2+V_GhIFNGR2: Homodimer aus zwei IFNGR2 Untereinheiten, die jeweils mit einem GFP (grün) und einem mCherry (rot) *nanobody* fusioniert sind.

Als *template* DNA zur Klonierung von pcDNA3.1-SyCyR-V_chIFNGR1-2A-V_GhIFNGR2 wurde pBS-SyCyR-V_chIFNGR2-2A-V_GhIFNGR1 verwendet. Eine Übersicht über die Klonierung liefert Abb. 26.



Abb. 26: Klonierungsschema der Varianten pcDNA3.1-SyCyR-VchIFNGR1-2A-VGhIFNGR1 und pcDNA3.1-SyCyR-VchIFNGR2-2A-VGhIFNGR2 sowie pcDNA3.1-SyCyR-VchIFNGR1-2A-VGhIFNGR2

(A) Die *primer* DF676 und DF677 führten bei der PCR zur Amplifikation der für hIFNGR1 codierenden cDNA. Diese wurde in den pCR-Script-Vektor ligiert. Nach Transformation und Extraktion der Plasmid-DNA wurde diese mit EcoRI und HindIII gespalten. Das entstandene Fragment (hIFNGR1) wurde nun mit dem Vektor pcDNA3.1-SyCyR-V_c2A-V_GhIFNGR1 zu pcDNA3.1-SyCyR-V_chIFNGR1-2A-V_GhIFNGR1 ligiert. (B) Durch die Primer DF678 und DF679 wurde das Fragment für hIFNGR2 amplifiziert. Dieses wurde in den pCR-Script-Vektor ligiert. Nach Transformation und Extraktion der Plasmid-DNA wurde diese mit Xhol und NotI verdaut. Das entstandene *insert* (hIFNGR2) wurde mit dem Vektor pcDNA3.1-SyCyR-V_chIFNGR2-2A-V_G zu pcDNA3.1-SyCyR-V_chIFNGR2-2A-V_G bIFNGR2 ligiert. (C) pcDNA3.1-SyCyR-V_c2A-V_GhIFNGR2 (siehe B) wurde mit EcoRI und HindIII gespalten und mit dem enzymatisch gespaltenen Fragment für hIFNGR1 aus Abbildungsteil A ligiert, um das Plasmid pcDNA3.1-SyCyR-V_chIFNGR2 zu erhalten.

Durch PNK-Behandlung wurden die 5' Enden des per PCR amplifizierten Fragments phosphoryliert, um die anschließende Ligation mit dem Vektor pCR-Script zu erleichtern (siehe

Punkt 2.2.9). Die in pcDNA3.1 klonierte Expressionskassette SyCyR-V_chIFNGR2-2A-V_GhIFNGR1 wurde durch Restriktionsenzyme gespalten und das gewünschte Fragment extrahiert (siehe Punkt 2.2.5). Die Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass im Fall von Reaktion A der Abschnitt des hIFNGR2 und bei Reaktion B der Abschnitt des hIFNGR1 aus dem Plasmid entfernt wurde. An deren Stelle wurden im nächsten Schritt die zuvor isolierten Fragmente des hIFNGR1 (im Fall von Reaktion A) beziehungsweise des hIFNGR2 (im Fall von Reaktion B) mit dem Vektor ligiert (siehe Punkt 2.2.6). Durch diese Vorgehensweise entstanden die beiden Plasmide pcDNA3.1-SyCyR-VchIFNGR1-2A-VghIFNGR1 und pcDNA3.1-SyCyR-VchIFNGR2-2A-VghIFNGR2, die für mögliche Homodimere der hIFNGR Untereinheiten codieren. Um im letzten Schritt die Klonierung des Plasmids pcDNA3.1-SyCyR-V_chIFNGR1-2A-V_GhIFNGR2 zu ermöglichen, wurden die Varianten für die Homodimere erneut enzymatisch gespalten und die gewünschten Fragmente ligiert (siehe Punkt 2.2.6). Jedes bei dieser Versuchsreihe entstandene Ligationsprodukt wurde zunächst in *E. coli XL*-1 blue Zellen transformiert (siehe Punkt 2.2.1) und die Kolonien wurden mittels colony PCR (siehe Punkt 2.2.2) überprüft. Die Isolation der Plasmid-DNA putativer Klone erfolgte zunächst mittels Plasmid-DNA-Mini-Präparation (siehe Punkt 2.2.3), gefolgt von einer Restriktionsanalyse (siehe Punkt 2.2.8) zur Überprüfung der einzelnen Klone. Mit den korrekten Klonen wurde eine Midi-Präparation durchgeführt (siehe Punkt 2.2.3). Abschließend erfolgte eine Kontrolle der Plasmid-DNA mittels Restriktionsanalyse (siehe Punkt 2.2.8). Abb. 27 repräsentiert das Ergebnis der Restriktionsanalyse (siehe Punkte 2.2.8 und 2.2.4).



Abb. 27: Klonierung der verschiedenen Varianten des synthetischen hIFNGRs.

Für die Überprüfung der Varianten wurden die erzeugten Vektoren mittels Resektionsendonuklease geschnitten. Die Ergebnisse der Restriktion wurden zur Visualisierung auf ein Agarosegel aufgetragen und voneinander getrennt (Fragmentgrößen: pcDNA3.1-SyCyR-VchIFNGR1-2A-VGhIFNGR1 Xbal und Xhol: 6378 + 1725 bp; pcDNA3.1-SyCyR-VchIFNGR2-2A-VGhIFNGR2 Xbal und Xhol: 5816 + 1263 bp; pcDNA3.1-SyCyR-VchIFNGR1-2A-VGhIFNGR2 Xbal und Xhol: 5816 + 1725 bp). Als Marker diente GeneRuler[™] DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA.

Die Ergebnisse der Restriktionsanalyse fielen wie erwartet aus: pcDNA3.1-SyCyR-V_chIFNGR1-2A-V_GhIFNGR1 Xbal + XhoI: 6378 + 1725 bp; pcDNA3.1-SyCyR-V_chIFNGR2-2A-V_GhIFNGR2 Xbal + XhoI: 5816 + 1263 bp; pcDNA3.1-SyCyR-V_chIFNGR1-2A-V_GhIFNGR2 Xbal + XhoI: 5816 + 1725 bp. Die weiteren drei verschiedenen Varianten des synthetischen hIFNGR wurden erfolgreich kloniert. Im nächsten Schritt wurde die Expression der verschiedenen Varianten in eukaryotischen HEK293T Zellen geprüft.

3.3.1 Expression der synthetischen hIFNγ-Rezeptoren in HEK293T Zellen

Zur Überprüfung der Expression der verschiedenen synthetischen hIFNGR Zytokinrezeptoren in HEK293T Zellen wurden diese zunächst mit den Plasmiden pcDNA3.1-SyCyR-V_chIFNGR1-2A-V_GhIFNGR1, pcDNA3.1-SyCyR-V_chIFNGR2-2A-V_GhIFNGR2, pcDNA3.1-SyCyR-V_chIFNGR1-2A-V_GhIFNGR2 und pcDNA3.1-SyCyR-V_chIFNGR2-2A-V_GhIFNGR1 transient transfiziert (siehe Punkt 2.3.2). Nach Inkubation der Zellen erfolgte die Herstellung der Zelllysate (siehe Punkt 2.4.1). Diese wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (siehe Punkt 2.4.3). Für die Analyse wurden gegen HA und myc gerichtete Antikörper verwendet. Wie in Abb. 28 ersichtlich, ist jeder Rezeptoranteil mit einem HA- bzw. myc-*tag* versehen, um deren Anwesenheit in der Western Blot Analyse überprüfen zu können.



Abb. 28: Die Varianten des humanen synthetischen IFNGR werden in HEK293T Zellen exprimiert.

(A) Schematisch dargestellte Expressionskassetten der verschiedenen Varianten des humanen synthetischen IFNGR. Die zwei Anteile der Expressionskassette beinhalteten je ein Signalpeptid (SP, weiß) sowie Sequenzen für die intrazelluläre-, Transmembran- und 15 AS der extrazellulären Domäne einer der Rezeptoruntereinheiten hIFNGR1 und hIFNGR2 (dunkelgrau und hellgrau). Der myc- bzw. HA-*tag* (schwarz) und je ein *nanobody* (Vc bzw. V_G; rot, bzw. grün) waren ebenfalls in jedem Anteil vorhanden. Verbunden wurden sie durch das 2A-Peptid (blau) und eine Furin-Schnittstelle (gelb). (B) HEK293T Zellen wurden transient mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert und für 48 h inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurden je 50 µg Gesamtprotein in der SDS-PAGE getrennt und im Western Blot Verfahren analysiert. Die Kontrolle der Rezeptorexpression erfolgte durch gegen HA und myc gerichtete Antikörper. Die durch das 2A-Peptid cotranslational gespaltenen einzelnen Rezeptoruntereinheiten sind in grau markiert (graue Kästen und graue Beschriftung), während die Rezeptorproteine, bei denen wahrscheinlich noch keine Prozessierung durch das 2A-Peptid stattfand, in schwarz mit einer jeweiligen, dem Rezeptorprotein zugeordneten Nummer (1-4) dargestellt sind (schwarze Kästen mit Nummer (1-4) und schwarzer Beschriftung). Proteinmarker: PageRulerTM Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA. (n=1)

Die Ergebnisse der Analyse zeigten, dass beide Rezeptoranteile aller Rezeptorvarianten des humanen synthetischen IFNGR von HEK293T Zellen exprimiert wurden.

Interessanterweise konnten in den Ergebnissen der Western Blot Analyse nicht nur die durch das 2A-Peptid gespaltenen einzelnen Rezeptoruntereinheiten, sondern ebenfalls ungespaltene Rezeptoren nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die durch das 2A-Peptid vermittelte, cotranslationale Spaltung nicht bei allen Proteinen dieser Versuchsreihe stattfand bzw. aufgrund der Überexpression noch nicht vollständig abgeschlossen war.

3.3.2 Die Stimulation der synthetischen hIFNγ-Rezeptoren mit synthetischen Liganden führt in HEK293 Zellen zu keiner Signaltransduktion.

Zunächst wurden HEK293 Zellen transient mit der cDNA der Rezeptorvarianten des synthetischen humanen IFNGR transfiziert (siehe Punkt 2.3.2) und stimuliert (siehe Punkt 2.3.4). Für die Stimulation wurden in der AG Scheller erstellte synthetische Liganden verwendet, die an die extrazellulär gelegenen *nanobodies* binden [93]. In diesem Versuchsteil wurden folgende Varianten der synthetischen Liganden verwendet: GCCG, bei dem GFP und mCherry durch den Fc-*tag* kombiniert sind, sowie GG (GFP-Fc), CC (mCherry-Fc) und GC (GFP mCherry) (siehe Abb. 9B). Da durch die neu synthetisierten Varianten V_chIFNGR1 V_GhIFNGR1 und V_chIFNGR2 V_GhIFNGR2 zwei Homodimere vorlagen, war es möglich, die Aktivierung von Homodimeren auch nach Stimulation mit dem Liganden GC zu untersuchen. Eine Übersicht über die verschiedenen Rezeptorvarianten und die erwarteten Rezeptorkonfigurationen nach Stimulation mit verschiedenen Liganden zeigt Tabelle 19.

	GCCG	GG	CC	GC
V _c hIFNGR2	hIFNGR1 & IFNGR2	hIFNGR1	IFNGR2	Heterodimer
V _G hIFNGR1	Tetramer	Homodimer	Homodimer	
V _c hIFNGR1	hIFNGR1 Tetramer	hIFNGR1	hIFNGR1	hIFNGR1
V _G hIFNGR1		Homodimer	Homodimer	Homodimer
V _c hIFNGR2	hIFNGR2 Tetramer	hIFNGR2	hIFNGR2	hIFNGR2
V _G hIFNGR2		Homodimer	Homodimer	Homodimer
V _c hIFNGR1	hIFNGR1 & IFNGR2	IFNGR2	hIFNGR1	Heterodimer
V _G hIFNGR2	Tetramer	Homodimer	Homodimer	

Tabelle 19: Potentielle Rezeptorkonfigurationen nach Stimulation mit synthetischen Liganden

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Stimulation von Multimeren der IFNG-Rezeptoruntereinheiten analog zu den IFNα-Rezeptoruntereinheiten (siehe Punkt 3.1) zu einer Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade führt. Die verwendeten Antikörper gegen myc und HA dienten der versuchsinternen Überprüfung der Expression der jeweiligen Rezeptoruntereinheiten. Gegen STAT1 gerichtete Antikörper dienten zum Nachweis von STAT1 sowie der gleichmäßigen Auftragsmengen von Protein, während gegen pSTAT1 gerichtete Antikörper die Anwesenheit und Stärke der Signaltransduktion detektierten.


Abb. 29: Die Varianten der humanen synthetischen IFNG-Zytokinrezeptoren können in HEK293 Zellen nicht von synthetischen Liganden stimuliert werden.

HEK293 Zellen wurden nach Transfektion für 30 Stunden bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Nach einem Mediumswechsel mit FCS-freiem Medium und weiteren 16 bis 20 Stunden Inkubation unter gleichen Bedingungen erfolgte die Stimulation für je 30 Minuten mit 100 ng/mL den jeweiligen synthetischen Liganden und 10 ng/ml HIL-6. Zur Analyse der Zelllysate wurden je 50 μg der lysierten Proteine pro Spur in der SDS-PAGE voneinander getrennt und mittels Western Blot Verfahren analysiert. Die Positivkontrolle bildeten die mit HIL-6 stimulierten Zellen, die Negativkontrolle unstimulierte Zellen (Ø). Für die Western Blot Analyse wurden gegen HA, myc, STAT1 und pSTAT1 gerichtete Antikörper verwendet. Als Proteinmarker diente das Produkt PageRulerTM Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA. (n=3)

In den Ergebnissen war lediglich die Aktivierung der Variante V_chIFNGR2 V_GhIFNGR1 durch den synthetischen Liganden GC festzustellen. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurde die Stimulation der Rezeptoren im weiteren Verlauf in stabil transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen untersucht.

3.3.3 Herstellung stabiler Ba/F3-gp130 Zelllinien mit Expression der synthetischen hIFNγ-Rezeptoren

Um eine Untersuchung der Rezeptoren in Ba/F3-gp130 Zellen zu ermöglichen, wurden die verschiedenen Varianten zunächst in den retroviralen Vektor pMOWS-puro kloniert. Nur so war die retrovirale Transduktion der Ba/F3-gp130 Zellen realisierbar. Das Klonierungsschema für die verschiedenen Varianten ist in Abb. 30 ersichtlich. Die durch Restriktion (siehe Punkt 2.2.8) erhaltenen Fragmente des Vektors und *inserts* wurden mittels Ligation (siehe Punkt

2.2.6) zusammengefügt und in chemisch kompetente *E. coli* XL-1 blue Zellen transformiert (siehe Punkt 2.2.1). Mittels *colony* PCR (siehe Punkt 2.2.2) wurden putative Klone ermittelt, deren Plasmid-DNA mittels Mini-Präparation (siehe Punkt 2.2.3) isoliert und durch Restriktion (siehe Punkt 2.2.8) überprüft wurde. Von den putativen Klonen wurde anschließend eine Plasmid-DNA-Midi-Präparation (siehe Punkt 2.2.3) durchgeführt. Die isolierte DNA wurde durch dreifache Restriktion (siehe Punkt 2.2.8) kontrolliert (siehe Abb. 30).



Abb. 30: Klonierung der Varianten des humanen synthetischen IFNGR in den pMOWS-puro-Vektor.

(A) Repräsentatives Klonierungsschema für alle Varianten des synthetischen humanen IFNGR. Die Variantenspezifischen Fragmentgrößen sind wie folgt: pcDNA3.1-SyCyR-VchIFNGR2-2A-VGhIFNGR1 & pcDNA3.1-SyCyR-VchIFNGR1-2A-VGhIFNGR2 nach Pmel Restriktion: 2215 bp; pMOWS-puro-SyCyR-VchIFNGR2-2A-VGhIFNGR1 & pMOWS-puro-SyCyR-VchIFNGR1-2A-VGhIFNGR2: 7937 bp; pcDNA3.1-SyCyR-VchIFNGR1-2A-VGhIFNGR1 nach Pmel Restriktion: 2677 bp; pMOWS-puro-SyCyR-VchIFNGR1-2A-VGhIFNGR1: 8399 bp; pcDNA3.1-SyCyR-VchIFNGR2-2A-VGhIFNGR2 nach Pmel Restriktion: 1753 bp; pMOWS-puro-SyCyR-VchIFNGR2-2A-VGHIFNGR2: 7475 bp. (B) Restriktionsanalyse der mittels Midi-Präparation gereinigten Plasmid-DNA der IFNGR-Varianten. Fragmentgrößen: pMOWS-puro-SyCyR-VchIFNGR2-2A-VGHIFNGR1 (Xhol 1410 + 6527 bp, Xbal 1338 + 6599 bp, HindIII 2331 + 5606 bp); pMOWS-puro-SyCyR-VchIFNGR1-2A-VGHIFNGR2 (Xhol 948 + 6989 bp, Xbal 1338 + 6599 bp, HindIII 1869 + 6068 bp); pMOWS-puro-SyCyR-VchIFNGR1-2A-VGHIFNGR2 (Xhol 948 + 6989 bp, Xbal 1338 + 7061 bp, HindIII 2331 + 7770 bp); pMOWS-puro-SyCyR-VchIFNGR2-2A-VGHIFNGR2 (Xhol 948 + 6527 bp, Xbal 1338 + 6137 bp, HindIII 1869 + 5606 bp) Als Marker diente GeneRulerTM DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA.

Die in Abb. 30 gezeigten DNA-Fragmente entsprachen den erwarteten Größen: pMOWS-puro-SyCyR-V_chIFNGR2-2A-V_GhIFNGR1 (Xhol 1410 + 6527 bp, Xbal 1338 + 6599 bp, HindIII 2331 + 5606 bp); pMOWS-puro-SyCyR-V_chIFNGR1-2A-V_GhIFNGR2 (Xhol 948 + 6989 bp, Xbal 1338 + 6599 bp, HindIII 1869 + 6068 bp); pMOWS-puro-SyCyR-V_chIFNGR1-2A-V_GhIFNGR1 (Xhol 1410 +6869 bp, Xbal 1338 + 7061 bp, HindIII 2331 + 7770 bp); pMOWS-puro-SyCyR-V_chIFNGR2-2A-V_GhIFNGR2 (Xhol 948 + 6527 bp, Xbal 1338 + 6137 bp, HindIII 1869 + 5606 bp). Im nächsten Schritt wurde die Expression der in den neuen Vektor klonierten Varianten in HEK293T Zellen überprüft. Hierzu wurden deren Lysate (siehe Punkt 2.4.1) mittels SDS-PAGE voneinander getrennt und mittels Western Blot analysiert (siehe Punkt 2.4.3). Als Kontrolle für die Rezeptorexpression dienten gegen HA und myc gerichtete Antikörper.





Nach Transfektion wurden die HEK293T Zellen für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zelllysate wurden hergestellt und mit einer Konzentration von je 50 µg pro Spur in der SDS-PAGE voneinander getrennt. Die Analyse erfolgte durch das Western Blot Verfahren. Hierbei wurden die Membranen mit gegen HA und myc gerichteten Antikörpern behandelt. In schwarz mit Nummer sind die detektierten, wahrscheinlich nicht 2A-prozessierten Rezeptoruntereinheiten und deren Molekulargewichte dargestellt, in hellgrau mit Pfeilen die prozessierten Rezeptoruntereinheiten. Als Proteinmarker wurde PageRuler[™] Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA verwendet (n=1).

Wie in Abb. 31 ersichtlich, wurden beide Rezeptoranteile der jeweiligen Varianten von den HEK293T Zellen exprimiert. Auch hier konnte, wie bei den im pcDNA3.1-Vektor vorliegenden Varianten, nicht nur die durch das 2A-Peptid gespaltenen, einzelnen Rezeptoruntereinheiten, sondern auch die nicht prozessierten Proteine nachgewiesen werden.

3.3.4 Analyse der Signaltransduktion in stabil transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen

Die Erzeugung von Ba/F3-gp130 Zellen mit Varianten des humanen synthetischen IFNGR erfolgte mittels retroviraler Transduktion (siehe Punkt 2.3.3). Die Expression der Rezeptoranteile auf der Oberfläche der jeweiligen Ba/F3-gp130 Zellen wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie überprüft (Abb. 32). Hierfür wurden Antikörper verwendet, die gegen den mit den Rezeptoruntereinheiten verbundenen HA und myc *tag* gerichtet waren. Die Ergebnisse zeigten, dass alle Varianten des humanen synthetischen IFNGR auf der Oberfläche der jeweiligen Ba/F3-gp130 Zellen vorhanden waren, wenngleich sich hier ein heterogenes Bild ergab, wonach nicht alle Rezeptoren in gleicher Menge auf der Oberfläche exprimiert wurden. So schien die Expression der IFNGR2 Untereinheit der 2A-Varianten V_chIFNGR1-V_GhIFNGR2 und V_chIFNGR2 V_GhIFNGR2, sowie die der IFNGR1 Untereinheit der Variante V_chIFNGR1 V_GhIFNGR1 stärker zu sein als die der restlichen Rezeptoren. Der zweite *peak*, der bei der IFNGR2-Expression des myc-*getaggten* V_chIFNGR2 V_GhIFNGR2 erkennbar war, kann durch aggregierte Zellen hervorgerufen worden sein.



Abb. 32: Verschiedene synthetische humane IFNGR werden auf der Oberfläche von Ba/F3-gp130 Zellen exprimiert.

Nachweis der Rezeptorexpression auf der Oberfläche der Ba/F3-gp130 Zellen mittels Durchflusszytometrie. Die Untersuchung der Zellen erfolgte nach Hinzugabe spezifischer Antikörper (α -HA und α -myc) mit Durchflusszytometrie. Auf der Abszissenachse ist die Fluoreszenzstärke aufgetragen, auf der Ordinatenachse die bei jeweiliger Fluoreszenzstärke gemessene Zellzahl. Das graue Histogramm stellt die Negativkontrolle dar, bei der nicht transduzierte Ba/F3-gp130 Zellen analysiert wurden. Die schwarzen Kurven bilden die erfolgreich transduzierten Zellen ab. Das Ausmaß der Rechtsverschiebung der schwarz umrandeten Kurve in Bezug auf die graue Kurve korreliert positiv mit der Menge der detektierten Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Das Experiment erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. rer. nat. Doreen Manuela Floß (n=1).

Zur Untersuchung der Signaltransduktion wurden die Ba/F3-gp130 Zellen mit den bereits beschriebenen, gegen die extrazellulären *nanobodies* gerichteten, synthetischen Liganden aus der AG Scheller [93] stimuliert. In diesem Versuchsteil wurden die synthetischen Liganden GCCG, GG und CC verwendet. Außerdem kamen IFNα4 sowie HIL-6 als Positivkontrolle zum Einsatz.



Abb. 33: Analyse der Signaltransduktion nach Stimulation der Rezeptoren in stabil transduzierten Ba/F3gp130 Zellen

Die Stimulation der Ba/F3-gp130 Zellen mit den verschiedenen Liganden erfolgte für 30 Minuten. Die Konzentration der synthetischen Liganden betrug 100 ng/ml, die Positivkontrolle HIL-6 wurde mit einer Konzentration von 10 ng/ml verwendet. Nach Stimulation wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Nach Herstellung der Zelllysate wurden diese mit einer Konzentration von je 50 µg Gesamtprotein pro Spur in der SDS-PAGE voneinander getrennt und mit dem Western Blot Verfahren analysiert. Die Membranen wurden mit gegen pSTAT1 und STAT1 gerichteten Antikörpern behandelt (n=2). Abbildungsteil A und Abbildungsteil B zeigen je eine der beiden Wiederholungen des Versuchs. Proteinmarker: PageRuler[™] Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA.

Die Analyse der Signalkaskade fand durch Trennen der Zelllysate (siehe Punkt 2.4.1) der stimulierten Ba/F3-gp130 Zellen in der SDS-PAGE und durch das Western Blot Verfahren (siehe Punkt 2.4.3) statt. Hierbei wurden verschiedene Antikörper eingesetzt. Wie bereits in vorigen Experimenten diente auch hier α -STAT1 der Kontrolle über die aufgetragene Proteinmenge. Der Antikörper α -pSTAT1 war für die Darstellung von Anwesenheit und Stärke der Signaltransduktion entscheidend. Die Ergebnisse in Abb. 33 zeigen, dass die Stimulation der Variante V_chIFNGR1 V_GhIFNGR2 mit GCCG in einer der beiden Versuchswiederholungen zu einer eindeutig messbaren Produktion von pSTAT1 führte. Die Stimulation von Homodimeren führte in keiner der Wiederholungen zu einer Aktivierung der Signaltransduktion. Dies wurde dadurch deutlich, dass weder die durch GCCG stimulierten homodimeren Varianten des synthetischen humanen IFNGR noch die mit GG bzw. CC stimulierten heterodimeren Varianten eine Aktivierung der Signaltransduktion zeigten. Die Variante V_chIFNGR2 V_GhIFNGR1 zeigte nach Stimulation ebenfalls keine Aktivierung der Signalkaskade.

Zur Analyse der ligandenabhängigen Zellproliferation wurden Proliferationsassays (siehe Punkt 2.3.5) durchgeführt. Da nur bei der Rezeptorvariante V_chIFNGR1 V_GhIFNGR2 eine durch den Liganden induzierte Aktivierung der JAK/STAT Signaltransduktion beobachtet werden konnte (siehe Abb. 33), wurde die ligandenabhängige Zellproliferation auch nur bei dieser Variante untersucht. Hierzu wurden die stabil transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen stimuliert und auf ihre Proliferation untersucht. Zur Stimulation wurden die synthetischen Liganden GCCG, GG, CC und GC, sowie HIL-6 (10 ng/ml) [93] verwendet. Als Negativkontrolle dienten nicht-transduzierte Ba/F3-gp130 Zellen sowie je eine unstimulierte Variante der transduzierten Zellen. Die Analyse der ligandenabhängigen Proliferation der Ba/F3-gp130 Zellen ergab, dass keine der untersuchten Zelllinien ligandenabhängig proliferierte (siehe Abb. 34). Dies wurde erwartet, da eine antiproliferative Wirkung für Interferone auf Ba/F3 Zellen bereits beschrieben wurde [102].



Abb. 34: Die Stimulation des Rezeptors V_chIFNGR1 V_ghIFNGR2 induziert keine ligandenabhängige Proliferation in Ba/F3-gp130 Zellen.

Die Zellen wurden für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert. Die synthetischen Liganden wurden in einer Konzentration von 200 ng/ml eingesetzt. Für die Positivkontrolle wurden 10 ng/ml HIL-6 verwendet. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen sowie die untransduzierte Zelllinie (Ba/F3-gp130). Die Proliferation wurde mit Hilfe des CellTiter Blue (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) detektiert. Auf der Abszisse sind die verschiedenen Zelllinien abgebildet. Die farbliche Markierung codiert für die Liganden, mit denen sie stimuliert wurden. Die Ordinate stellt die gemessene Fluoreszenz der lebenden Zellen dar. Je größer die gemessene Fluoreszenz, desto stärker die Proliferation der Zellen (n=3).

Ob das Konzept der synthetischen Zytokinrezeptoren auf die humanen Typ II Interferonrezeptoren anwendbar ist, ist demnach nicht vollständig geklärt. Funktionelle Homodimere ließen sich hiermit nicht erzeugen. In weiteren Untersuchungen sollte die generelle Anwendbarkeit des SyCyR-Systems auf die Typ II Interferonrezeptoren weiter untersucht werden. Außerdem sollte ein weiterer Ligand, CGGC, erstellt werden, um die Hypothese einer strukturellen Inkompatibilität des V_chIFNGR2 V_GhIFNGR1 mit GCCG (siehe 4.3) zu überprüfen. Führt dieser zu einer Aktivierung des V_chIFNGR2 V_GhIFNGR1, jedoch nicht zu einer Aktivierung des V_chIFNGR1 V_GhIFNGR2, läge es nahe, dass die hier fehlende Aktivierung des V_chIFNGR2 V_GhIFNGR1 strukturbedingt ist, das SyCyR System generell aber auf die Typ II Interferonrezeptoren anwendbar ist.

4 Diskussion

4.1 Konstruktionsprinzip der SyCyRs

Zur hintergrundfreien, an- und ausschaltbaren Analyse von Interferonrezeptoren wurde sich in dieser Arbeit des SyCyR-Konzeptes bedient, welches bereits in der AG Scheller unter anderem am Beispiel von IL-23 sowie TNFR und FAS etabliert und angewendet wurde [1, 73]. Hierzu wurden die intrazellulären Domänen, die Transmembrandomänen sowie 15 Aminosäuren der extrazellulären Domänen der Typ I sowie Typ II IFN-Rezeptoruntereinheiten hIFNAR1, hIFNAR2, sowie hIFNGR1 und hIFNGR2 mit gegen fluoreszierende Proteine gerichteten nanobodies fusioniert. Bei diesen handelte es sich um die gegen die fluoreszierenden Proteine GFP und mCherry gerichteten nanobodies GFP_{VHH} (V_G) und mCherry_{VHH} (V_C) [1]. Die synthetischen, fluoreszierenden ermöglichen Proteine eine zuverlässige, Liganden-unabhängige, hintergrundfreie Stimulation der Rezeptoren, deren Signalkaskade um und Rezeptorstöchiometrie zu untersuchen. Vorteilhaft ist außerdem, dass die synthetischen Rezeptoren, anders als vergleichbare Systeme, graduell ausgeschaltet werden können. Hierzu wurde ein lösliches Fusionsprotein aus einem gegen GFP und mCherry gerichteten nanobody konstruiert, das mit den extrazellulären Domänen der SyCyRs im Sinne einer kompetitiven Hemmung um die Liganden konkurriert [1]. Je nach Konzentration kann so eine reduzierte, bis vollständig ausbleibende Aktivierung der synthetischen Rezeptoren durch die Liganden erreicht werden [1]. Da extrazelluläre Faktoren, z.B. bereits geringfügige Modifikationen eines Liganden, die intrazelluläre Signalkaskade beeinflussen können [85], wurde in dieser Arbeit die Aktivierung der JAK/STAT-Signalkaskade der synthetischen Typ I und II IFN-Rezeptoren im Vergleich zur Stimulation des Wildtyp-Rezeptors mit seinem natürlichen Liganden analysiert, um die Anwendbarkeit des SyCyR-Systems auf die Typ I und Typ II IFN-Rezeptoren bei modifizierter extrazellulärer Domäne und neuem Liganden zu verifizieren.

4.1.1 Der synthetische hIFNAR phänokopierte die Signalkaskade des Wildtyp-Rezeptors

Im Fall der synthetischen hIFNAR erfolgte die Fusion von hIFNAR1 mit VHH_{GFP} (V_GhIFNAR1) und hIFNAR2 mit VHH_{mCherry} (V_chIFNAR2). Zur Detektion der Rezeptoruntereinheiten im Western Blot wurde der V_GhIFNAR1 mit einem HA *tag* und der V_ChIFNAR2 einem myc *tag* versehen. Die Stimulation der Rezeptoren erfolgte mit verschiedenen Konfigurationen der synthetischen Liganden, GFP und mCherry, die zuvor in einer anderen Arbeit der AG Scheller konstruiert wurden [93]. Um die Expression der Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen zu ermöglichen, wurde die cDNA der synthetischen Rezeptoren zunächst erfolgreich in den für die transiente Transfektion in HEK293 Zellen vorgesehenen Vektor pcDNA3.1 sowie in den für die retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen geeigneten Vektor pMOWS-puro kloniert. Die Expression der Rezeptoren in den Zellen wurde bei allen durchgeführten Experimenten durch Nachweis des Vorliegens des an die Rezeptoren gekoppelten Protein tags durch die jeweiligen Antikörper im Western Blot verifiziert. Im Falle der Ba/F3-gp130 Zellen erfolgte die Expressionskontrolle Durchflusszytometrie. Alle zusätzlich mittels Zellen exprimierten beide Rezeptoruntereinheiten. Wenngleich die Signaltransduktion der Interferonrezeptoren deutlich komplexer ist, wurde in dieser Arbeit der Fokus auf die Aktivierung der JAK/STAT-Signalkaskade und auf die, für die Typ I Interferone charakteristische, Phosphorylierung der STAT-Proteine 1 und 2 gelegt [9].

Wie bereits in Punkt 1.2 beschrieben initiiert jeder Typ I Interferon Subtyp, vermutlich durch unterschiedliche Bindungsaffinität an den Rezeptor [22, 23] sowie die Aktivierung alternierender intrazellulärer Signalwege [104], eine andere biologische Wirkung im Organismus. Aus diesem Grund wurde in einer vorherigen Arbeit der AG Scheller für die vergleichende Signaltransduktion des Wildtyprezeptors der Subtyp IFNα4 als Wildtyp-Ligand festgelegt [2]. In der Klinik werden von der Klasse der Typ I Interferone derzeit sowohl IFNβ als auch IFNα2 eingesetzt [3, 105]. IFNβ zeichnet sich beispielsweise durch seine antiproliferative und immunmodulatorische Wirkung aus [11], IFNα2 werden vor allem antivirale, aber auch antiproliferative Effekte zugeschrieben [106]. IFNα4 übt eine im Vergleich hierzu stärkere antivirale Aktivität sowie einen bedeutenden Effekt auf die anti-proliferativen und zytotoxischen Eigenschaften der CD8⁺-Zellen aus [107-109]. Da eine mögliche klinische Anwendung von synthetischen IFNARs in modifizierten, autologen T-Zellen gesehen wird, die nach Reinfusion zur Abwehr von viralen- oder onkologischen Erkrankungen dienen sollen, wurde der Vergleich der Rezeptoraktivität der synthetischen mIFNARs mit IFNα4 gewählt [2].

Bereits in einer vorherigen Arbeit der AG Scheller wurde gezeigt, dass der synthetische mIFNAR nach Aktivierung mit dem synthetischen Liganden GCCG ein vergleichbares Aktivierungsprofil der Signaltransduktion wie der mit IFN α 4 stimulierte, murine Wildtyprezeptor aufwies [2]. Die Transkriptomanalyse der durch die Aktivierung regulierten Gene zeigte eine 99,91% ige Übereinstimmung der nach Stimulation des synthetischen Rezeptors mit GCCG aktivierten Gene im Vergleich mit denen nach Stimulation des Wildtyprezeptors mit IFN α 4 [2]. In Experimenten mit der murinen Fibroblastenlinie MC57 wurde auch in vitro eine mit dem Wildtyp vergleichbare antivirale Aktivität beobachtet [2]. Daher wurde in dieser Arbeit die Aktivierung von STAT1 und STAT2 nach Stimulation vom synthetischen hIFNAR mit GCCG mit der des synthetischen mIFNAR mit dem gleichen Liganden verglichen. Hierzu wurde mittels Western Blot das Vorliegen von pSTAT1 und pSTAT2 in V_GhIFNAR1- und V_chIFNAR2-positiven Zellen mit und ohne Stimulation überprüft und mit deren Vorliegen in V_GmIFNAR1- und V_cmIFNAR2-positiven Zellen verglichen. In allen Zellmodellen phänokopierte der synthetische hIFNAR nach Stimulation mit GCCG die Signaltransduktion des synthetischen mIFNAR. Neben der Betrachtung von pSTAT1 und pSTAT2 lag ein weiteres Augenmerk auf der Proliferation der Ba/F3-gp130 Zellen nach Stimulation mit dem Liganden. Ba/F3-gp130 Zellen proliferieren HIL-6-abhängig nach STAT3 und ERK-Aktivierung [100]. Interessanterweise zeigten die mit GCCG stimulierten, den synthetischen mIFNAR oder hIFNAR-tragenden Zellen trotz zuvor im Western Blot nachgewiesener STAT3-Aktivierung keine Proliferation. Auch die Stimulation von Wildtyp-Rezeptoren mit IFN α 4 führte, trotz in der Literatur beschriebener STAT3-Aktivierung [11, 110], zu keiner Proliferation [102]. Lediglich die Stimulation mit HIL-6 führte zur Proliferation der Zellen. Die Inhibierung von IL-3 abhängiger Proliferation durch Interferone ist in der Literatur bereits beschrieben und könnte in der ausgeprägten Aktivierung von STAT1 mit dem Resultat einer stark antiproliferativen Wirkung begründet sein [102]. Diese Beobachtung bestätigt, dass die Reaktion von Zellen nach Aktivierung des synthetischen Rezeptors vergleichbar mit der nach Stimulation des murinen Wildtyprezeptors ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das System der synthetischen Zytokinrezeptoren mit vergleichbaren Ergebnissen wie bei den synthetischen mIFNAR auf die hIFNAR angewendet werden kann und dass das Verhalten des Wildtyprezeptors sowohl im Hinblick auf die Aktivierung von STAT1 und STAT2 als auch auf das Proliferationsverhalten von Ba/F3-gp130 Zellen in gleichem Maße phänokopiert wird. Weiterführende Experimente sollten sich mit der Untersuchung der von den synthetischen hIFNAR regulierten Gene sowie mit der antiviralen und gegebenenfalls antiproliferativen Aktivität nach Stimulation mit dem synthetischen Liganden befassen. Eine Übereinstimmung der biologischen Aktivität sowie der Genregulation mit der des durch IFNα4 stimulierten, humanen Wildtyps würde das Ergebnis, dass das SγCyR-Konzept auf die humanen IFNAR übertragbar ist, weiter untermauern. Interessant wäre außerdem ein Vergleich der Genaktivierung des synthetischen hIFNAR mit der von durch weiteren natürlichen Liganden stimulierten Wildtyprezeptoren. So könnte herausgestellt werden, ob die Genaktivierung nach Stimulation des synthetischen hIFNAR eine noch größere Homologie mit der Genaktivierung eines durch die anderen Typ I IFN stimulierten Wildtyprezeptoren, als mit dem durch IFNq4-stimulierten Rezeptor, aufweist. Da die Stimulation des hIFNAR mit verschiedenen Liganden der Typ I Interferone zu unterschiedlichen biologischen Wirkungen führt, wäre dies für eine eventuelle spätere therapeutische Anwendung der synthetischen Rezeptoren im Hinblick auf ein besser kalkulierbares Wirkungsund Nebenwirkungsprofil interessant. Im Hinblick auf eine klinische Anwendung der synthetischen hIFNARs sollte außerdem die Auswirkung des durch die JAK/STAT-Signalkaskade initiierten positiven feedback-loops auf umliegende Zellen geprüft werden. Wenngleich die synthetischen Liganden keine Wildtyprezeptoren stimulieren, so tun dies die von der aktivierten Zelle in Folge der hochregulierten ISGs ausgeschütteten Interferone dennoch [3]. Sollte die tatsächliche klinische Anwendung der synthetischen hIFNARs erwogen werden, wäre sicherzustellen, dass die auto-, para- und endokrine Wirkung der finalen Interferon-Ausschüttung, die durch die vom synthetischen hIFNAR aktivierte Zelle zwangsläufig induziert würde, nicht die Vorteile der lokalen Anwendbarkeit der synthetischen IFNAR zunichtemacht.

4.1.2 Das Homodimer aus hIFNAR2 initiiert nach Stimulation eine JAK/STAT Signalkaskade

Die Bedeutung der IFNAR-Untereinheiten ist bereits seit einiger Zeit Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Die Stimulation synthetischer Rezeptoren mit einer Varianz verschiedener synthetischer Liganden [93] ermöglicht es, zuverlässig synthetische Homodimere der Rezeptoruntereinheiten des synthetischen hIFNAR zu generieren. So können diese hintergrundfrei untersucht und ihre Bedeutung für die Signaltransduktion und die biologische Wirkung genauer beleuchtet werden. Zur Generierung und Stimulation von Homodimeren wurden die Liganden GG für die Stimulation von V_GhIFNAR1-Homodimeren und CC für die Stimulation von V_ChIFNAR2-Homodimeren verwendet. In hierzu bereits durchgeführten Experimenten mit einem durch Erythropoetin (Epo) aktivierten synthetischen IFN-Rezeptor (EpoR_{ECD}-IFNAR1_{ICD} bzw. EpoR_{ECD}-IFNAR2_{ICD}) wurde gezeigt, dass nur EpoR_{ECD}-IFNAR2_{ICD}-Homodimere die JAK/STAT-Signalkaskade aktivierten, jedoch nicht die künstlich erzeugten IFNAR1-Homodimere, deren extrazelluläre Domäne durch die von CD4 ersetzt wurde [111, 112]. Da nur IFNAR2 intrazellulär die Tyrosin-Bindestellen für STAT aufweist, war eine ausbleibende STAT-Aktivierung nach Stimulation von synthetischen EpoR_{ECD}-IFNAR1_{ICD}

Homodimeren erwartbar [92, 110]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde mit einer Aktivierung der Signalkaskade bei Stimulation von VchIFNAR2-Homodimeren durch den Liganden CC, jedoch nicht bei Stimulation von V_GhIFNAR1-Homodimeren durch GG, gerechnet. Der Nachweis der Aktivierung der JAK/STAT Signalkaskade nach Stimulation der Zellen mit den o.g. Liganden wurde durch Detektion von pSTAT1 und pSTAT2 durch die jeweiligen Antikörper im Western Blot erbracht. Wie erwartet, zeigten sich die VchIFNAR2-Homodimere sowohl in HEK293, als auch in Ba/F3-gp130 Zellen biologisch aktiv, wenngleich die Aktivierung der Signaltransduktion in den murinen Ba/F3-gp130 Zellen schwächer ausfiel als die in den humanen HEK293 Zellen, welche dem Aktivierungsprofil des Heterodimers glich. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte sein, dass die Signaltransduktion eines humanen Rezeptors in humanen Zellen möglicherweise stärker ausgeprägt verläuft als in einer murinen Zelle, wenngleich dieser Effekt für die Signaltransduktion des murinen Rezeptors in den humanen HEK293 Zellen nicht beobachtet werden konnte. Diese Hypothese müsste in weiteren Versuchen verifiziert werden. Die Stimulation von V_GhIFNAR1-Homodimeren zeigte keine Aktivierung der JAK/STAT Signalkaskade, auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass nach Aktivierung alternative Signalwege stattfinden [2]. Beide Homodimere erzeugten nach Stimulation keine Proliferation der Rezeptor-exprimierenden Ba/F3-gp130 Zellen. Dies ist bei VchIFNAR2-Homodimeren vermutlich auf die für Interferone charakteristische Hemmung der IL-3-abhängigen Proliferation zurückzuführen, bei V_GhIFNAR1-Homodimeren hingegen auf das Ausbleiben einer STAT-Aktivierung.

Trotz der fehlenden Aktivierung des JAK/STAT Signalweges als Homodimer werden der IFNAR1-Untereinheit entscheidende biologische Wirkungen zugeschrieben: Ergebnisse der Untersuchung des synthetischen EpoR_{ECD}-IFNAR2_{ICD}-Homodimers zeigten, dass dessen Stimulation eine deutlich reduzierte antivirale Antwort auf virale Infektionen zu verursachen schien, weshalb postuliert wurde, dass die IFNAR1-Untereinheit eine regulatorische Eigenschaft im Hinblick auf die antivirale Antwort ausübt [112]. Aktuellere Studien im Bereich der Onkologie stellen heraus, dass der IFNAR1-Untereinheit eine entscheidende Rolle bei der Progression von Tumoren zukommt [113]. So wurde ein rascheres Fortschreiten von Sarkomen und Melanomen bei IFNAR1-defizienten Mäusen sowie eine schlechtere Prognose kolorektaler Karzinome bei Patienten mit in der Tumorumgebung herunterregulierter IFNAR1-Untereinheit beobachtet [113].

Weitere Untersuchungen sollten sich daher mit der Analyse einer möglichen antiviralen und antiproliferativen Aktivität von V_chIFNAR2-Homodimeren im Vergleich zu der des Wildtyprezeptors widmen, um die Unterschiede zu einer Signaltransduktion des Heterodimers herauszustellen. Außerdem könnte mittels Transkriptomanalyse überprüft werden, ob die Stimulation von V_GhIFNAR1-Homodimeren mit GG, trotz Abwesenheit des für die Interferone charakteristischen JAK/STAT-Signalwegs, zu einer Genregulation über andere Signalkaskaden führt und wenn ja, welche Gene hierbei reguliert werden.

Durch den Nachweis, dass das System der synthetischen Zytokinrezeptoren auf die humanen Interferonrezeptoren übertragbar ist, ist nun die hintergrundfreie Analyse der Signaltransduktion und dem Vergleich mit einem heterodimeren synthetischen Rezeptor möglich. Dies bietet ein wertvolles Werkzeug zur Klärung wichtiger Fragestellungen, wie der genauen Bedeutung der IFNAR1- und IFNAR2-Untereinheiten für die IFN-Signaltransduktion und der daraus folgenden biologischen Wirkung.

4.2 Die Tyrosinreste Y335 und Y510 in mIFNAR2 sind relevant für die Phosphorylierung der STAT-Proteine

Die Stimulation des IFNAR durch seinen Liganden führt intrazellulär zu einer Trans-Phosphorylierung der mit den Rezeptoruntereinheiten assoziierten Kinasen JAK1 und TYK2 [4]. Die aktivierten Kinasen phosphorylieren Tyrosinreste der intrazellulären Rezeptoranteile, die dann als Bindungsstelle für die STAT-Proteine fungieren, welche durch die Kinasen phosphoryliert werden [92]. Die intrazelluläre Domäne des humanen IFNAR1 beinhaltet vier Tyrosinreste (466, 481, 527, 538), die des murinen IFNAR1 ebenfalls (455, 518, 529, 576), die des humanen IFNAR2 beinhaltet sieben (269, 306, 316, 318, 337, 411, 512) und die des murinen IFNAR2 sechs (268, 315, 317, 335, 398, 510). Die genaue Rolle der einzelnen Tyrosinreste ist in der Literatur aktuell noch nicht vollständig geklärt, jedoch könnten sie als STAT-Bindungsstellen fungieren [92]. In der Arbeit von Zhao und Mitarbeitern wird den Tyrosinen Y335 und Y510, die Y337 und Y512 im hIFNAR2 entsprechen, eine entscheidende Wirkung bei der Phosphorylierung der STAT-Proteine zugeschrieben [91]: Untersuchungen an IFNAR1 und IFNAR2-knockout Zellen zeigten, dass eine Mutation in Y335 die STAT1/2 Phosphorylierung verringerte, eine Mutation von Y510 eine STAT1/2 Phosphorylierung jedoch nahezu vollständig unterband [91]. In einer anderen Arbeit wurde eine graduelle Verringerung des phosphorylierten STAT1/2 nach Mutation verschiedener Tyrosinreste beobachtet und hierauf basierend das Vorliegen einer Haupt-Bindungsstelle und mindestens einer weiteren, die Bindung verstärkenden Stelle vermutet [92]. In einem weiteren Review sind Beobachtungen zur Phosphotyrosin-unabhängigen Aktivierung der STAT-Proteine an der IFNAR2 Untereinheit geschildert [114]. Die Untereinheit mIFNAR1 scheint bei der Bindung und Aktivierung von STAT1 und 2 keine direkte Rolle zu spielen, sondern trägt vermutlich indirekt durch erleichterte Aktivierung der Januskinasen hierzu bei [2, 92].

Zuvor in der AG Scheller generierte Varianten der V_GIFNAR1 und V_CIFNAR2 mit einzelnen oder doppelten Mutationen sowie eine in dieser Arbeit generierte Mutationsvariante wurden in HEK293 Zellen exprimiert und mit den synthetischen Liganden stimuliert. Die Ergebnisse in HEK293 Zellen ließen darauf schließen, dass eine Doppelmutation von Y335 und Y510 in der V_CIFNAR2 Untereinheit die Aktivierung von STAT1 sowohl im Falle des Heterodimers aus V_GIFNAR1 und V_CIFNAR2 als auch im Falle des Homodimers aus V_CIFNAR2 verringerte.

In weiterführenden Experimenten sollte daher eine stabile Transduktion in Ba/F3-gp130 Zellen angestrebt und die Versuchsreihe hiermit wiederholt werden. Sollten die Ergebnisse in Ba/F3-gp130 Zellen zeigen können, dass die Doppelmutation von Y335 und Y510 die Aktivierung von STAT1 und STAT2 verringert, würden sie die Annahme, dass die Tyrosine Y510 und Y335 eine entscheidende Rolle für die STAT-Aktivierung zu spielen scheinen, stützen [91]. Außerdem könnte hierdurch die Beobachtung, dass nicht ein einzelnes Tyrosin für die Aktivierung von STAT1/2 verantwortlich zu sein scheint, sondern diese vermutlich mehrere Tyrosine benötigen, um phosphoryliert zu werden, ebenfalls verifiziert werden [92].

Wenngleich die Bedeutungen der einzelnen Tyrosinreste in dieser Arbeit nicht ermittelt werden konnten, so konnte doch die Bedeutung von IFNAR2 für die STAT-Phosphorylierung untermauert werden. Weitere Experimente in anderen Zelllinien zum Einfluss verschiedener Mutationen der intrazellulären Domäne könnten hier mehr Aufschluss bieten.

4.3 Kann das System der synthetischen Zytokinrezeptoren auch auf Typ II Interferone angewandt werden?

Um die Anwendbarkeit des SyCyR-Systems auf Typ II Interferone untersuchen zu können, wurden diese zunächst, analog zu hIFNAR, molekularbiologisch verändert. hIFNGR1 wurde mit V_{G} (V_GhIFNGR1) und hIFNGR2 mit V_C (V_ChIFNGR2) fusioniert und es wurde jeder Untereinheit ein Protein tag zur Detektion im Western Blot angefügt (V_{G} hIFNGR1-HA + V_{C} hIFNGR2-myc). Interferon y liegt natürlicherweise als Homodimer vor [115]. Kürzlich wurde beschrieben, dass der hIFNGR nicht, wie in vorherigen Forschungsarbeiten angenommen [116, 117], als prädimerisiertes Tetramer aus 2 IFNGR1 und 2 IFNGR2 Untereinheiten vorliegt, sondern die IFNGR2 Untereinheiten erst nach Bindung des Liganden an IFNGR1 rekrutiert werden [32, 33]. Außerdem zeigte die Analyse von STAT-Aktivierung und Genexpression verschiedener Varianten der Rezeptorzusammensetzung, dass diese bei unterschiedlichen Kombinationen der Rezeptoruntereinheiten unterschiedlich stark ausgeprägt sind [32]. Da in dieser Arbeit zur Untersuchung alternativer Rezeptorzusammensetzungen nur eine limitierte Kombination der synthetischen Liganden vorlag, wurden weitere Varianten der Rezeptoruntereinheiten erstellt (V_GhIFNGR2-HA + V_chIFNGR1-myc, V_GhIFNGR1-HA + V_chIFNGR1-myc, V_GhIFNGR2-HA + VchIFNGR2-myc). Diese wurden, nach Klonierung in die dafür geeigneten Vektoren, pcDNA3.1 und pMOWS-puro, überführt und nach Transfektion in HEK293 Zellen bzw. retroviraler Transduktion in Ba/F3-gp130 Zellen von diesen exprimiert. In transient transfizierten HEK293 Zellen zeigte keine der Rezeptorkombinationen eine Aktivierung der JAK/STAT Signalkaskade nach Stimulation. In stabil transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen konnte mit der Stimulation eines Tetramers aus V_GhIFNGR2 und V_chIFNGR1 durch GCCG nur bei einer Wiederholung des Versuches eine eindeutige Phosphorylierung von STAT1 beobachtet werden (siehe Abb. 33). Da im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Wiederholungen durchgeführt werden konnten, müssen diese zum Nachweis der generellen Anwendbarkeit des SyCyR-Systems auf die Typ II Interferonrezeptoren in folgenden Forschungsarbeiten erfolgen. Geht man davon aus, dass das SyCyR-System nicht auf die Typ II Interferonrezeptoren anwendbar ist und es sich bei der gemessenen Aktivierung von V_GhIFNGR2 V_ChIFNGR1 bei Stimulation mit GCCG um ein Artefakt handelt, würde dies die fehlende Aktivierung der Signalkaskade bei allen anderen Varianten erklären. Jedoch gibt es, sofern sich in Folgeexperimenten herausstellt, dass die Anwendbarkeit gegeben ist, weitere Erklärungsansätze für die fehlende Aktivierung der anderen Varianten: Eine Phosphorylierung von STAT1 nach Stimulation von IFNGR1-Homodimeren ließ sich nicht beobachten [32]. Keines der Homodimere zeigte nach Stimulation eine Phosphorylierung von STAT1. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Aktivierung von STAT1 bei Stimulation von IFNGR1-Homodimeren zu schwach ist, als dass sie im Western Blot hätte nachgewiesen werden können. Warum eine Phosphorylierung von STAT1 nach Stimulation mit GCCG nur bei den Zelllinien beobachtet wurde, in denen die Rezeptoren VchIFNGR1 und VGhIFNGR2 vorlagen und nicht in den anderen V_GhIFNGR1 und V_ChIFNGR2-exprimierenden Zelllinien, könnte dadurch zu erklären sein, dass die durch den Liganden vorgegebene Struktur des Tetramers nur in einer der beiden Varianten funktionell ist. Dies könnte mit der Synthese eines alternativen Liganden CGGC verifiziert werden, bei dem dann nur die Stimulation der von V_GhIFNGR1 und V_chIFNGR2 exprimierenden Zellen zu einer Aktivierung von STAT1 führen sollte (siehe Abb. 35).



Abb. 35: Aktivierung verschiedener Varianten des synthetischen hIFNGR durch zwei verschiedene synthetische Liganden.

(A) Schematische Darstellung der synthetischen hIFNGR. Die Stimulation eines Tetramers aus V_G hIFNGR1 und V_C hIFNGR2 durch den Liganden GCCG führt zu keiner Aktivierung der JAK/STAT Signalkaskade (rotes Kreuz). Die Stimulation eines Tetramers aus den Rezeptoruntereinheiten V_C hIFNGR1 und V_G hIFNGR2 mit dem gleichen Liganden (GCCG) führt zur Aktivierung der JAK/STAT Signalkaskade (grüner Haken). (B) Schematische Darstellung zukünftiger Experimente. Geplant ist die Stimulation der Tetramere aus den Rezeptoruntereinheiten V_G hIFNGR2 mit dem Liganden CGGC. Ob hierdurch die JAK/STAT-Signalkaskade aktiviert wird, ist noch unbekannt. Vermutet wird eine Aktivierung des JAK/STAT-Signalkaskade durch die Stimulation von V_GhIFNGR1 und V_chIFNGR2 durch CGGC (hellgrüner Haken mit Fragezeichen). Nach Stimulation von V_C hIFNGR1 und V_G hIFNGR2 mit CGGC wird die JAK/STAT-Signalkaskade vermutlich nicht aktiviert (hellrotes Kreuz mit Fragezeichen).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die generelle Anwendbarkeit des SyCyR-Systems auf die Typ II Interferonrezeptoren noch nicht vollständig geklärt ist und in weiterführenden Forschungsarbeiten überprüft werden muss. Sollte die Anwendbarkeit nachgewiesen werden können, sollte der Fokus weiterer Experimente auf dem direkten Vergleich zwischen der STAT1-Phosphorylierung von synthetischem und natürlichem Rezeptor sowie auf der nach Stimulation ausgelösten Genaktivierung liegen.

4.4 Anwendungsmöglichkeiten für synthetische Interferonrezeptoren in Forschung und Klinik

Synthetische Rezeptoren sind schon seit Langem Bestandteil der Forschung. Viele der bisher existierenden Systeme unterliegen jedoch entscheidenden Nachteilen. So basieren z.B. Epogp130 Rezeptoren, deren extrazelluläre Domäne vom Epo-Rezeptor (Epo-R) gebildet wird, auf der Stimulation durch natürliche Liganden [118]. Da Epo nur zu maximal einer Homodimerisierung in der Lage ist, besteht hierbei eine Limitation hinsichtlich der Steuerbarkeit der Rezeptorassemblierung [118]. Bei klinischer Applikation kann es außerdem durch Kreuzreaktivität mit den natürlichen Epo-Rezeptoren zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen [119]. Durch die Etablierung des Systems der synthetischen Zytokinrezeptoren (SyCyR) [1] für die Interferon-Signaltransduktion wird eine Vielzahl von Untersuchungen zur Signalkaskade und Rezeptoraktivierung der Interferonrezeptoren hintergrundfrei und ausschaltbar ermöglicht. Außerdem kann die Assemblierung der Rezeptoruntereinheiten durch unterschiedliche Varianten des Liganden in unterschiedlichen Konfigurationen erfolgen und hierdurch kontrolliert werden. In der Forschung kann so, basierend auf diesem System, beispielsweise die bereits in Punkt 4.2 behandelte Funktion intrazellulärer Tyrosine für die STAT-Bindung und Phosphorylierung weiter beleuchtet werden. Auch die in Abschnitt 4.1.2 erwähnte, bislang noch nicht vollständig verstandene Bedeutung der hIFNAR1-Untereinheit für die biologische Wirkung der Typ I Interferone könnte hiermit genauer untersucht werden. Ein weiterer möglicher Forschungsansatz mit synthetischen hIFNARs liegt in der Analyse biologischer Konsequenzen von single nucleotide variants (SNVs). Eine 2014 veröffentliche Studie stellt einen Zusammenhang zwischen in IFNAR1 und IFNGR1 auftretenden SNVs her, wonach diese mit einem erhöhten Risiko für kolorektale Karzinome einhergehen [120]. Durch Einbringen gezielter Mutationen in die entsprechenden IFNAR- und IFNGR-Untereinheiten, sofern sich das SyCyR-System für hIFNGR anwendbar zeigt, und Kontrolle der Genexpression nach Stimulation letzterer könnten diese genauer untersucht und so die durch diese Mutation ausgelösten Veränderungen in der biologischen Aktivität von hIFNGR und hIFNAR eruiert werden.

Vor klinischem Einsatz der synthetischen Rezeptoren muss sich jedoch mit der in einigen Studien nachgewiesene Toxizität der fluoreszierenden Liganden GFP und mCherry auf Epithelund T-Zellen sowie deren potentiell immunogener Wirkung bei wiederholter Applikation auseinandergesetzt werden [121, 122]. Um die klinische Anwendung zu ermöglichen, müssen zunächst alternative, nebenwirkungsfreie Liganden ermittelt werden und dementsprechend andere *nanobodies* den extrazellulären Rezeptoranteil vervollständigen.

Perspektivisch können synthetische hIFNAR in der Klinik z.B. zu einer Verbesserung der Tumortherapie beitragen. Werden Typ I Interferone zur verstärkten CD8⁺ T-Zell-Aktivierung bei onkologischen Erkrankungen eingesetzt, so tritt nach kurzem antiproliferativem Effekt eine Immunsuppression ein [123]. Dies ist vermutlich durch die Aktivierung von weiteren Zellen in der Tumorumgebung und weniger durch die Wirkung von Typ I Interferonen auf CD8⁺ T-Zellen selbst bedingt [2]. Eine auf CD8⁺ T-Zellen beschränkte Induktion der Typ I IFN-Signalkaskade könnte positiv hierzu beitragen und den antiproliferativen Effekt durch das Verhindern einer Immunsuppression verbessern [2]. Einen weiteren Ansatz für eine therapeutische Anwendung könnte die Synthese von T-Zellen nach dem Herstellungsprinzip von *chimeric antigen receptor*

(CAR)-T-Zellen für die CAR-T-Zell-Therapie, die die synthetischen Rezeptoren exprimieren, bieten [124, 125]. Bei der CAR-T-Zell-Therapie handelt es sich um eine seit 2017 von der FDA zugelassenen Therapie u.a. für die Behandlung des refraktären/rezidivierten diffusgroßzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) [124, 126, 127]. Hierfür werden dem Patienten T-Zellen entnommen und mit der cDNA der CARs ausgestattet [127]. Bei den CARs handelt es sich um Antikörperfragmente, die gegen ein von am Tumor beteiligten B-Zellen verstärkt exprimiertes Antigen gerichtet sind [127-129]. Werden die CARs von den T-Zellen erfolgreich exprimiert, werden sie vervielfältigt, dem Patienten per Infusion wieder verabreicht und tragen durch vielfältige Mechanismen, wie z.B. die durch T-Zellen ausgeübte Zytotoxizität, zur Behandlung des Tumors bei [125]. Wenngleich die CAR-T-Zell Therapie und die ihr zugrundeliegende Methodik zur Synthese von CAR-produzierenden autologen T-Zellen eine vielversprechende Möglichkeit zur Therapie von Tumoren und anderen Erkrankungen darstellt, wird besonders im Bereich der möglichen auftretenden schweren Nebenwirkungen, wie dem potentiell letal verlaufenden cytokine release syndrome (CRS), intensive Forschung betrieben, um das Risiko hierfür zu minimieren [124]. Im speziellen Fall der synthetischen Interferonrezeptoren wäre bei klinischer Anwendung zu beachten, dass die Stimulation des synthetischen Rezeptors und Initiation der intrazellulären Signalkaskade unter anderem in einer Ausschüttung von Typ I Interferonen durch die aktivierte Zelle resultieren kann, die dann die natürlichen hIFNARs umliegender Zellen stimulieren könnten (zusammengefasst in [3]). Ob der Einsatz synthetischer Liganden im Vergleich zur direkten Applikation von Typ I Interferonen also tatsächlich zu einer verringerten Aktivierung weiterer Zellen der Tumorumgebung führt und hierdurch ein Vorteil bei der Aktivierung der CD8⁺ T-Zell-Aktivierung entsteht, muss zuvor geprüft werden. Interessant wäre, ob die intrazelluläre Signalkaskade der synthetischen Interferonrezeptoren durch gezielte Modifikationen so verändert werden könnte, dass eine Produktion und Ausschüttung von Typ I Interferonen durch die aktivierte Zelle unterbliebe und somit die unerwünschte Aktivierung natürlicher hIFNARs benachbarter Zellen verhindert würde.

Es wird deutlich, dass die Möglichkeit zur gezielten Untersuchung und Modifikation von Interferonrezeptoren ein großes Feld möglicher Anwendungen in Forschung und Klinik eröffnet, das dazu beitragen kann, die ambivalenten biologischen Effekte der Interferone besser zu verstehen und nebenwirkungsfreier nutzbar zu machen.

4.5 Schlussfolgerung

Diese Arbeit stellt zusammenfassend heraus, dass das System der synthetischen Zytokinrezeptoren ebenfalls auf humane Typ I Interferonrezeptoren anwendbar ist. Wie aus der Aktivierung der Signalkaskade und dem Proliferationsverhalten der synthetischen IFNAR zu erkennen ist, phänokopieren die synthetischen hIFNAR die Signalkaskade des Wildtyprezeptors. Weitere Untersuchungen zur Genexpression und biologischen Aktivität der Rezeptoren sollen diese Ergebnisse in Zukunft weiter untermauern. Durch die mit Hilfe der Liganden mögliche Untersuchung von ungewöhnlichen Rezeptorkombinationen konnte die Aktivierung der JAK/STAT Signalkaskade durch hIFNAR2-Homodimere nachgewiesen werden und somit die Relevanz dieser Rezeptoruntereinheit herausgestellt werden. Gleichzeitig eröffnet die Etablierung des SyCyR-Systems neue Möglichkeiten zur Untersuchung der in der Klinik in den Fokus gerückten hIFNAR1 Untereinheit. Auch die Relevanz der mIFNAR2-

Tyrosinreste Y335 und Y510 für die STAT-Bindung und Phosphorylierung konnte dargestellt werden. Abschließend wurde die mögliche Aktivierung von STAT1 durch Stimulation von synthetischen hIFNGR beobachtet, die eine Grundlage für weitere Analysen hinsichtlich der Anwendbarkeit des SyCyR-Systems für die Typ II Interferone bildet. Zusammenfassend ermöglicht die Etablierung der synthetischen Zytokinrezeptoren für die humanen IFNAR hintergrundfreie Untersuchungen Signalkaskade und genauere, der einzelner Rezeptorkomponenten. Dies ebnet den Weg für die Etablierung des Systems für weitere Zytokinrezeptoren. In Zukunft bietet der Einsatz von synthetischen Interferonrezeptoren großes Potential bei der weiteren Forschung sowohl an der Signaltransduktion und den bisher umstrittenen Eigenschaften der Rezeptoruntereinheiten als auch an z.B. durch SNVs ausgelösten Erkrankungen. Langfristig könnte die Anwendung synthetischer Interferonrezeptoren eine zielgerichtetere, auf CD8⁺ T-Zellen basierende Krebstherapie sowie eine nebenwirkungsärmere Immuntherapie durch genaue Aktivierbarkeit sowie An- und Ausschaltbarkeit der synthetischen Rezeptoren ermöglichen.

5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematischer Aufbau der Interferonrezeptoren der Interferone Typ I bis III und deren Signaltransduktion (angelehnt an [4]).	2
Abb. 2:	Beispielhafte Expression von Typ I Interferonen nach viraler Infektion der Wirtszelle.	4
Abb. 3:	Aufbau eines humanen Immunglobulin (Ig)G-Antikörpers (A), eines cameliden <i>heavy-chain-only</i> -Antikörpers (B) und eines synthetischen Zytokinrezeptors (SyCyR) (C)	9
Abb. 4:	Site directed mutagenesis PCR (Angelehnt an [94])	. 22
Abb. 5:	Die Konstruktionsstrategie der SyCyRs wurde aus vorherigen Arbeiten auf die humanen IFNα-Rezeptoren adaptiert.	. 31
Abb. 6:	Klonierung des Expressionsvektors für die <i>complementary</i> DNA (cDNA) von V _c hIFNAR2-2A-V _G hIFNAR1.	. 32
Abb. 7:	Klonierung des Expressionsvektors für die cDNA von V _c hIFNAR2-2A- V _G hIFNAR1 (V _G hIFNAR1+V _c hIFNAR2)	. 33
Abb. 8:	Die Untereinheiten des synthetischen hIFN α -Rezeptors (V _G hIFNAR1+V _C hIFNAR2) werden in HEK293T Zellen exprimiert	. 34
Abb. 9:	Schematischer Aufbau des synthetischen hIFN α -Rezeptors (V _G hIFNAR1 V _C hIFNAR2) mit den verwendeten synthetischen Liganden	. 35
Abb. 10:	Die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges der synthetischen hIFNα- Rezeptoren und der mIFNα-Rezeptoren ist vergleichbar	. 36
Abb. 11:	Klonierung des pMOWS-puro-Vektors für die SyCyR-V _c hIFNAR2-2A- V _G hIFNAR1 cDNA	. 38
Abb. 12:	Die synthetischen hIFNα-Rezeptoren werden exprimiert	. 39
Abb. 13:	Synthetische mIFNα- und hIFNα-Rezeptoren werden auf der Oberfläche von Ba/F3-gp130 Zellen exprimiert	. 40
Abb. 14:	Stabil transduzierte Ba/F3-gp130 Zelllinien zeigen keine ligandenabhängige Proliferation	. 41
Abb. 15:	Die aktivierten Signalkaskaden von synthetischen mIFNα- und hIFNα- Rezeptoren sind vergleichbar.	. 42
Abb. 16:	Schema der intrazellulären Tyrosine des synthetischen mIFNAR und hIFNAR	. 44
Abb. 17:	Klonierung der Mutationsvariante pcDNA3.1-SyCyR-V _c mIFNAR2-2A- V _G mIFNAR1-V459A	. 45
Abb. 18:	Die Mutationsvariante pcDNA3.1-SyCyR-V _c mIFNAR2-2A-V _G mIFNAR1- V459A wird von HEK293T Zellen exprimiert	. 46

Abb. 19:	Die vorhandenen Mutationsvarianten werden von HEK293T Zellen exprimiert.	47
Abb. 20:	Die Stimulation der Mutationsvariante V _G mIFNAR1 V _C mIFNAR2 Y335F Y510F führt zu einer verminderten Aktivierung von pSTAT1	48
Abb. 21:	Klonierungsschema für die Plasmide der analysierten Mutationsvarianten	49
Abb. 22:	Analyse der retroviralen Expressionsvektoren für die mIFNAR1 und mIFNAR2 Mutationsvarianten.	50
Abb. 23:	Synthetische, murine Typ I IFN-Rezeptorvarianten werden auf der Oberfläche von Ba/F3-gp130 Zellen exprimiert	51
Abb. 24:	Klonierung des Plasmids pcDNA3.1-SyCyR-V _c hIFNGR2-2A-V _G hIFNGR1	52
Abb. 25:	Erzeugung verschiedener Varianten des synthetischen hIFNGR	54
Abb. 26:	Klonierungsschema der Varianten pcDNA3.1-SyCyR-V _c hIFNGR1-2A- V _G hIFNGR1 und pcDNA3.1-SyCyR-V _c hIFNGR2-2A-V _G hIFNGR2 sowie pcDNA3.1-SyCyR-V _c hIFNGR1-2A-V _G hIFNGR2	55
Abb. 27:	Klonierung der verschiedenen Varianten des synthetischen hIFNGRs.	56
Abb. 28:	Die Varianten des humanen synthetischen IFNGR werden in HEK293T Zellen exprimiert.	58
Abb. 29:	Die Varianten der humanen synthetischen IFNG-Zytokinrezeptoren können in HEK293 Zellen nicht von synthetischen Liganden stimuliert werden	60
Abb. 30:	Klonierung der Varianten des humanen synthetischen IFNGR in den pMOWS-puro-Vektor.	61
Abb. 31:	Expression der verschiedenen Varianten des synthetischen humanen IFNGR von HEK293T Zellen.	62
Abb. 32:	Verschiedene synthetische humane IFNGR werden auf der Oberfläche von Ba/F3-gp130 Zellen exprimiert	63
Abb. 33:	Analyse der Signaltransduktion nach Stimulation der Rezeptoren in stabil transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen	64
Abb. 34:	Die Stimulation des Rezeptors V _c hIFNGR1 V _G hIFNGR2 induziert keine ligandenabhängige Proliferation in Ba/F3-gp130 Zellen	66
Abb. 35:	Aktivierung verschiedener Varianten des synthetischen hIFNGR durch zwei verschiedene synthetische Liganden.	73

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Antibiotika11
Tabelle 2:	Antikörper11
Tabelle 3:	Verwendete Chemikalien12
Tabelle 4:	Verwendete Geräte
Tabelle 5:	Kits
Tabelle 6:	Medien14
Tabelle 7:	Verwendete Oligonukleotide15
Tabelle 8:	Plasmide16
Tabelle 9:	Puffer und Lösungen 17
Tabelle 10:	Rekombinante Proteine
Tabelle 11:	Zelllinien und Bakterienstämme19
Tabelle 12:	PCR-Ansatz zur Durchführung einer colony PCR
Tabelle 13:	Reaktionsschritte der colony PCR
Tabelle 14:	Reaktionsansatz der SDM-PCR
Tabelle 15:	Reaktionsschritte der SDM-PCR
Tabelle 16:	Ligationsansatz
Tabelle 17: A	nsatz für die PNK-Behandlung25
Tabelle 18:	Zusammensetzung der SDS-Gele
Tabelle 19:	Potentielle Rezeptorkonfigurationen nach Stimulation mit synthetischen Liganden

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Engelowski, E., A. Schneider, M. Franke, H. Xu, R. Clemen, A. Lang, P. Baran, C. Binsch, B. Knebel, H. Al-Hasani, J.M. Moll, D.M. Floss, P.A. Lang, and J. Scheller, *Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands.* Nature Communications, 2018. 9(1): p. 2034.
- Zoellner, N., N. Coesfeld, F.H. De Vos, J. Denter, H.C. Xu, E. Zimmer, B. Knebel, H. Al-Hasani, S. Mossner, P.A. Lang, D.M. Floss, and J. Scheller, *Synthetic mimetics assigned a major role to IFNAR2 in type I interferon signaling*. Frontiers in Microbiology, 2022. 13: p. 3254.
- 3. Lazear, H.M., J.W. Schoggins, and M.S. Diamond, *Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons.* Immunity, 2019. 50(4): p. 907-923.
- 4. Negishi, H., T. Taniguchi, and H. Yanai, *The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family.* Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2018. 10(11). a028423.
- 5. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon.* Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences, 1957. 147(927): p. 258-267.
- Isaacs, A., J. Lindenmann, and R.C. Valentine, Virus interference. II. Some properties of interferon. Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences, 1957. 147(927): p. 268-273.
- 7. Muller, U., U. Steinhoff, L.F. Reis, S. Hemmi, J. Pavlovic, R.M. Zinkernagel, and M. Aguet, *Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense.* Science, 1994. 264(5167): p. 1918-1921.
- 8. Zhang, Q., P. Bastard, Z. Liu, J. Le Pen, M. Moncada-Velez, J. Chen, M. Ogishi, I.K.D. Sabli, S. Hodeib, C. Korol, J. Rosain, K. Bilguvar, J. Ye, A. Bolze, B. Bigio, R. Yang, A.A. Arias, Q. Zhou, Y. Zhang, F. Onodi, S. Korniotis, L. Karpf, Q. Philippot, M. Chbihi, L. Bonnet-Madin, K. Dorgham, N. Smith, W.M. Schneider, B.S. Razooky, H.H. Hoffmann, E. Michailidis, L. Moens, J.E. Han, L. Lorenzo, L. Bizien, P. Meade, A.L. Neehus, A.C. Ugurbil, A. Corneau, G. Kerner, P. Zhang, F. Rapaport, Y. Seeleuthner, J. Manry, C. Masson, Y. Schmitt, A. Schluter, T. Le Voyer, T. Khan, J. Li, J. Fellay, L. Roussel, M. Shahrooei, M.F. Alosaimi, D. Mansouri, H. Al-Saud, F. Al-Mulla, F. Almourfi, S.Z. Al-Muhsen, F. Alsohime, S. Al Turki, R. Hasanato, D. van de Beek, A. Biondi, L.R. Bettini, M. D'Angio, P. Bonfanti, L. Imberti, A. Sottini, S. Paghera, E. Quiros-Roldan, C. Rossi, A.J. Oler, M.F. Tompkins, C. Alba, I. Vandernoot, J.C. Goffard, G. Smits, I. Migeotte, F. Haerynck, P. Soler-Palacin, A. Martin-Nalda, R. Colobran, P.E. Morange, S. Keles, F. Colkesen, T. Ozcelik, K.K. Yasar, S. Senoglu, S.N. Karabela, C. Rodriguez-Gallego, G. Novelli, S. Hraiech, Y. Tandjaoui-Lambiotte, X. Duval, C. Laouenan, C.-S. Clinicians, C. Clinicians, C.G. Imagine, C.C.S.G. French, V.C.C. Co, U.M.C.C.-B. Amsterdam, C.H.G. Effort, N.-U.T.C.I. Group, A.L. Snow, C.L. Dalgard, J.D. Milner, D.C. Vinh, T.H. Mogensen, N. Marr, A.N. Spaan, B. Boisson, S. Boisson-Dupuis, J. Bustamante, A. Puel, M.J. Ciancanelli, I. Meyts, T. Maniatis, V. Soumelis, A. Amara, M. Nussenzweig, A. Garcia-Sastre, F. Krammer, A. Pujol, D. Duffy, R.P. Lifton, S.Y. Zhang, G. Gorochov, V. Beziat, E. Jouanguy, V. Sancho-Shimizu, C.M. Rice, L. Abel, L.D. Notarangelo, A. Cobat, H.C. Su and J.L. Casanova, Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. Science, 2020. 370(6515): p. eabd4570.
- 9. Mazewski, C., R.E. Perez, E.N. Fish, and L.C. Platanias, *Type I Interferon (IFN)-Regulated Activation of Canonical and Non-Canonical Signaling Pathways.* Frontiers in Immunology, 2020. 11: p. 606456.
- 10. Mesev, E.V., R.A. LeDesma, and A. Ploss, *Decoding type I and III interferon signalling during viral infection*. Nature Microbiology, 2019. 4(6): p. 914-924.
- 11. Schreiber, G., *The Role of Type I Interferons in the Pathogenesis and Treatment of COVID-19.* Frontiers in Immunology, 2020. 11: p. 595739.

- LaFleur, D.W., B. Nardelli, T. Tsareva, D. Mather, P. Feng, M. Semenuk, K. Taylor, M. Buergin, D. Chinchilla, V. Roshke, G. Chen, S.M. Ruben, P.M. Pitha, T.A. Coleman, and P.A. Moore, *Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes.* Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(43): p. 39765-39771.
- Fung, K.Y., N.E. Mangan, H. Cumming, J.C. Horvat, J.R. Mayall, S.A. Stifter, N. De Weerd, L.C. Roisman, J. Rossjohn, S.A. Robertson, J.E. Schjenken, B. Parker, C.E. Gargett, H.P. Nguyen, D.J. Carr, P.M. Hansbro, and P.J. Hertzog, *Interferon-epsilon protects the female reproductive tract from viral and bacterial infection*. Science, 2013. 339(6123): p. 1088-1092.
- 14. Wheelock, E.F., Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. Science, 1965. 149(3681): p. 310-311.
- 15. Gray, P.W. and D.V. Goeddel, *Structure of the human immune interferon gene.* Nature, 1982. 298(5877): p. 859-863.
- 16. Alspach, E., D.M. Lussier, and R.D. Schreiber, *Interferon γ* and *Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity.* Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2019. 11(3). a028480.
- 17. Barrat, F.J., M.K. Crow, and L.B. Ivashkiv, *Interferon target-gene expression and epigenomic signatures in health and disease.* Nature Immunology, 2019. 20(12): p. 1574-1583.
- 18. Park, A. and A. Iwasaki, *Type I and Type III Interferons Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19.* Cell Host & Microbe, 2020. 27(6): p. 870-878.
- 19. de Weerd, N.A., J.P. Vivian, T.K. Nguyen, N.E. Mangan, J.A. Gould, S.J. Braniff, L. Zaker-Tabrizi, K.Y. Fung, S.C. Forster, T. Beddoe, H.H. Reid, J. Rossjohn, and P.J. Hertzog, *Structural basis of a unique interferon-beta signaling axis mediated via the receptor IFNAR1*. Nature Immunology, 2013. 14(9): p. 901-907.
- 20. de Weerd, N.A., A.Y. Matthews, P.R. Pattie, N.M. Bourke, S.S. Lim, J.P. Vivian, J. Rossjohn, and P.J. Hertzog, *A hot spot on interferon alpha/beta receptor subunit 1 (IFNAR1) underpins its interaction with interferon-beta and dictates signaling.* Journal of Biological Chemistry, 2017. 292(18): p. 7554-7565.
- 21. Harris, B.D., J. Schreiter, M. Chevrier, J.L. Jordan, and M.R. Walter, *Human interferon-ε and interferon-kappa exhibit low potency and low affinity for cell-surface IFNAR and the poxvirus antagonist B18R.* Journal of Biological Chemistry, 2018. 293(41): p. 16057-16068.
- 22. Harari, D., N. Kuhn, R. Abramovich, K. Sasson, A.L. Zozulya, P. Smith, M. Schlapschy, R. Aharoni, M. Koster, R. Eilam, A. Skerra, and G. Schreiber, *Enhanced in vivo efficacy of a type I interferon superagonist with extended plasma half-life in a mouse model of multiple sclerosis.* Journal of Biological Chemistry, 2014. 289(42): p. 29014-29029.
- 23. Jaks, E., M. Gavutis, G. Uze, J. Martal, and J. Piehler, *Differential receptor subunit affinities* of type I interferons govern differential signal activation. Journal of Molecular Biology, 2007. 366(2): p. 525-539.
- 24. Uzé, G., G. Lutfalla, and I. Gresser, *Genetic transfer of a functional human interferon* α *receptor into mouse cells: Cloning and expression of its c-DNA*. Cell, 1990. 60(2): p. 225-234.
- 25. Colamonici, O., H. Yan, P. Domanski, R. Handa, D. Smalley, J. Mullersman, M. Witte, K. Krishnan, and J. Krolewski, *Direct binding to and tyrosine phosphorylation of the alpha subunit of the type l interferon receptor by p135tyk2 tyrosine kinase.* Molecular and Cellular Biology, 1994. 14(12): p. 8133-8142.
- 26. Novick, D., *The human interferon alpha/beta receptor: Characterization and molecular cloning.* Cell, 1994. 77(3): p. 391-400.
- 27. Lutfalla, G., S.J. Holland, E. Cinato, D. Monneron, J. Reboul, N.C. Rogers, J.M. Smith, G.R. Stark, K. Gardiner, K.E. Mogensen, and et al., *Mutant U5A cells are complemented by an interferon-alpha beta receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster*. EMBO Journal, 1995. 14(20): p. 5100-5108.

- 28. Saleh, A.Z., V.P. Nguyen, and J.J. Krolewski, *Affinity of Stat2 for the subunits of the interferon alpha receptor*. Biochemistry, 2002. 41(37): p. 11261-11268.
- 29. Li, X., S. Leung, I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Functional subdomains of STAT2 required for preassociation with the alpha interferon receptor and for signaling.* Molecular and Cellular Biology, 1997. 17(4): p. 2048-2056.
- Nguyen, V.-P., A.Z. Saleh, A.E. Arch, H. Yan, F. Piazza, J. Kim, and J.J. Krolewski, *Stat2 binding to the interferon-α receptor 2 subunit is not required for interferon-α signaling*. Journal of Biological Chemistry, 2002. 277(12): p. 9713-9721.
- 31. Urin, V., M. Shemesh, and G. Schreiber, *CRISPR/Cas9-based Knockout Strategy Elucidates Components Essential for Type 1 Interferon Signaling in Human HeLa Cells.* Journal of Molecular Biology, 2019. 431(17): p. 3324-3338.
- Mendoza, J.L., N.K. Escalante, K.M. Jude, J. Sotolongo Bellon, L. Su, T.M. Horton, N. Tsutsumi, S.J. Berardinelli, R.S. Haltiwanger, J. Piehler, E.G. Engleman, and K.C. Garcia, Structure of the IFNgamma receptor complex guides design of biased agonists. Nature, 2019. 567(7746): p. 56-60.
- 33. Sotolongo Bellon, J., O. Birkholz, C.P. Richter, F. Eull, H. Kenneweg, S. Wilmes, U. Rothbauer, C. You, M.R. Walter, R. Kurre, and J. Piehler, *Four-color single-molecule imaging with engineered tags resolves the molecular architecture of signaling complexes in the plasma membrane.* Cell Rep Methods, 2022. 2(2): p. 100165.
- 34. Crow, M.K., M. Olferiev, and K.A. Kirou, *Type I Interferons in Autoimmune Disease*. Annual Review of Pathology, 2019. 14(1): p. 369-393.
- 35. Yarilina, A., K.H. Park-Min, T. Antoniv, X. Hu, and L.B. Ivashkiv, *TNF activates an IRF1*dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1dependent type l interferon-response genes. Nature Immunology, 2008. 9(4): p. 378-387.
- 36. Ito, T., H. Kanzler, O. Duramad, W. Cao, and Y.J. Liu, *Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells.* Blood, 2006. 107(6): p. 2423-2431.
- 37. Guiducci, C., C. Ghirelli, M.A. Marloie-Provost, T. Matray, R.L. Coffman, Y.J. Liu, F.J. Barrat, and V. Soumelis, *PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid predendritic cells in response to TLR activation.* Journal of Experimental Medicine, 2008. 205(2): p. 315-322.
- 38. Honda, K., H. Yanai, H. Negishi, M. Asagiri, M. Sato, T. Mizutani, N. Shimada, Y. Ohba, A. Takaoka, N. Yoshida, and T. Taniguchi, *IRF-7 is the master regulator of type-I interferondependent immune responses.* Nature, 2005. 434(7034): p. 772-777.
- 39. Gong, T., L. Liu, W. Jiang, and R. Zhou, *DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases.* Nature Reviews: Immunology, 2020. 20(2): p. 95-112.
- 40. Ivashkiv, L.B., *IFNgamma: signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy.* Nature Reviews: Immunology, 2018. 18(9): p. 545-558.
- Tripp, C.S., S.F. Wolf, and E.R. Unanue, Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. 90(8): p. 3725-3729.
- 42. Okamura, H., H. Tsutsi, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori, and et al., *Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells*. Nature, 1995. 378(6552): p. 88-91.
- 43. Rivera-Serrano, E.E., A.S. Gizzi, J.J. Arnold, T.L. Grove, S.C. Almo, and C.E. Cameron, *Viperin Reveals Its True Function.* Annual Review of Virology, 2020. 7(1): p. 421-446.
- 44. Schneider, W.M., M.D. Chevillotte, and C.M. Rice, *Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses.* Annual Review of Immunology, 2014. 32: p. 513-545.

- 45. Lee, A.J. and A.A. Ashkar, *The Dual Nature of Type I and Type II Interferons*. Frontiers in Immunology, 2018. 9: p. 2061.
- 46. Chin, K.C. and P. Cresswell, *Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. 98(26): p. 15125-15130.
- 47. Pervolaraki, K., S. Rastgou Talemi, D. Albrecht, F. Bormann, C. Bamford, J.L. Mendoza, K.C. Garcia, J. McLauchlan, T. Hofer, M.L. Stanifer, and S. Boulant, *Differential induction of interferon stimulated genes between type I and type III interferons is independent of interferon receptor abundance.* PLoS Pathogens, 2018. 14(11): p. e1007420.
- 48. Zhou, Z., O.J. Hamming, N. Ank, S.R. Paludan, A.L. Nielsen, and R. Hartmann, Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. Journal of Virology, 2007. 81(14): p. 7749-7758.
- 49. Wang, X., E.R. Hinson, and P. Cresswell, *The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts.* Cell Host & Microbe, 2007. 2(2): p. 96-105.
- 50. Nasr, N., S. Maddocks, S.G. Turville, A.N. Harman, N. Woolger, K.J. Helbig, J. Wilkinson, C.R. Bye, T.K. Wright, D. Rambukwelle, H. Donaghy, M.R. Beard, and A.L. Cunningham, *HIV-1 infection of human macrophages directly induces viperin which inhibits viral production*. Blood, 2012. 120(4): p. 778-788.
- 51. Schreiber, R.D., L.J. Hicks, A. Celada, N.A. Buchmeier, and P.W. Gray, *Monoclonal-Antibodies to Murine Gamma-Interferon Which Differentially Modulate Macrophage Activation and Antiviral Activity.* Journal of Immunology, 1985. 134(3): p. 1609-1618.
- 52. Chang, C.H., J. Hammer, J.E. Loh, W.L. Fodor, and R.A. Flavell, *The activation of major histocompatibility complex class I genes by interferon regulatory factor-1 (IRF-1)*. Immunogenetics, 1992. 35(6): p. 378-384.
- 53. Apelbaum, A., G. Yarden, S. Warszawski, D. Harari, and G. Schreiber, *Type I interferons induce apoptosis by balancing cFLIP and caspase-8 independent of death ligands.* Molecular and Cellular Biology, 2013. 33(4): p. 800-814.
- 54. Bernardo, A.R., J.M. Cosgaya, A. Aranda, and A.M. Jimenez-Lara, *Synergy between RA and TLR3 promotes type I IFN-dependent apoptosis through upregulation of TRAIL pathway in breast cancer cells.* Cell Death & Disease, 2013. 4(1): p. e479.
- 55. Chawla-Sarkar, M., D.W. Leaman, and E.C. Borden, *Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines.* Clinical Cancer Research, 2001. 7(6): p. 1821-1831.
- 56. Gocher, A.M., C.J. Workman, and D.A.A. Vignali, *Interferon-gamma: teammate or opponent in the tumour microenvironment?* Nature Reviews: Immunology, 2022. 22(3): p. 158-172.
- Benci, J.L., B. Xu, Y. Qiu, T.J. Wu, H. Dada, C. Twyman-Saint Victor, L. Cucolo, D.S.M. Lee, K.E. Pauken, A.C. Huang, T.C. Gangadhar, R.K. Amaravadi, L.M. Schuchter, M.D. Feldman, H. Ishwaran, R.H. Vonderheide, A. Maity, E.J. Wherry, and A.J. Minn, *Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade.* Cell, 2016. 167(6): p. 1540-1554 e1512.
- 58. de Jesus, A.A., Y. Hou, S. Brooks, L. Malle, A. Biancotto, Y. Huang, K.R. Calvo, B. Marrero, S. Moir, A.J. Oler, Z. Deng, G.A. Montealegre Sanchez, A. Ahmed, E. Allenspach, B. Arabshahi, E. Behrens, S. Benseler, L. Bezrodnik, S. Bout-Tabaku, A.C. Brescia, D. Brown, J.M. Burnham, M.S. Caldirola, R. Carrasco, A.Y. Chan, R. Cimaz, P. Dancey, J. Dare, M. DeGuzman, V. Dimitriades, I. Ferguson, P. Ferguson, L. Finn, M. Gattorno, A.A. Grom, E.P. Hanson, P.J. Hashkes, C.M. Hedrich, R. Herzog, G. Horneff, R. Jerath, E. Kessler, H. Kim, D.J. Kingsbury, R.M. Laxer, P.Y. Lee, M.A. Lee-Kirsch, L. Lewandowski, S. Li, V. Lilleby, V. Mammadova, L.N. Moorthy, G. Nasrullayeva, K.M. O'Neil, K. Onel, S. Ozen, N. Pan, P. Pillet, D.G. Piotto, M.G. Punaro, A. Reiff, A. Reinhardt, L.G. Rider, R. Rivas-Chacon, T. Ronis, A. Rosen-Wolff, J. Roth,

N.M. Ruth, M. Rygg, H. Schmeling, G. Schulert, C. Scott, G. Seminario, A. Shulman, V. Sivaraman, M.B. Son, Y. Stepanovskiy, E. Stringer, S. Taber, M.T. Terreri, C. Tifft, T. Torgerson, L. Tosi, A. Van Royen-Kerkhof, T. Wampler Muskardin, S.W. Canna, and R. Goldbach-Mansky, *Distinct interferon signatures and cytokine patterns define additional systemic autoinflammatory diseases.* Journal of Clinical Investigation, 2020. 130(4): p. 1669-1682.

- 59. Brehm, A., Y. Liu, A. Sheikh, B. Marrero, E. Omoyinmi, Q. Zhou, G. Montealegre, A. Biancotto, A. Reinhardt, A. Almeida de Jesus, M. Pelletier, W.L. Tsai, E.F. Remmers, L. Kardava, S. Hill, H. Kim, H.J. Lachmann, A. Megarbane, J.J. Chae, J. Brady, R.D. Castillo, D. Brown, A.V. Casano, L. Gao, D. Chapelle, Y. Huang, D. Stone, Y. Chen, F. Sotzny, C.C. Lee, D.L. Kastner, A. Torrelo, A. Zlotogorski, S. Moir, M. Gadina, P. McCoy, R. Wesley, K.I. Rother, P.W. Hildebrand, P. Brogan, E. Kruger, I. Aksentijevich, and R. Goldbach-Mansky, Additive loss-of-function proteasome subunit mutations in CANDLE/PRAAS patients promote type I IFN production. Journal of Clinical Investigation, 2015. 125(11): p. 4196-4211.
- 60. Steinberg, A.D., S. Baron, and N. Talal, *The Pathogenesis of Autoimmunity in New Zealand Mice, I. Induction of Antinucleic Acid Antibodies by Polyinosinic Polycytidylic Acid.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1969. 63(4): p. 1102-1107.
- 61. Kirou, K.A., C. Lee, S. George, K. Louca, I.G. Papagiannis, M.G. Peterson, N. Ly, R.N. Woodward, K.E. Fry, A.Y. Lau, J.G. Prentice, J.G. Wohlgemuth, and M.K. Crow, *Coordinate overexpression of interferon-alpha-induced genes in systemic lupus erythematosus.* Arthritis and Rheumatism, 2004. 50(12): p. 3958-3967.
- Baechler, E.C., F.M. Batliwalla, G. Karypis, P.M. Gaffney, W.A. Ortmann, K.J. Espe, K.B. Shark, W.J. Grande, K.M. Hughes, V. Kapur, P.K. Gregersen, and T.W. Behrens, *Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. 100(5): p. 2610-2615.
- 63. Bracaglia, C., K. de Graaf, D. Pires Marafon, F. Guilhot, W. Ferlin, G. Prencipe, I. Caiello, S. Davi, G. Schulert, A. Ravelli, A.A. Grom, C. de Min, and F. De Benedetti, *Elevated circulating levels of interferon-gamma and interferon-gamma-induced chemokines characterise patients with macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis.* Annals of the Rheumatic Diseases, 2017. 76(1): p. 166-172.
- 64. Kirkwood, J.M., J.G. Ibrahim, J.A. Sosman, V.K. Sondak, S.S. Agarwala, M.S. Ernstoff, and U. Rao, High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801. Journal of Clinical Oncology, 2001. 19(9): p. 2370-2380.
- 65. Lu, L.Y., P.H. Feng, M.S. Yu, M.C. Chen, A.J. Lin, J.L. Chen, and L.H. Yu, *Current utilization of interferon alpha for the treatment of coronavirus disease 2019: A comprehensive review.* Cytokine and Growth Factor Reviews, 2022. 63: p. 34-43.
- 2hou, Q., V. Chen, C.P. Shannon, X.-S. Wei, X. Xiang, X. Wang, Z.-H. Wang, S.J. Tebbutt, T.R. Kollmann, and E.N. Fish, *Interferon-α2b Treatment for COVID-19.* Frontiers in Immunology, 2020. 11: p. 1061.
- 67. Almeida, P.H., C.E.L. Matielo, L.A. Curvelo, R.A. Rocco, G. Felga, B. Della Guardia, and Y.L. Boteon, *Update on the management and treatment of viral hepatitis.* World Journal of Gastroenterology, 2021. 27(23): p. 3249-3261.
- 68. Dietz, C. and B. Maasoumy, *Direct-Acting Antiviral Agents for Hepatitis C Virus Infection-From Drug Discovery to Successful Implementation in Clinical Practice.* Viruses, 2022. 14(6).
- 69. Jakimovski, D., C. Kolb, M. Ramanathan, R. Zivadinov, and B. Weinstock-Guttman, *Interferon beta for Multiple Sclerosis.* Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2018. 8(11). a032003.

- 70. Fridy, P.C., Y. Li, S. Keegan, M.K. Thompson, I. Nudelman, J.F. Scheid, M. Oeffinger, M.C. Nussenzweig, D. Fenyo, B.T. Chait, and M.P. Rout, *A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires.* Nature methods, 2014. 11(12): p. 1253-1260.
- 71. Rothbauer, U., K. Zolghadr, S. Muyldermans, A. Schepers, M.C. Cardoso, and H. Leonhardt, *A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins.* Molecular & Cellular Proteomics, 2008. 7(2): p. 282-289.
- 72. Mossner, S., M. Kuchner, N. Fazel Modares, B. Knebel, H. Al-Hasani, D.M. Floss, and J. Scheller, *Synthetic interleukin 22 (IL-22) signaling reveals biological activity of homodimeric IL-10 receptor 2 and functional cross-talk with the IL-6 receptor gp130.* Journal of Biological Chemistry, 2020. 295(35): p. 12378-12397.
- 73. Mossner, S., D.M. Floss, and J. Scheller, *Pro- and anti-apoptotic fate decisions induced by di- and trimeric synthetic cytokine receptors.* iScience, 2021. 24(5): p. 102471.
- 74. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea.* Journal of Cellular and Comparative Physiology, 1962. 59: p. 223-239.
- 75. Cormack, B.P., R.H. Valdivia, and S. Falkow, *FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)*. Gene, 1996. 173(1 Spec No): p. 33-38.
- 76. von Stetten, D., M. Noirclerc-Savoye, J. Goedhart, T.W. Gadella, Jr., and A. Royant, *Structure* of a fluorescent protein from Aequorea victoria bearing the obligate-monomer mutation A206K. Acta Crystallographica. Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2012. 68(Pt 8): p. 878-882.
- 77. Shaner, N.C., R.E. Campbell, P.A. Steinbach, B.N. Giepmans, A.E. Palmer, and R.Y. Tsien, Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein. Nature Biotechnology, 2004. 22(12): p. 1567-1572.
- Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E.B. Songa,
 N. Bendahman, and R. Hamers, *Naturally occurring antibodies devoid of light chains*.
 Nature, 1993. 363(6428): p. 446-448.
- 79. Wesolowski, J., V. Alzogaray, J. Reyelt, M. Unger, K. Juarez, M. Urrutia, A. Cauerhff, W. Danquah, B. Rissiek, F. Scheuplein, N. Schwarz, S. Adriouch, O. Boyer, M. Seman, A. Licea, D.V. Serreze, F.A. Goldbaum, F. Haag, and F. Koch-Nolte, *Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity*. Medical Microbiology and Immunology, 2009. 198(3): p. 157-174.
- Harmsen, M.M. and H.J. De Haard, Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007. 77(1): p. 13-22.
- 81. Jovcevska, I. and S. Muyldermans, *The therapeutic potential of nanobodies*. Biodrugs, 2020. 34(1): p. 11-26.
- 82. Vaneycken, I., N. Devoogdt, N. Van Gassen, C. Vincke, C. Xavier, U. Wernery, S. Muyldermans, T. Lahoutte, and V. Caveliers, *Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer*. FASEB Journal, 2011. 25(7): p. 2433-2446.
- 83. D'Huyvetter, M., C. Vincke, C. Xavier, A. Aerts, N. Impens, S. Baatout, H. De Raeve, S. Muyldermans, V. Caveliers, N. Devoogdt, and T. Lahoutte, *Targeted radionuclide therapy with A 177Lu-labeled anti-HER2 nanobody*. Theranostics, 2014. 4(7): p. 708-720.
- 84. Poullin, P., C. Bornet, A. Veyradier, and P. Coppo, *Caplacizumab to treat immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura*. Drugs Today (Barc), 2019. 55(6): p. 367-376.
- Kim, A.R., J.C. Ulirsch, S. Wilmes, E. Unal, I. Moraga, M. Karakukcu, D. Yuan, S. Kazerounian, N.J. Abdulhay, D.S. King, N. Gupta, S.B. Gabriel, E.S. Lander, T. Patiroglu, A. Ozcan, M.A. Ozdemir, K.C. Garcia, J. Piehler, H.T. Gazda, D.E. Klein, and V.G. Sankaran, *Functional Selectivity in Cytokine Signaling Revealed Through a Pathogenic EPO Mutation*. Cell, 2017. 168(6): p. 1053-1064 e1015.

- Yan, H., K. Krishnan, A.C. Greenlund, S. Gupta, J.T.E. Lim, R.D. Schreiber, C.W. Schindler, and J.J. Krolewski, *Phosphorylated interferon-alpha receptor 1 subunit (IFNaR1) acts as a docking site for the latent form of the 113 kDa STAT2 protein*. EMBO Journal, 1996. 15(5): p. 1064-1074.
- 87. Gibbs, V.C., M. Takahashi, M. Aguet, and A. Chuntharapai, *A negative regulatory region in the intracellular domain of the human interferon-alpha receptor*. Journal of Biological Chemistry, 1996. 271(45): p. 28710-28716.
- 88. Yan, H., K. Krishnan, J.T. Lim, L.G. Contillo, and J.J. Krolewski, *Molecular characterization of* an alpha interferon receptor 1 subunit (IFNaR1) domain required for TYK2 binding and signal transduction. Molecular and Cellular Biology, 1996. 16(5): p. 2074-2082.
- 89. Wagner, T.C., S. Velichko, D. Vogel, M.S. Rani, S. Leung, R.M. Ransohoff, G.R. Stark, H.D. Perez, and E. Croze, *Interferon signaling is dependent on specific tyrosines located within the intracellular domain of IFNAR2c expression of IFNAR2c tyrosine mutants in U5A cells.* Journal of Biological Chemistry, 2002. 277(2): p. 1493-1499.
- 90. Krishnan, K., B. Singh, and J.J. Krolewski, *Identification of amino acid residues critical for the Src-homology 2 domain-dependent docking of Stat2 to the interferon alpha receptor.* Journal of Biological Chemistry, 1998. 273(31): p. 19495-19501.
- 91. Zhao, W., C. Lee, R. Piganis, C. Plumlee, N. de Weerd, P.J. Hertzog, and C. Schindler, *A conserved IFN-alpha receptor tyrosine motif directs the biological response to type I IFNs.* Journal of Immunology, 2008. 180(8): p. 5483-5489.
- 92. Shemesh, M., S. Lochte, J. Piehler, and G. Schreiber, *IFNAR1 and IFNAR2 play distinct roles in initiating type I interferon-induced JAK-STAT signaling and activating STATs.* Science Signaling, 2021. 14(710): p. eabe4627.
- 93. Mossner, S., H.T. Phan, S. Triller, J.M. Moll, U. Conrad, and J. Scheller, *Multimerization* strategies for efficient production and purification of highly active synthetic cytokine receptor ligands. PloS One, 2020. 15(4): p. e0230804.
- 94. Edelheit, O., A. Hanukoglu, and I. Hanukoglu, *Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies.* BMC Biotechnology, 2009. 9: p. 61.
- 95. Palacios, R. and M. Steinmetz, *II3-Dependent Mouse Clones That Express B-220 Surface-Antigen, Contain Ig Genes in Germ-Line Configuration, and Generate Lymphocytes-B Invivo.* Cell, 1985. 41(3): p. 727-734.
- 96. Palacios, R., G. Henson, M. Steinmetz, and J.P. McKearn, *Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro*. Nature, 1984. 309(5964): p. 126-131.
- 97. de Felipe, P., G.A. Luke, L.E. Hughes, D. Gani, C. Halpin, and M.D. Ryan, *E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein.* Trends in Biotechnology, 2006. 24(2): p. 68-75.
- 98. Chng, J., T. Wang, R. Nian, A. Lau, K.M. Hoi, S.C. Ho, P. Gagnon, X. Bi, and Y. Yang, *Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells*. Monoclonal Antibodies, 2015. 7(2): p. 403-412.
- 99. Fang, J., J.J. Qian, S. Yi, T.C. Harding, G.H. Tu, M. VanRoey, and K. Jooss, *Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide*. Nature Biotechnology, 2005. 23(5): p. 584-590.
- 100. Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, J.P. Brakenhoff, K.J. Kallen, A. Wollmer, J. Grotzinger, and S. Rose-John, *I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion*. Nature Biotechnology, 1997. 15(2): p. 142-145.
- 101. Rose-John, S. and P.C. Heinrich, *Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function*. Biochemical Journal, 1994. 300 (Pt 2)(2): p. 281-290.
- 102. Jaster, R., E. Tschirch, T. Bittorf, and J. Brock, *Interferon-alpha inhibits proliferation of Ba/F3 cells by interfering with interleukin-3 action.* Cellular Signalling, 1999. 11(10): p. 769-775.

- 103. Walter, M.R., W.T. Windsor, T.L. Nagabhushan, D.J. Lundell, C.A. Lunn, P.J. Zauodny, and S.K. Narula, *Crystal structure of a complex between interferon-γ and its soluble high-affinity receptor*. Nature, 1995. 376(6537): p. 230-235.
- Cull, V.S., P.A. Tilbrook, E.J. Bartlett, N.L. Brekalo, and C.M. James, *Type 1 interferon differential therapy for erythroleukemia: specificity of STAT activation*. Blood, 2003. 101(7): p. 2727-2735.
- 105. Pestka, S., *The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn.* Journal of Biological Chemistry, 2007. 282(28): p. 20047-20051.
- 106. Haria, M. and P. Benfield, *Interferon-alpha-2a*. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in the management of viral hepatitis. Drugs, 1995. 50(5): p. 873-896.
- 107. Matos, A.D.R., K. Wunderlich, S. Schloer, K. Schughart, R. Geffers, M. Seders, M. Witt, A. Christersson, R. Wiewrodt, K. Wiebe, P. Barth, A. Hocke, S. Hippenstiel, K. Honzke, U. Dittmer, K. Sutter, U. Rescher, S. Rodionycheva, N. Matera, S. Ludwig, and L. Brunotte, *Antiviral potential of human IFN-alpha subtypes against influenza A H3N2 infection in human lung explants reveals subtype-specific activities.* Emerging Microbes & Infections, 2019. 8(1): p. 1763-1776.
- 108. Gerlach, N., K. Gibbert, C. Alter, S. Nair, G. Zelinskyy, C.M. James, and U. Dittmer, *Anti*retroviral effects of type I IFN subtypes in vivo. European Journal of Immunology, 2009. 39(1): p. 136-146.
- Dickow, J., S. Francois, R.L. Kaiserling, A. Malyshkina, I. Drexler, A.M. Westendorf, K.S. Lang, M.L. Santiago, U. Dittmer, and K. Sutter, *Diverse Immunomodulatory Effects of Individual IFNalpha Subtypes on Virus-Specific CD8(+) T Cell Responses.* Frontiers in Immunology, 2019. 10: p. 2255.
- 110. Urin, V., M. Shemesh, and G. Schreiber, *CRISPR/Cas9-based Knockout Strategy Elucidates Components Essential for Type 1 Interferon Signaling in Human HeLa Cells.* Journal of Molecular Biology, 2019. 431(17): p. 3324-3338.
- 111. Krishnan, K., H. Yan, J.T. Lim, and J.J. Krolewski, *Dimerization of a chimeric CD4-interferonalpha receptor reconstitutes the signaling events preceding STAT phosphorylation.* Oncogene, 1996. 13(1): p. 125-133.
- 112. Pattyn, E., X. Van Ostade, L. Schauvliege, A. Verhee, M. Kalai, J. Vandekerckhove, and J. Tavernier, *Dimerization of the interferon type I receptor IFNaR2-2 is sufficient for induction of interferon effector genes but not for full antiviral activity.* Journal of Biological Chemistry, 1999. 274(49): p. 34838-34845.
- Katlinski, K.V., J. Gui, Y.V. Katlinskaya, A. Ortiz, R. Chakraborty, S. Bhattacharya, C.J. Carbone, D.P. Beiting, M.A. Girondo, A.R. Peck, E. Pure, P. Chatterji, A.K. Rustgi, J.A. Diehl, C. Koumenis, H. Rui, and S.Y. Fuchs, *Inactivation of Interferon Receptor Promotes the Establishment of Immune Privileged Tumor Microenvironment*. Cancer Cell, 2017. 31(2): p. 194-207.
- 114. Puigdevall, L., C. Michiels, C. Stewardson, and L. Dumoutier, *JAK/STAT: Why choose a classical or an alternative pathway when you can have both?* Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2022. 26(7): p. 1865-1875.
- 115. Yphantis, D.A. and T. Arakawa, *Sedimentation equilibrium measurements of recombinant DNA derived human interferon gamma*. Biochemistry, 1987. 26(17): p. 5422-5427.
- 116. Krause, C.D., E. Mei, J. Xie, Y. Jia, M.A. Bopp, R.M. Hochstrasser, and S. Pestka, *Seeing the light: preassembly and ligand-induced changes of the interferon gamma receptor complex in cells.* Molecular & Cellular Proteomics, 2002. 1(10): p. 805-815.
- 117. Blouin, C.M., Y. Hamon, P. Gonnord, C. Boularan, J. Kagan, C. Viaris de Lesegno, R. Ruez, S. Mailfert, N. Bertaux, D. Loew, C. Wunder, L. Johannes, G. Vogt, F.X. Contreras, D. Marguet, J.L. Casanova, C. Gales, H.T. He, and C. Lamaze, *Glycosylation-Dependent IFN-gammaR*

Partitioning in Lipid and Actin Nanodomains Is Critical for JAK Activation. Cell, 2016. 166(4): p. 920-934.

- 118. Gerhartz, C., B. Heesel, J. Sasse, U. Hemmann, C. Landgraf, J. Schneider-Mergener, F. Horn, P.C. Heinrich, and L. Graeve, *Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation.* Journal of Biological Chemistry, 1996. 271(22): p. 12991-12998.
- 119. Bohlius, J., J. Wilson, J. Seidenfeld, M. Piper, G. Schwarzer, J. Sandercock, S. Trelle, O. Weingart, S. Bayliss, B. Djulbegovic, C.L. Bennett, S. Langensiepen, C. Hyde, and A. Engert, *Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients.* Journal of the National Cancer Institute, 2006. 98(10): p. 708-714.
- 120. Lu, S., B. Pardini, B. Cheng, A. Naccarati, S. Huhn, V. Vymetalkova, L. Vodickova, T. Buchler, K. Hemminki, P. Vodicka, and A. Forsti, *Single nucleotide polymorphisms within interferon signaling pathway genes are associated with colorectal cancer susceptibility and survival.* PloS One, 2014. 9(10): p. e111061.
- 121. Shemiakina, II, G.V. Ermakova, P.J. Cranfill, M.A. Baird, R.A. Evans, E.A. Souslova, D.B. Staroverov, A.Y. Gorokhovatsky, E.V. Putintseva, T.V. Gorodnicheva, T.V. Chepurnykh, L. Strukova, S. Lukyanov, A.G. Zaraisky, M.W. Davidson, D.M. Chudakov, and D. Shcherbo, A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity. Nature Communications, 2012. 3(1): p. 1204.
- 122. Koelsch, K.A., Y. Wang, J.S. Maier-Moore, A.H. Sawalha, and J.D. Wren, *GFP affects human T cell activation and cytokine production following in vitro stimulation*. PloS One, 2013. 8(4): p. e50068.
- 123. Zhou, L., Y. Zhang, Y. Wang, M. Zhang, W. Sun, T. Dai, A. Wang, X. Wu, S. Zhang, S. Wang, and F. Zhou, *A Dual Role of Type I Interferons in Antitumor Immunity*. Advanced Biosystems, 2020. 4(11): p. e1900237.
- 124. Sterner, R.C. and R.M. Sterner, *CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies.* Blood Cancer Journal, 2021. 11(4): p. 69.
- 125. Gomes-Silva, D. and C.A. Ramos, *Cancer Immunotherapy Using CAR-T Cells: From the Research Bench to the Assembly Line.* Biotechnology Journal, 2018. 13(2): p. 1700097.
- 126. Ruella, M., J. Xu, D.M. Barrett, J.A. Fraietta, T.J. Reich, D.E. Ambrose, M. Klichinsky, O. Shestova, P.R. Patel, I. Kulikovskaya, F. Nazimuddin, V.G. Bhoj, E.J. Orlando, T.J. Fry, H. Bitter, S.L. Maude, B.L. Levine, C.L. Nobles, F.D. Bushman, R.M. Young, J. Scholler, S.I. Gill, C.H. June, S.A. Grupp, S.F. Lacey, and J.J. Melenhorst, *Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell*. Nature Medicine, 2018. 24(10): p. 1499-1503.
- 127. Kochenderfer, J.N., M.E. Dudley, S.H. Kassim, R.P. Somerville, R.O. Carpenter, M. Stetler-Stevenson, J.C. Yang, G.Q. Phan, M.S. Hughes, R.M. Sherry, M. Raffeld, S. Feldman, L. Lu, Y.F. Li, L.T. Ngo, A. Goy, T. Feldman, D.E. Spaner, M.L. Wang, C.C. Chen, S.M. Kranick, A. Nath, D.A. Nathan, K.E. Morton, M.A. Toomey, and S.A. Rosenberg, *Chemotherapyrefractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor.* Journal of Clinical Oncology, 2015. 33(6): p. 540-549.
- 128. Fedorov, V.D., M. Themeli, and M. Sadelain, *PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses.* Science Translational Medicine, 2013. 5(215): p. 215ra172.
- 129. Kloss, C.C., M. Condomines, M. Cartellieri, M. Bachmann, and M. Sadelain, *Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells.* Nature Biotechnology, 2013. 31(1): p. 71-75.

8 Anhang

Aminosäurensequenz muriner IFNAR1

UniProtKB - P33896 (INAR1_MOUSE)

Signalpeptid	1-26
Extrazelluläre Domäne	27-429
<u>Transmembrandomäne</u>	430-449
Intrazelluläre Domäne	450-590
Bestandteil des synthetischen Rezeptors	415-590

10	20	30	40	50
MLAVVGAAAL	VLVAGAPWVL	PSAAGG ENLK	PPENIDVYII	DDNYTLKWSS
60	70	80	90	100
HGESMGSVTF	SAEYRTKDEA	KWLKVPECQH	TTTTKCEFSL	LDTNVYIKTQ
110	120	130	140	150
FRVRAEEGNS	TSSWNEVDPF	IPFYTAHMSP	PEVRLEAEDK	AILVHISPPG
160	170	180	190	200
QDGNMWALEK	PSFSYTIRIW	QKSSSDKKTI	NSTYYVEKIP	ELLPETTYCL
210	220	230	240	250
EVKAIHPSLK	KHSNYSTVQC	ISTTVANKMP	VPGNLQVDAQ	GKSYVLKWDY
260	270	280	290	300
IASADVLFRA	QWLPGYSKSS	SGSRSDKWKP	IPTCANVQTT	HCVFSQDTVY
310	320	330	340	350
TGTFFLHVQA	SEGNHTSFWS	EEKFIDSQKH	ILPPPPVITV	TAMSDTLLVY
360	370	380	390	400
VNCQDSTCDG	LNYEIIFWEN	TSNTKISMEK	DGPEFTLKNL	QPLTVYCVQA
410	420	430	440	450
RVLFRALLNK	TSNF <mark>SEKLCE</mark>	KTRPGSFST1	WIITGLGVVF	FSVMVLYALR
460	470	480	490	500
SVWKYLCHVC	FPPLKPPRSI	DEFFSEPPSK	NLVLLTAEEH	TERCFIIENT
510	520	530	540	550
DTVAVEVKHA	PEEDLRKYSS	QTSQDSGNYS	NEEEESVGTE	SGQAVLSKAP
560	570	580	590	
CGGPCSVPSP	PGTLEDGTCF	LGNEKYLQSP	ALRTEPALLC	

Aminosäurensequenz humaner IFNAR1

UniProtKB - P17181 (INAR1_HUMAN)

Signalpeptid	1-27
Extrazelluläre Domäne	28-436
<u>Transmembrandomäne</u>	437-457
Intrazelluläre Domäne	458-557
Bestandteil des synthetischen Rezeptors	422-557

10	20	30	40	50
MMVVLLGATT	LVLVAVAPWV	LSAAAGG KNL	KSPQKVEVDI	IDDNFILRWN
60	70	80	90	100
RSDESVGNVT	FSFDYQKTGM	DNWIKLSGCQ	NITSTKCNFS	SLKLNVYEEI
110	120	130	140	150
KLRIRAEKEN	TSSWYEVDSF	TPFRKAQIGP	PEVHLEAEDK	AIVIHISPGT
160	170	180	190	200
KDSVMWALDG	LSFTYSLVIW	KNSSGVEERI	ENIYSRHKIY	KLSPETTYCL
210	220	230	240	250
KVKAALLTSW	KIGVYSPVHC	IKTTVENELP	PPENIEVSVQ	NQNYVLKWDY
260	270	280	290	300
TYANMTFQVQ	WLHAFLKRNP	GNHLYKWKQI	PDCENVKTTQ	CVFPQNVFQK
310	320	330	340	350
GIYLLRVQAS	DGNNTSFWSE	EIKFDTEIQA	FLLPPVFNIR	SLSDSFHIYI
360	370	380	390	400
GAPKQSGNTP	VIQDYPLIYE	IIFWENTSNA	ERKIIEKKTD	VTVPNLKPLT
410	420	430	440	450
VYCVKARAHT	MDEKLNKSSV	F <mark>SDAVCEKTK</mark>	PGNTSK IWLI	VGICIALFAL
460	470	480	490	500
<u>PFVIYAAKVF</u>	LRCINYVFFP	SLKPSSSIDE	YFSEQPLKNL	LLSTSEEQIE
510	520	530	540	550
KCFIIENIST	IATVEETNQT	DEDHKKYSSQ	TSQDSGNYSN	EDESESKTSE

<mark>ELQQDFV</mark>

Aminosäurensequenz muriner IFNAR2

UniProtKB - O35664 (INAR2_MOUSE)

Signalpeptid	1-21
Extrazelluläre Domäne	22-242
<u>Transmembrandomäne</u>	243-263
Intrazelluläre Domäne	264-513
Bestandteil des synthetischen Rezeptors	227-513

10	20	30	40	50
MRSRCTVSAV	GLLSLCLVVS	ASLETITPSA	FDGYPDEPCT	INITIRNSRL
60	70	80	90	100
ILSWELENKS	GPPANYTLWY	TVMSKDENLT	KVKNCSDTTK	SSCDVTDKWL
110	120	130	140	150
EGMESYVVAI	VIVHRGDLTV	CRCSDYIVPA	NAPLEPPEFE	IVGFTDHINV
160	170	180	190	200
TMEFPPVTSK	IIQEKMKTTP	FVIKEQIGDS	VRKKHEPKVN	NVTGNFTFVL
210	220	230	240	250
RDLLPKTNYC	VSLYFDDDPA	IKSPLKC <mark>IVL</mark>	QPGQESGLSE	SA IVGITTSC
<mark>260</mark>	270	280	290	300
LVVMVFVSTI	VMLKRIGYIC	LKDNLPNVLN	FRHFLTWIIP	ERSPSEAIDR
310	320	330	340	350
LEIIPTNKKK	RLWNYDYEDG	SDSDEEVPTA	SVTGYTMHGL	TGKPLQQTSD
360	370	380	390	400
TSASPEDPLH	EEDSGAEESD	EAGAGAGAEP	ELPTEAGAGP	SEDPTGPYER
410	420	430	440	450
RKSVLEDSFP	REDNSSMDEP	GDNIIFNVNL	NSVFLRVLHD	EDASETLSLE
460	470	480	490	500
EDTILLDEGP	QRTESDLRIA	GGDRTQPPLP	SLPSQDLWTE	DGSSEKSDTS
510				
DSDADVGDGY	TMR			

Aminosäurensequenz humaner IFNAR2

UniProtKB - P48551 (INAR2_HUMAN)

Signalpeptid 1-26

Extrazelluläre Domäne	27-243
<u>Transmembrandomäne</u>	244-264
Intrazelluläre Domäne	265-515
Bestandteil des synthetischen Rezeptors	228-515

10	20	30	40	50
MLLSQNAFIF	RSLNLVLMVY	ISLVFG ISYD	SPDYTDESCT	FKISLRNFRS
60	70	80	90	100
ILSWELKNHS	IVPTHYTLLY	TIMSKPEDLK	VVKNCANTTR	SFCDLTDEWR
110	120	130	140	150
STHEAYVTVL	EGFSGNTTLF	SCSHNFWLAI	DMSFEPPEFE	IVGFTNHINV
160	170	180	190	200
MVKFPSIVEE	ELQFDLSLVI	EEQSEGIVKK	HKPEIKGNMS	GNFTYIIDKL
210	220	230	240	250
IPNTNYCVSV	YLEHSDEQAV	IKSPLKCT <mark>LL</mark>	PPGQESESAE	SAK IGGIITV
260	270	280	290	300
FLIALVLTST	<u>IVTL</u> KWIGYI	CLRNSLPKVL	NFHNFLAWPF	PNLPPLEAMD
310	320	330	340	350
MVEVIYINRK	KKVWDYNYDD	ESDSDTEAAP	RTSGGGYTMH	GLTVRPLGQA
360	370	380	390	400
SATSTESQLI	DPESEEEPDL	PEVDVELPTM	PKDSPQQLEL	LSGPCERRKS
410	420	430	440	450
PLQDPFPEED	YSSTEGSGGR	ITFNVDLNSV	FLRVLDDEDS	DDLEAPLMLS
460	470	480	490	500
SHLEEMVDPE	DPDNVQSNHL	LASGEGTQPT	FPSPSSEGLW	SEDAPSDQSD
510				

TSESDVDLGD GYIMR

Sequenzvergleich von hIFNAR1 und mIFNAR1

CLUSTAL O(1.2.4) multiple	sequence alignment	
sp P33896 INAR1_MOUSE	-MLAVVGAAALVLVAGAPWVLPSAAGGENLKPPENIDVYIIDDNYTLKWSSHGESMGSVT	59
sp P17181 INAR1_HUMAN	MMVVLLGATTLVLVAVAPWVLSAAAGGKNLKSPQKVEVDIIDDNFILRWNRSDESVGNVT	60
	*:.::**::**** ***** :**** *::::* ****: *:*: *:*.	
sp P33896 INAR1_MOUSE	${\tt FSAEYRTKDEAKWLKVPECQHTTTTKCEFSLLDTNVYIKTQFRVRAEEGNSTSSWNEVDP}$	119
sp P17181 INAR1_HUMAN	FSFDYQKTGMDNWIKLSGCQNITSTKCNFSSLKLNVYEEIKLRIRAEKE-NTSSWYEVDS	119
	** :*: :*:*: **: *:*** *. *** : ::*:****: .****	
sp P33896 INAR1_MOUSE	FIPFYTAHMSPPEVRLEAEDKAILVHISPPGQDGNMWALEKPSFSYTIRIWQKSSSDKKT	179
sp P17181 INAR1_HUMAN	${\tt FTPFRKAQIGPPEVHLEAEDKAIVIHISPGTKDSVMWALDGLSFTYSLVIWKNSSGVEER}$	179
	* ** .*:****:************************	
sp P33896 INAR1_MOUSE	INSTYYVEKIPELLPETTYCLEVKAIHPSLKKHSNYSTVQCISTTVANKMPVPGNLQVDA	239
sp P17181 INAR1_HUMAN	IENIYSRHKIYKLSPETTYCLKVKAALLTSWKIGVYSPVHCIKTTVENELPPPENIEVSV	239
	*:. * .** :* ******:*** : * . ** *:**.*** *::* * *::*	
sp P33896 INAR1_MOUSE	QGKSYVLKWDYIASADVLFRAQWLPGYSKSSSGSRSDKWKPIPTCANVQTTHCVFSQDTV	299
sp P17181 INAR1_HUMAN	QNQNYVLKWDYTY-ANMTFQVQWLHAFLKRNPGNHLYKWKQIPDCENVKTTQCVFPQNVF	298
	*.:.****** *:: *:.*** .: * . *.: *** ** **:********	
sp P33896 INAR1_MOUSE	YTGTFFLHVQASEGNHTSFWSEEKFIDSQKHILPPPPVITVTAMSDTLLVYVNCQDSTC-	358
sp P17181 INAR1_HUMAN	QKGIYLLRVQASDGNNTSFWSEEIKFDTEIQAFLLPPVFNIRSLSDSFHIYIGAPKQSGN	358
	.* ::*:****:**:******* :*:: : ***:.: ::**:: :*::	
sp P33896 INAR1_MOUSE	DGLNYEIIFWENTSNTKISMEKDGPEFTLKNLQPLTVYCVQARVL-FRALLNKT	411
sp P17181 INAR1_HUMAN	TPVIQDYPLIYEIIFWENTSNAERKIIEKKTDVTVPNLKPLTVYCVKARAHTMDEKLNKS	418
	* *************************************	
sp P33896 INAR1_MOUSE	SNFSEKLCEKTRPGSFSTIWIITGLGVVFFSV-MVLYALRSVWKYLCHVCFPPLKPPRSI	470
sp P17181 INAR1_HUMAN	SVFSDAVCEKTKPGNTSKIWLIVGICIALFALPFVIYAAKVFLRCINYVFFPSLKPSSSI	478
	* **: :****:**. *.**:*: :.:*:: :*:** : . : : :* ** *** *	
sp P33896 INAR1_MOUSE	DEFFSEPPSKNLVLLTAEEHTERCFIIENTDTVAV-EVKHAPEEDLRKYSSQTSQDSGNY	529
sp P17181 INAR1_HUMAN	DEYFSEQPLKNLLLSTSEEQIEKCFIIENISTIATVEETNQTDEDHKKYSSQTSQDSGNY	538
	:* * ***:* *:**: *:***** .*:* .* .* :*** :********	
sp P33896 INAR1_MOUSE	SNEEEESVGTESGQAVLSKAPCGGPCSVPSPPGTLEDGTCFLGNEKYLQSPALRTEPA	587
sp P17181 INAR1_HUMAN	SNEDESESKTSEELQQDFV	557
	***:* * * .:	
sp P33896 INAR1_MOUSE	LLC 590	
sp P17181 INAR1_HUMAN	557	

Sequenzvergleich von hIFNAR2 und mIFNAR2

CLUSTAL O(1.2.4) multiple	sequence alignment	
sp 035664 INAR2_MOUSE	MRSRCTVSAVGLLSLCLVVSAS LETITPSAFDGYPDEPCTINITIRNSRLILSWELENKS	60
sp P48551 INAR2_HUMAN	MLLSQNAFIFRSLNLVLMVYISLVFGISYDSPDYTDESCTFKISLRNFRSILSWELKNHS	60
	* * .* * * * * * .* * * * * * * *	
sp 035664 INAR2_MOUSE	${\tt GPPANYTLWYTVMSKDENLTKVKNCSDTTKSSCDVTDKWLEGMESYVVAIVIVHRGDLTV}$	120
sp P48551 INAR2_HUMAN	IVPTHYTLLYTIMSKPEDLKVVKNCANTTRSFCDLTDEWRSTHEAYVTVLEGF-SGNTTL	119
	*::*** **:*** *:*. ****:***************	
sp 035664 INAR2_MOUSE	CRCS-DYIVPANAPLEPPEFEIVGFTDHINVTMEFPPVTSKIIQEKMKTTPFVIKEQIGD	179
sp P48551 INAR2_HUMAN	FSCSHNFWLAIDMSFEPPEFEIVGFTNHINVMVKFPSIVEEELQFDLSLVIEEQSEG	176
	** •• • • • • *************************	
sp 035664 INAR2_MOUSE	SVRKKHEPKVNNVTGNFTFVLRDLLPKTNYCVSLYFDDDPAIKSPLKCIVLQPGQES	236
sp P48551 INAR2_HUMAN	IVKKHKPEIKGNMSGNFTYIIDKLIPNTNYCVSVYLEHSDEQAVIKSPLKCTLLPPGQES	236
	::: .*::****:: .*:******:*:: : .******* :* *****	
sp 035664 INAR2_MOUSE	GLSESAIV-GITTSCLVVMVFVSTIVMLKRIGYICLKDNLPNVLNFRHFLTWIIPERSPS	295
sp P48551 INAR2_HUMAN	ESAESAKIGGIITVFLIALVLTSTIVTLKWIGYICLRNSLPKVLNFHNFLAWPFPNLPPL	296
	·*** · ** * *** · **** ** *****	
sp 035664 INAR2_MOUSE	EAIDRLEIIPTNKKKRLWNYDYEDGSDSDEE-VPTASVTGYTMHGLTGKPLQQTSDTSAS	354
sp P48551 INAR2_HUMAN	EAMDMVEVIYINRKKKVWDYNYDDESDSDTEAAPRTSGGGYTMHGLTVRPLGQASATSTE	356
	:* :*:* *::*:*:* **** * .* :* ****** :** *:* **:	
sp 035664 INAR2_MOUSE	PEDPLHEEDSGAEESDEAGAGAGAEPELPTEAGAGPSEDPTGPYERRKSVLEDSFP	410
sp P48551 INAR2_HUMAN	SQLIDPESEEEPDLPEVDVELPTMPKDSPQQLELLSGPCERRKSPLQDPFP	407
	• ** **• • • • *** * • • * • * * * * *	
sp 035664 INAR2_MOUSE	REDNSSMDEPGDNIIFNVNLNSVFLRVLHDEDASETLSLEEDTILLDEGPQRTES	465
sp P48551 INAR2_HUMAN	EEDYSSTEGSGGRITFNVDLNSVFLRVLDDEDSDDLEAPLMLSSHLEEMVDPEDPDNVQS	467
	.** ** : ** ***:*********************	
sp 035664 INAR2_MOUSE	DLRIAGGDRTQPPLPSLPSQDLWTEDGSSEKSDTSDSDADVGDGYIMR 513	
sp P48551 INAR2_HUMAN	NHLLASGEGTQPTFPSPSSEGLWSEDAPSDQSDTSESDVDLGDGYIMR 515	
	: :*.*: *** :** *:.**:**. *::***:**.*:**	

AS-Sequenz von mIFNAR1 mit Mutation V459A

10	20	30	40	50
MLAVVGAAAL	VLVAGAPWVL	PSAAGG ENLK	PPENIDVYII	DDNYTLKWSS
60	70	80	90	100
HGESMGSVTF	SAEYRTKDEA	KWLKVPECQH	TTTTKCEFSL	LDTNVYIKTQ
110	120	130	140	150
FRVRAEEGNS	TSSWNEVDPF	IPFYTAHMSP	PEVRLEAEDK	AILVHISPPG
160	170	180	190	200
QDGNMWALEK	PSFSYTIRIW	QKSSSDKKTI	NSTYYVEKIP	ELLPETTYCL
210	220	230	240	250
EVKAIHPSLK	KHSNYSTVQC	ISTTVANKMP	VPGNLQVDAQ	GKSYVLKWDY
260	270	280	290	300
IASADVLFRA	QWLPGYSKSS	SGSRSDKWKP	IPTCANVQTT	HCVFSQDTVY
310	320	330	340	350
TGTFFLHVQA	SEGNHTSFWS	EEKFIDSQKH	ILPPPPVITV	TAMSDTLLVY
360	370	380	390	400
VNCQDSTCDG	LNYEIIFWEN	TSNTKISMEK	DGPEFTLKNL	QPLTVYCVQA
410	420	430	440	450
RVLFRALLNK	TSNFSEKLCE	KTRPGSFST I	WIITGLGVVF	FSVMVLYALR
460	470	480	490	500
SVWKYLCH A C	FPPLKPPRSI	DEFFSEPPSK	NLVLLTAEEH	TERCFIIENT
510	520	530	540	550
DTVAVEVKHA	PEEDLRKYSS	QTSQDSGNYS	NEEEESVGTE	SGQAVLSKAP
560	570	580	590	
CGGPCSVPSP	PGTLEDGTCF	LGNEKYLQSP	ALRTEPALLC	
Vektorkarten:

Nachfolgend sind die Vektorkarten aller in dieser Arbeit klonierten pcDNA3.1-Vektoren aufgeführt.





Danksagung

Meinen Dank möchte ich in erster Linie an meinen Doktorvater, Professor Dr. Jürgen Scheller, richten, dessen Hingabe für die Wissenschaft mein Interesse an dieser entfacht hat und der mir durch die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit die Möglichkeit gegeben hat, einen eigenen Beitrag hierzu leisten zu können.

Ein besonderer Dank geht außerdem an PD Dr. Doreen Manuela Floß. Durch ihre geduldige Unterstützung, ihre Fachexpertise und ihre unerschütterliche Begeisterung hat sie maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ihre ständige Erreichbarkeit sowie die zahlreichen persönlichen Gespräche waren mir stets eine sehr große und wertvolle Hilfe.

Weiterhin möchte ich mich bei allen gegenwärtigen und ehemaligen MitarbeiterInnen der AG Scheller für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken, durch die mir die Zeit im Labor immer in schöner Erinnerung bleiben wird.

Ein großer Dank gilt auch meinen Freunden, deren ehrliche Meinung und wertvolle Tipps mir bei der Korrektur und Fertigstellung meiner Arbeit sehr geholfen haben.

Mein größtes Dankeschön gebührt abschließend meiner Familie: Meinen Eltern, Großeltern und meiner Schwester, die mir stets mit offenem Ohr beratend und helfend zur Seite standen, sowie meinem Partner Johannes Deilmann, der mir stets den Rücken freigehalten hat und ohne dessen Begleitung und Unterstützung auf diesem Weg ich nicht dort wäre, wo ich jetzt bin.

- Danke -