

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

**Analyse der intrazellulären Signaltransduktion des Interferon- $\alpha$   
Rezeptorkomplexes unter Verwendung von synthetischen  
Zytokinrezeptoren**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Nele Zöllner  
2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: PD Dr. rer. nat. Doreen M. Floß

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Daniel Nettersheim

Drittgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Fred Schaper



Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Zoellner N, Coesfeld N, De Vos FH, Denter J, Xu HC, Zimmer E, Knebel B, Al-Hasani H, Mossner S, Lang PA, Floss DM, Scheller J, (2022), Synthetic mimetics assigned a major role to IFNAR2 in type I interferon signaling. *Frontiers in Microbiology 2022, Volume 13*, 1-17.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.947169>

## Zusammenfassung

Typ I Interferone (IFN) sind potente Inhibitoren viraler Replikation. Sie sind sowohl Teil des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems und Fehlregulationen oder Defekte sind mit einer weiten Bandbreite von Krankheitsbildern verbunden, die von übermäßiger viraler Replikation bis hin zu Autoimmunreaktionen reichen. Interferone sind Proteine, die bei viraler Infektion ausgeschüttet werden, an spezifische Oberflächenrezeptoren (Interferonrezeptoren) binden und daraufhin eine Signalkaskade anstoßen, die zur Aktivierung verschiedenster Gene (*interferon stimulated genes*; ISGs) führt. Diese greifen einerseits in den viralen Lebenszyklus ein und sind andererseits daran beteiligt, das erworbene Immunsystem zu aktivieren.

In dieser Arbeit wurde die Signaltransduktion des Typ I Interferon-Rezeptorkomplexes mit Fokus auf die *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 1 und 2 Aktivierung analysiert. Hierfür wurden synthetische Rezeptoren (SyCyRs) erstellt, welche die natürlichen murinen und humanen Typ I Interferon- $\alpha/\beta$  Rezeptoreinheiten IFNAR1 und IFNAR2 phänokopieren. Die Transmembrandomänen (TMD) und die intrazellulären Domänen (ICD) der natürlichen IFNAR1 und IFNAR2 blieben erhalten, wobei die extrazellulären Domänen durch *nanobodies* ausgetauscht wurden, die spezifisch die fluoreszierenden Proteine *green fluorescent protein* (GFP) oder mCherry binden. Hierdurch konnten multimere, *single-binding* GFP-mCherry-Liganden genutzt werden, um Rezeptorkomplexe mit den synthetischen IFNAR1/IFNAR2 zu bilden und STAT1/2 abhängige Signaltransduktion über die Tyrosinkinase Januskinase 1 (JAK1) und Tyrosinkinase 2 (TYK2) zu initiieren. Mit homodimeren GFP- oder mCherry-Liganden wurde gezeigt, dass nur IFNAR2- und nicht IFNAR1-Homodimere in der Lage sind, den STAT1/2 Signalweg zu aktivieren. Analysen des Transkriptoms ergaben, dass zwischen der Signaltransduktion der synthetischen IFN Typ I Stimulation und der Aktivierung von Typ I IFN-Rezeptoren mit IFN $\alpha$ 4 eine große Ähnlichkeit besteht. Zudem konnte die antivirale Aktivität der SyCyRs in einem zellkulturbasierten Infektionsmodell mit MC57 Zellen bestätigt werden. Hierbei wurde durch die SyCyR-IFNAR-Aktivierung die Replikation des *vesicular stomatitis virus* (VSV) deutlich gehemmt. Unter Nutzung von Deletions- und Mutationsvarianten der intrazellulären Domäne des murinen IFNAR2, wurden die Tyrosine Y510 und Y335 als spezielle Phosphorylierungsstellen bei der Aktivierung von STAT1/2 verifiziert. Den anderen Tyrosinen des murinen IFNAR1 oder IFNAR2 konnte hierbei keine Beteiligung zugewiesen werden. Eine vergleichende Analyse mit den synthetischen humanen IFNARs unterstützt dieses Ergebnis. Zusammenfassend konnte mittels der synthetischen Rezeptoren gezeigt werden, dass die Signaltransduktion synthetischer Interferon Typ I Rezeptoren vom IFNAR2 ausgeht und nicht vom IFNAR1.

## Summary

Type I interferons (IFNs) are involved in various mechanisms of the innate and adaptive immune response. They are part of the first line of defense against viral infections. A corrupted regulation or a defect in IFN signaling leads to various diseases, from virus replication to autoimmunity. Interferons are proteins, released upon viral infection, that bind their specific cell surface receptor (interferon receptor) and initiate a signal cascade that leads to the activation of a variety of interferon stimulated genes (ISGs). This way the virus gets attacked on different stages in its lifecycle and at the same time the adaptive immune response is activated.

Here, the signal transduction of the type I interferon receptor complex was analyzed, with focus on the activation of *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 1 and 2. Fully synthetic biological switches of the natural murine and human type I interferon- $\alpha/\beta$  receptors IFNAR1 and IFNAR2 were therefore generated. While the transmembrane (TMD) and intracellular domains (ICD) of natural IFNAR1 and IFNAR2 were conserved, the extracellular domains (ECD) were exchanged by nanobodies directed either against the fluorescent proteins mCherry or green fluorescent protein (GFP). Synthetic receptor complexes (SyCyRs) of IFNAR1/IFNAR2 were induced, using multimeric single-binding GFP-mCherry ligands and initiated STAT1/2 mediated signal transduction via janus kinase 1 (JAK1) and tyrosine kinase 2 (TYK2). Homodimeric GFP or mCherry ligands were used, showing that only IFNAR2 but not IFNAR1 homodimers were able to induce STAT1/2 signaling. Moreover, synthetic murine type I IFN signaling was highly comparable to IFN $\alpha$ 4 signaling, as revealed by transcriptome analysis. In a cell culture-based viral infection model using MC57 cells, replication of vesicular stomatitis virus (VSV) was significantly inhibited after stimulation of the SyCyR-IFNAR with synthetic ligands. Using deletion variants and point mutations of the intracellular domain, the tyrosines Y510 und Y335 in murine IFNAR2 were verified, as unique phosphorylation sites for STAT1/2 activation. An involvement of other tyrosine residues of IFNAR1 or IFNAR2 in STAT phosphorylation was not seen. This was supported by similar findings in comparative analysis of synthetic human IFNARs. In summary, our data implicates that synthetic type I IFN signal transduction is originating from IFNAR2 and not IFNAR1.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ADA</b>	<i>antidrug antibody</i>
<b>ALL</b>	akute lymphatische Leukämie
<b>C</b>	mCherry
<b>CAR</b>	<i>chimeric antigen receptor</i>
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>
<b>CD4+ / CD8+</b>	CD4 positiv / CD8 positiv
<b>cDNA</b>	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
<b>COVID-19</b>	<i>coronavirus disease 2019</i>
<b>DAMP</b>	<i>damage-associated molecular pattern</i>
<b>dsRNA</b>	<i>double-stranded ribonucleic acid</i>
<b>ECD</b>	<i>extracellular domain</i>
<b>EpoR</b>	Erythropoietinrezeptor
<b>et al.</b>	<i>et aliae/ et alii</i>
<b>F</b>	Phenylalanin
<b>Fc</b>	<i>crystallizable fraction of an antibody</i>
<b>GAFF</b>	<i>IFN<math>\gamma</math> activation factor</i>
<b>GAS</b>	<i>gamma-activated sequence</i>
<b>GC</b>	GFP-mCherry Fusionsprotein
<b>GFP, G</b>	<i>green fluorescent protein</i>
<b>GTPase</b>	Guanosintriphosphatase
<b>h</b>	human
<b>H</b>	<i>heavy chain of an antibody</i>
<b>HBV</b>	Hepatitis B Virus
<b>hcAb</b>	<i>heavychain antibody</i>
<b>HCV</b>	Hepatitis C Virus
<b>HEK293</b>	<i>human embryonic kidney cells 293</i>
<b>hIFNAR</b>	humaner Interferon- $\alpha$ Rezeptor
<b>HIV</b>	humanes Immundefizienz-Virus
<b>ICD</b>	<i>intracellular domain</i>
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IFNAR</b>	Interferon- $\alpha$ Rezeptor, Typ I Interferonrezeptor
<b>IFNGR</b>	Interferon- $\gamma$ Rezeptor, Typ II Interferonrezeptor
<b>IFNLR</b>	Interferon- $\lambda$ Rezeptor, Typ III Interferonrezeptor
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IL</b>	Interleukin

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>IL-10R<math>\beta</math>2</b>	Interleukin 10 Rezeptor- $\beta$ -2
<b>IRF</b>	<i>interferon regulatory factor</i>
<b>ISG</b>	<i>interferon stimulated gene</i>
<b>ISG15</b>	<i>IFN-stimuliertes Protein von 15 kDa</i>
<b>ISGF</b>	<i>interferon stimulated gene factor</i>
<b>ISRE</b>	<i>interferon stimulated response element</i>
<b>JAK</b>	Januskinase
<b>JNK</b>	c-Jun-N-terminale Kinasen
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>L</b>	<i>light chain of an antibody</i>
<b>m</b>	murin
<b>MAPK</b>	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
<b>MC57</b>	murine Fibrosarkomzelllinie
<b>mIFNAR</b>	muriner Interferon- $\alpha$ Rezeptor
<b>MMR</b>	Masern, Mumps, Röteln
<b>Mx</b>	<i>myxovirus resistance</i>
<b>OAS</b>	Oligoadenylatsynthase
<b>PAMP</b>	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
<b>PD-L</b>	<i>programmed cell death-ligand</i>
<b>PKR</b>	Proteinkinase R
<b>PRR</b>	<i>pattern recognition receptor</i>
<b>pSTAT</b>	durch Phosphorylierung aktiviertes STAT
<b>RA</b>	Rheumatoide Arthritis
<b>RNaseL</b>	Ribonuklease L
<b>SLE</b>	systemischer Lupus erythematosus
<b>SNV</b>	<i>single nucleotide variant</i>
<b>STAT</b>	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
<b>STF/RTK</b>	<i>stem cell factor/receptor tyrosine kinase</i>
<b>SyCyR</b>	<i>synthetic cytokine receptor</i>
<b>TGF</b>	<i>transforming growth factor</i>
<b>TLR</b>	<i>toll-like receptor</i>
<b>TMD</b>	<i>transmembrane domain</i>
<b>TME</b>	<i>tumor microenvironment</i>
<b>TNF</b>	Tumornekrose Faktor
<b>TYK</b>	Tyrosinkinase
<b>USP18</b>	Ubiquitin-spezifische Peptidase 18
<b>V<sub>ch</sub>IFNAR2</b>	SyCyR des hIFNAR2
<b>V<sub>c</sub>mIFNAR2</b>	SyCyR des mIFNAR2

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>V<sub>G</sub>hIFNAR1</b>	SyCyR des hIFNAR1
<b>V<sub>G</sub>mIFNAR1</b>	SyCyR des mIFNAR1
<b>VH</b>	<i>variable domain of the heavy chain of immunoglobulins</i>
<b>VHH</b>	<i>antigen-binding variable domain of the heavy chain of heavychain antibodies</i>
<b>VL</b>	<i>variable domain of the light chain of immunoglobulins</i>
<b>V-NAR</b>	<i>variable antigen-binding domain of the new antigen receptor antibodies in shark</i>
<b>VSV</b>	<i>vesicular stomatitis virus</i>
<b>Y</b>	Tyrosin

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	I
Summary .....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis .....	VI
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Typ I Interferone .....	1
1.1.1 Die Interferon Familie im Überblick.....	1
1.1.2 Signaltransduktion der Typ I Interferone.....	3
1.1.3 Einblicke in die Funktion einiger wichtiger ISGs .....	5
1.1.4 Struktureller Aufbau der intrazellulären Domäne des IFNAR.....	6
1.1.5 Typ 1 IFN in der Medizin .....	7
1.2 Synthetische Zytokine und Zytokinrezeptoren .....	8
1.3 Ziele der Arbeit .....	13
<b>2 Synthetic mimics assigned a major role to IFNAR2 in type I interferon signaling, Zoellner N, Coesfeld N, De Vos FH, Denter J, Xu HC, Zimmer E, Knebel B, Al-Hasani H, Mossner S, Lang PA, Floss DM, Scheller J, Frontiers in Microbiology, Volume 13: 1-17, (2022) .....</b>	<b>15</b>
<b>3 Diskussion.....</b>	<b>16</b>
3.1 Synthetische Interferon- $\alpha$ Rezeptoren sind funktionell aktiv .....	16
3.2 SyCyRs imitieren die IFN $\alpha$ 4 induzierte Signaltransduktion des IFNAR .....	17
3.3 IFNAR2 ist essenziell für die STAT1/2-Aktivierung der Typ I Interferone .....	18
3.4 Y510 des IFNAR2 scheint bei der STAT1/2-Aktivierung wichtiger zu sein als Y335 .....	21
3.5 Nur der synthetische IFNAR2 kann aktive Homodimere bilden .....	23
3.6 Zukünftige Anwendungsmöglichkeiten des SyCyR-Systems.....	25
3.7 Schlussfolgerung.....	26
<b>4 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>28</b>
<b>5 Anhang.....</b>	<b>35</b>
5.1 Frontiers' policies .....	35
5.2 CC-BY license .....	35
<b>6 Danksagung .....</b>	<b>36</b>

# 1 Einleitung

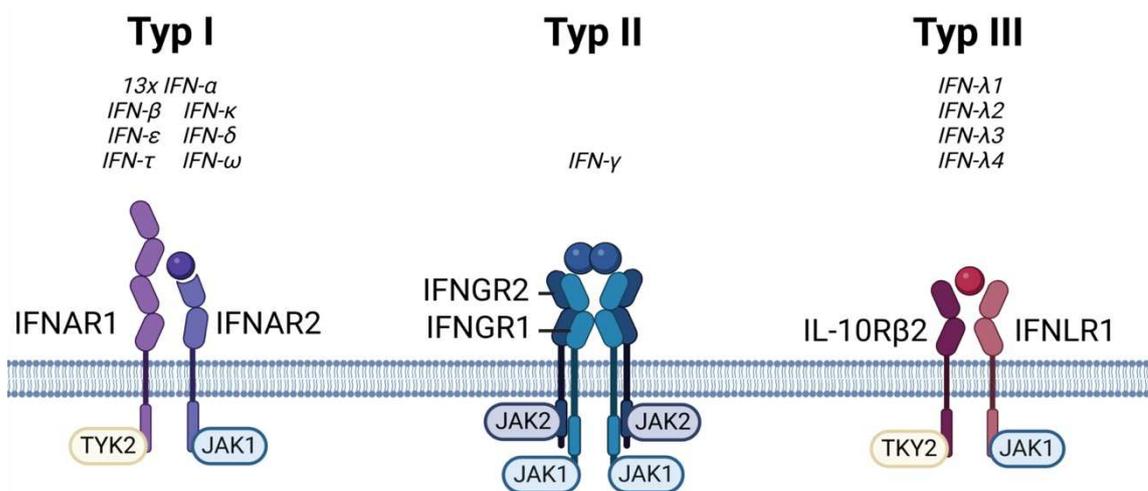
## 1.1 Typ I Interferone

### 1.1.1 Die Interferon Familie im Überblick

Interferone (IFN) kommen in allen Vertebraten vor und übernehmen einen maßgeblichen Teil der viralen Immunabwehr (Schreiber, 2017). Hierbei handelt es sich um Zytokine der Klasse 2, Botenstoffe mit Einfluss auf Proliferation, Differenzierung und Mortalität von Zellen, welche über Oberflächenrezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinase wirken (Schwartz *et al.*, 2016). Ihre Fähigkeit, die virale Replikation zu inhibieren, wurde erstmals vor über 60 Jahren beschrieben (Isaacs & Lindenmann, 1957; Isaacs *et al.*, 1957). Derzeit bilden Interferone, besonders des Typ I, den stärksten bekannten Mechanismus der angeborenen Immunabwehr und ein Fehlen resultiert in starker viraler Replikation mit Folge einer fatalen viralen Infektion (Müller *et al.*, 1994). Eine Aktivierung der Interferonausschüttung kann beispielsweise über die Erkennung von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) oder *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) durch so genannte *pattern recognition receptors* (PRRs) erfolgen. PRRs liegen beispielsweise auf der Zelloberfläche (*toll-like receptor 4*; TLR4), im Zytosol oder wie TLR3 in der Membran von Endosomen vor (Negishi *et al.*, 2018). Sie initiieren Signalkaskaden, die über eine Aktivierung von *interferon regulating factor 3* (IRF3) oder IRF7, die Transkription und Ausschüttung von Interferonen bewirken (Ivashkiv & Donlin, 2014; Kienes *et al.*, 2021; Negishi *et al.*, 2018). Diese Interferone können das Virus in jeder Phase des Lebenszyklus angreifen, indem sie durch schnelle para- und autokrine Zytokinsekretion die Zellen zur Transkription von *interferon stimulated genes* (ISGs) stimulieren, welche in einer Vielzahl von Prozessen, wie Apoptose, Wachstumshemmung und Aktivierung von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, involviert sind (Dickow *et al.*, 2019; Lai *et al.*, 2023). Zudem erfüllen Interferone viele weitere Funktionen, wie beispielsweise Zelldifferenzierung, Tumörprävention und zelltypspezifische Aktivitäten, wie Antikörperklassenwechsel und Angiogenese (Piehler *et al.*, 2012; Wallweber *et al.*, 2014). Hemmende Eigenschaften auf die Proliferation gastrointestinalen Epithels, des blutbildenden Systems und Neoplasien wurden ebenfalls beschrieben (Cull *et al.*, 2003; Sleijfer *et al.*, 2005). Viele der Wirkmechanismen konnten jedoch bis heute noch nicht entschlüsselt werden (Dickow *et al.*, 2019).

Es existieren mindestens 20 verschiedene humane Interferone, die an nur drei unterschiedliche transmembrane Rezeptorkomplexe (Typ I bis Typ III, siehe Abb. 1) binden. Bei Typ I und Typ III Rezeptoren handelt es sich jeweils um Heterodimere, die durch mehrere unterschiedliche Liganden aktiviert werden können. Im Gegensatz dazu

bildet der IFN-Rezeptor Typ II, oder auch IFN $\gamma$ -Rezeptor (IFNGR), ein Tetramer und hat mit IFN $\gamma$  nur einen einzigen Liganden. Er entspricht also dem klassischen ein-Ligand-ein-Rezeptor-Modell (Mesev *et al.*, 2019). Typ I und Typ III Interferone sind nach heutigem Kenntnisstand strukturell und genetisch sehr unterschiedlich, werden jedoch durch ähnliche Mechanismen stimuliert, aktivieren die gleiche Signalkaskade und ein ähnliches Spektrum an ISGs. Der Typ I IFN-Rezeptor (IFNAR) liegt hierbei ubiquitär auf der Oberfläche aller eukaryotischen Zellen vor und induziert bereits bei geringsten Konzentrationen eine Rezeptorantwort. Dagegen wird der Typ III Interferonrezeptor (IFNLR) hauptsächlich auf der Oberfläche epithelialer Zellen und Neutrophiler exprimiert und die Rezeptorantwort ist, nach einem gemäßigten Anstieg, länger andauernd (Lazear *et al.*, 2019).



**Abb. 1: Übersicht der drei verschiedenen Interferonrezeptorkomplexe.** Mehrere verschiedene Interferone (IFNs) binden an nur drei unterschiedliche Rezeptorkomplexe. Der Typ I oder Interferon- $\alpha$  Rezeptor (IFNAR) ist ein Heterodimer, welcher intrazellulär die Januskinase 1 (JAK1) und Tyrosinkinase 2 (TYK2) bindet und durch verschiedene Typ I Interferone aktiviert werden kann. Vom gleichen Aufbau ist der Typ III Rezeptor, oder Interferon- $\lambda$  Rezeptor (IFNLR). Er kann durch verschiedene Liganden (IFN $\lambda$ 1-4) aktiviert werden und bindet ebenfalls die Kinasen TYK2 und JAK1. Der Typ III Rezeptor teilt sich dabei den Interleukin-10-Rezeptor- $\beta$ -2 (IL-10R $\beta$ 2) mit der Interleukin-10 (IL-10) Familie. Der Typ II Interferonrezeptor, oder Interferon- $\gamma$  Rezeptor (IFNGR), ist dagegen ein Tetramer mit IFN $\gamma$  als einzigem Liganden. Intrazellulär bindet der IFNGR die Kinasen JAK1 und JAK2. Abbildung angelehnt an Negishi *et al.* (2018) erstellt mit BioRender.com.

Im Aufbau ist IFNLR eher an die Interleukin-10 (IL-10) Familie angebunden, da er als Rezeptoreinheit, neben dem IFNLR1, den IL-10-Rezeptor- $\beta$ -2 (IL10-R $\beta$ 2) nutzt (Mesev *et al.*, 2019). Ein *crosstalk* zwischen Typ I und III Interferonen konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Shemesh *et al.*, 2021) und der IFNGR unterscheidet sich in Konstitution und Funktion stark von den beiden anderen Interferonrezeptoren (Lazear *et al.*, 2019), weshalb der weitere Fokus dieser Arbeit auf die Typ I Interferone gelegt werden soll.

### 1.1.2 Signaltransduktion der Typ I Interferone

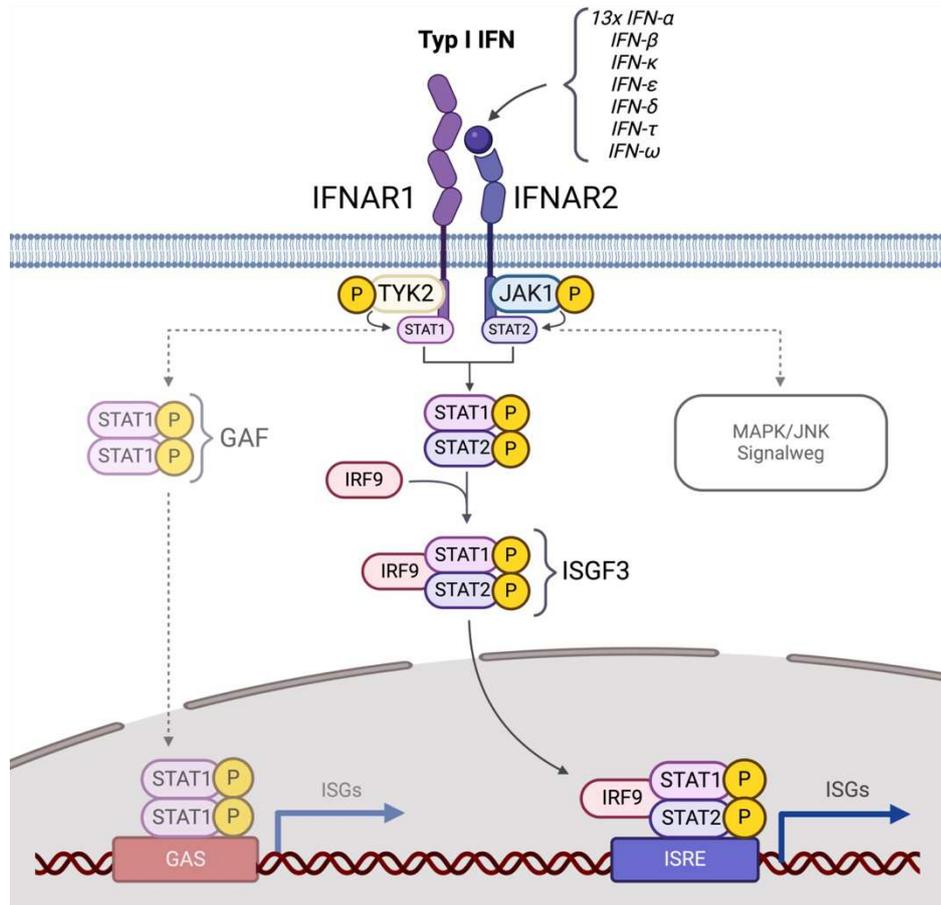
Die Typ I IFN-Familie besteht beim Menschen aus 13 verschiedenen Subtypen an IFN $\alpha$ , sowie einzelnen IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\kappa$  und IFN $\omega$ , sowie IFN $\delta$  und IFN $\tau$ . Bei Mäusen gibt es zusätzlich einen 14. IFN $\alpha$ -Typ und IFN $\zeta$  (Lazear *et al.*, 2019; Mesev *et al.*, 2019). Die verschiedenen Liganden teilen genetische und strukturelle Eigenschaften, binden alle an der gleichen Bindungsstelle der jeweiligen Rezeptoreinheiten und trotzdem variiert die Stärke und die Zusammensetzung der Typ I IFN initiierten Rezeptorantwort (Shemesh *et al.*, 2021). Mögliche Ursachen für diese strukturelle Diversität könnten in unterschiedlichen Bindungsaffinitäten, der IFN-Konzentration, positiver und negativer Regulationen der Signalstärke, Rezeptorlokalisierung oder dem Zusammenspiel mit anderen Signalwegen begründet sein, beziehungsweise teils auch zellspezifische Ursachen haben (Mesev *et al.*, 2019; Wilmes *et al.*, 2015).

Der IFNAR-Heterodimer wird aus den Rezeptoreinheiten Interferon- $\alpha$  Rezeptor (IFNAR) 1 und 2 gebildet (siehe Abb. 2), dabei bindet das Typ I IFN zunächst an den IFNAR2, wodurch die Affinität zum IFNAR1 erhöht wird und unter Dimerisierung der ternäre Komplex gebildet wird (Nguyen *et al.*, 2002). Durch die so erzeugte Nähe zwischen den Intrazellulardomänen von IFNAR1 und IFNAR2 kommt es zur Transphosphorylierung der konstitutiv an den Rezeptoreinheiten gebundenen Januskinasen, JAK1 und Tyrosinkinase 2 (TYK2). Diese phosphorylieren im Anschluss verschiedene Tyrosine der Rezeptoren, so dass *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 1 und 2 gebunden und ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert werden können (Schreiber, 2017; Shemesh *et al.*, 2021). Obwohl alle 7 bisher bekannten humanen STAT-Proteine an diversen Stellen und teils in verschiedenen Zelltypen an der Signaltransduktion von IFN Typ I beteiligt sind, übernehmen STAT1 und 2 den wichtigsten Anteil (Schneider *et al.*, 2014; van Boxel-Dezaire *et al.*, 2006). Neuere Ergebnisse von Shemesh und Kollegen legen nahe, dass die Phosphorylierung der Rezeptoren nicht zur Bindung der STATs benötigt wird und diese demnach ebenfalls konstitutiv am Rezeptor gebunden vorliegen. Die Phosphorylierung würde im Gegenteil die Dissoziation der STATs vom Rezeptor erleichtern, was sich ebenfalls positiv auf das schnelle Erreichen von hohen Konzentrationen phosphorylierter STAT1 und 2 auszuwirken scheint (Shemesh *et al.*, 2021).

Aktivierte STAT1 und 2 Moleküle (pSTAT1 und pSTAT2) bilden Heterodimere und zusammen mit *interferon regulation factor 9* (IRF9) entsteht ein Trimer, welcher als *interferon stimulated gene factor 3* (ISGF3) bezeichnet wird. Dieses Trimer bindet, nach Translokation in den Nukleus, als Transkriptionsfaktor an das *interferon stimulated response element* (ISRE) und initiiert so die Transkription von ISGs (siehe Abb. 2). Zu geringen Teilen werden auch pSTAT1 Homodimere gebildet, welche als *IFN $\gamma$  activation*

*factor* (GAF) bezeichnet werden, da sie hauptsächlich durch die Stimulation des IFNGR mit IFN $\gamma$  gebildet werden.

Auch GAF ist ein Transkriptionsfaktor und bindet im Nucleus an die *gamma-activated sequence* (GAS), wodurch es ebenfalls zur Transkription diverser ISGs kommt (Mesev *et al.*, 2019; Negishi *et al.*, 2018; Piehler *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2014).



**Abb. 2: Schematische Darstellung des JAK/STAT Signalwegs von Typ I IFN.** Der Interferon- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten (IFNAR1 und IFNAR2), die durch Bindung eines Typ I Interferons dimerisieren, wodurch der Rezeptor aktiviert wird. Es kommt zur Transphosphorylierung der Kinasen, Tyrosinkinase 2 (TYK2) am IFNAR1 und Januskinase 1 (JAK1) am IFNAR2, welche wiederum die Rezeptoreinheiten und *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 1 und 2 phosphorylieren. Aus STAT1 und STAT2 wird zusammen mit dem *interferon regulation factor 9* (IRF9) der Transkriptionsfaktor *interferon stimulated gene factor 3* (ISGF3) gebildet, welcher im Nucleus über die Bindung an das *interferon stimulated response element* (ISRE) die Transkription verschiedener *interferon stimulated genes* (ISGs) anstößt. Alternativ können STAT1 Homodimere, auch als *IFN $\gamma$  activation factor* (GAF) bezeichnet, an die *gamma-activated sequence* (GAS) binden und ebenfalls die Expression von ISGs bewirken. Weitere Signalwege wie MAPK/JNK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase/c-Jun-N-terminale Kinase) sind ebenfalls möglich. Abbildung angelehnt an Negishi *et al.* (2018) und Mesev *et al.* (2019), erstellt mit BioRender.com.

Des Weiteren wird bei der Stimulation des IFNAR der MAPK/JNK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase/c-Jun-N-terminale Kinase) Signalweg aktiviert, welcher hier jedoch nur vollständigheitshalber genannt und nicht weiter ausgeführt wird (Cull *et al.*, 2003; Negishi *et al.*, 2018; Piehler *et al.*, 2012).

### 1.1.3 Einblicke in die Funktion einiger wichtiger ISGs

In der Gruppe der ISGs sind über 300 Gene zusammengefasst, die alle durch Interferone stimuliert werden, wobei vielen von ihnen bisher keine direkte Rolle in der aktiven Virusbekämpfung zugeordnet werden konnte. Bei einer Großzahl der ISGs handelt es sich um PRRs und Bestandteile von Signalkaskaden, welche die Wachsamkeit der Zelle gegen eindringende virale Erreger erhöhen, aber nicht selbst antiviral aktiv sind (Sadler & Williams, 2008). Auch wurden ISGs identifiziert, die einzeln jeweils nur eine geringe Wirkkraft besitzen und erst in Kombination mit anderen ISGs ihre antivirale Wirkung entfalten (Schoggins & Rice, 2011). Dies könnte einerseits das Spektrum an Abwehrmechanismen gegen Viren erweitern, die durch natürliche Selektion ihrerseits immer neue Wege entwickeln, dem Immunsystem zu entgehen (Mesev *et al.*, 2019). Andererseits könnte es sein, dass die Immunreaktion so besser zu kontrollieren ist und zytotoxische Reaktionen verhindert werden (Schoggins & Rice, 2011). Da diese Arbeit sich hauptsächlich mit dem IFNAR und dessen Signaltransduktion beschäftigt, welche zur Translation von ISGs führt und nur bedingt mit ISGs selbst, sollen hier nur einige wenige Gene beispielhaft mit ihren Wirkmechanismen erläutert werden.

Zellen begeben sich durch eine IFN-Stimulation in einen antiviralen Zustand, der durch positive Rückkopplungsschleifen unterhalten wird, wobei die gleichzeitige Aktivierung von Inhibitoren ein Entgleisen der Immunantwort verhindert (Ivashkiv & Donlin, 2014; Kotenko & Durbin, 2017; Schoggins & Rice, 2011). Verschiedenste Signalkaskaden und der Zellmetabolismus werden beispielsweise durch ISG15 (IFN-stimuliertes Protein von 15 kDa) oder eine Hochregulation der Proteinkinase R (PKR) beeinflusst (Sadler & Williams, 2008; Schoggins & Rice, 2011). ISG15 wirkt hierbei homolog zu Ubiquitin durch Bindung an Proteine und verhindert unter anderem den durch verschiedene Viren induzierten Abbau von IRF3, sodass die Produktion von Typ I IFN und damit die virale Abwehr erhalten bleiben (Sadler & Williams, 2008). Die PKR greift durch Phosphorylierung in zelluläre Signalkaskaden ein und reguliert die Proteinbiosynthese. In Makrophagen ist die PKR zudem an der TLR4-induzierten Apoptose beteiligt und sie wird in geringen Mengen dauerhaft in Zellen exprimiert. Dies gilt ebenfalls für Oligoadenylatsynthasen (OAS) und die inaktive Form der Ribonuklease L (RNaseL), wobei OAS als eine Art PRR fungieren. OAS liegen in Oligomeren im Zytoplasma vor, detektieren dsRNA (*double-strand ribonucleic acid*) und aktivieren die RNaseL, welche anschließend die Degradation von viraler und zellulärer RNA initiiert (Sadler & Williams, 2008).

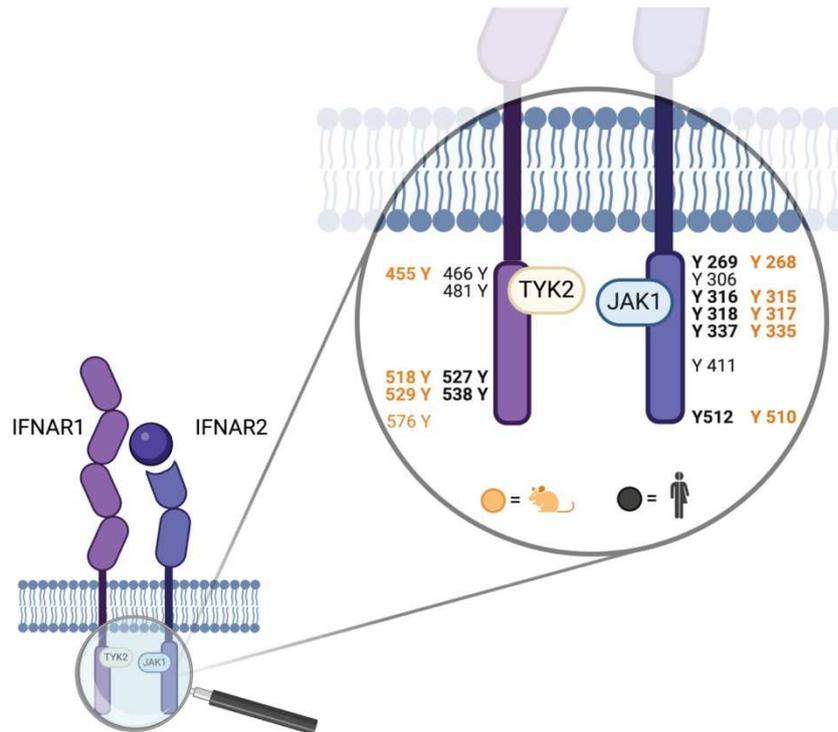
Eine weitere Gruppe an ISGs bilden *myxovirus resistance* (Mx-)Proteine. Hierbei handelt es sich um Guanosintriphosphatasen (GTPasen) im Zytosol und im Nukleus, die den zellulären Transport von Vesikeln überwachen und so die virale Replikation verhindern (Sadler & Williams, 2008). Als Beispiel für ein inhibitorisches ISG zur Kontrolle des

antiviralen Zustands ist Ubiquitin-spezifische Peptidase 18 (USP18) zu nennen, welches kompetitiv die JAK1 vom IFNAR2 verdrängt, und somit die Typ I IFN-Antwort vermindert (Ivashkiv & Donlin, 2014; Kotenko & Durbin, 2017).

#### **1.1.4 Struktureller Aufbau der intrazellulären Domäne des IFNAR**

Die Zytokine lassen sich nach Rezeptormorphologie in sieben Klassen unterteilen, wobei die größte Gruppe durch die Klasse 1 und 2 Zytokine gebildet wird. Sie haben die gleiche Grundstruktur aus heteromeren Rezeptoren, die über assoziierte Januskinasen den JAK/STAT-Signalweg initiieren (Schwartz *et al.*, 2016). Der IFNAR gehört zu den Klasse 2 Zytokinrezeptoren und besteht aus zwei unterschiedlichen Rezeptoreinheiten, IFNAR1 und IFNAR2, die im inaktiven Zustand ubiquitär, ohne präformierte Dimerisierung, auf der Zellmembran von eukaryotischen Zellen lokalisiert sind (Lazear *et al.*, 2019; Schwartz *et al.*, 2016). Die intrazelluläre Domäne (ICD) des humanen IFNAR1 besteht aus 100 Aminosäuren und die des IFNAR2 aus 250. Als Zytokinrezeptoren der Klasse 2 haben beide Rezeptoren keine eigene Kinaseaktivität und sind deshalb auf assoziierte Tyrosinkinase angewiesen (Shemesh *et al.*, 2021). Hierbei bindet IFNAR1 die Tyrosinkinase 2 (TYK2) und IFNAR2 die Januskinase 1 (JAK1) konstitutiv, membran-proximal an der jeweiligen ICD (Nguyen *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2008). In unmittelbarer Nähe liegen das Box 1 und das Box 2 Motiv, welche sich aus Aminosäuresequenzen zusammensetzen, die bereits in anderen Rezeptoren in ähnlicher Form und in vergleichbarem funktionalem Kontext nachgewiesen wurden. Bei Box 1 handelt es sich um ein stark konserviertes Prolin-reiches Motiv, dagegen lässt sich die Box 2 Sequenz nicht so klar definieren und ist eher hydrophob (Usacheva *et al.*, 2002; Wallweber *et al.*, 2014). Das Box 1 Motiv des IFNAR2 scheint, im Vergleich zum Box 2 Motiv, nur gering an der Assoziation von JAK1 beteiligt zu sein, spielt jedoch eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Kinase (Usacheva *et al.*, 2002). In IFNAR1 ist die Rolle des Box 1 Motivs, in Bezug auf TYK2 Bindung und Aktivierung noch unklar, während für Box 2, in Zusammenhang mit weiteren Aminosäuren, eine Beteiligung an der Assoziation der Kinase nachgewiesen werden konnte (Shemesh *et al.*, 2021; Wallweber *et al.*, 2014). Bezüglich der Rekrutierung von STATs wird die Beteiligung von konservierten Tyrosinen (Y) oder nicht-Tyrosinmotiven diskutiert (Zhao *et al.*, 2008), die Studienlage zur Wichtigkeit der verschiedenen Tyrosine ist jedoch nicht eindeutig (Nadeau *et al.*, 1999; Shemesh *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2008). Die intrazelluläre Domäne des humanen IFNAR1 (hIFNAR1) enthält zwei nicht-konservierte (Y466, Y481) und zwei konservierte Tyrosine (Y527 und Y538), die zur Phosphorylierung in Frage kommen. Im hIFNAR2 liegen sieben Tyrosine vor (Y269, Y306, Y316, Y318, Y337, Y411, Y512), von

denen nur Y306 und Y411 nicht-konserviert sind (siehe Abb. 3; Shemesh *et al.*, 2021). Im Sequenzvergleich des humanen und des murinen Typ I Interferonrezeptors ließen sich neben den konservierten Tyrosinmotiven auch einige nicht-Tyrosinmotive identifizieren, die hier nicht weiter erläutert werden. Sie lassen jedoch auf eine evolutionär stark konservierte biologische Reizantwort auf Interferone schließen (Zhao



*et al.*, 2008).

**Abb. 3: Tyrosine der ICD des IFNAR: Übersicht und Vergleich zwischen dem humanen und murinen Rezeptorkomplex.** Gezeigt werden die Tyrosine (Y) der Intrazellulardomäne (ICD) des Interferon- $\alpha$  Rezeptors (IFNAR). Der humane IFNAR1 (hIFNAR1; Beschriftung schwarz) enthält die vier Tyrosine Y466, Y481, Y527 und Y538, wobei die beiden letzteren konserviert (fett) sind. Beim murinen IFNAR1 (mIFNAR1; Beschriftung orange) bildet das Y455 das Äquivalent zu Y466 des humanen Rezeptors, ebenso gibt es mit Y518 und Y529 Äquivalente für die beiden konservierten Tyrosine Y527 und Y538. Im Vergleich zum hIFNAR1 fehlt beim mIFNAR1 ein Tyrosin analog zu Y481, dafür besitzt dieser mit Y576 ein weiteres Tyrosin am distalen Ende der ICD. Die Tyrosine Y269, Y316, Y318, Y337 und Y512 des humanen IFNAR2 entsprechen den Tyrosinen Y268, Y315, Y317, Y335 und Y510 des mIFNAR2 und sind allesamt konserviert. Zusätzlich hierzu besitzt der hIFNAR2 noch zwei nicht-konservierte Tyrosine, Y306 und Y411, für die im mIFNAR2 keine Äquivalente vorliegen. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

### 1.1.5 Typ 1 IFN in der Medizin

Interferone zeigen eine große Variabilität in Struktur, Rezeptorverteilung und gewebespezifischen Eigenschaften. Dies ist sicherlich in den verschiedenen Mechanismen begründet, die viele Viren zur Anpassung an, oder Verhinderung von, IFN vermittelter Signaltransduktion entwickelt haben (Mesev *et al.*, 2019; Shemesh *et al.*, 2021). Fehlfunktionen der Typ I IFN-Familie mit verminderter IFN-Aktivität sind beispielsweise assoziiert mit lebensbedrohlichem *coronavirus disease 2019* (COVID-19)

nach SARS-CoV-2 Infektion (Zhang *et al.*, 2020) oder starker Erkrankung des Patienten nach Impfung mit einem Lebendimpfstoff wie Masern, Mumps, Röteln (MMR) oder Gelbfieber (Duncan *et al.*, 2015; Hernandez *et al.*, 2019). Im Gegensatz hierzu kann eine übermäßige Aktivierung von Interferonen das Krankheitsgeschehen auch negativ beeinflussen, beispielsweise geht die Reduktion der *cluster of differentiation 4* positiven (CD4<sup>+</sup>) T-Zellen bei HIV1 Infektion mit einem Anstieg an Typ I Interferonen einher (Dagenais-Lussier *et al.*, 2017; Hardy *et al.*, 2013). Außerdem besteht eine Assoziation mit der Ausbildung diverser Autoimmunerkrankungen, hier sind unter anderem multiple rheumatoide Erkrankungen wie Rheumatoide Arthritis (RA), systemischer Lupus erythematosus (SLE) und Myositis zu nennen (Schwartz *et al.*, 2016).

Aufgrund ihrer starken antiviralen Aktivität und immunstimulatorischen Eigenschaften, werden Interferone jedoch auch in der Behandlung verschiedenster Krankheitsbilder autoimmunen, viralen oder neoplastischen Ursprungs verwendet (Lai *et al.*, 2023). Bekannt ist beispielsweise die positive Wirkung von Typ I IFN bei Infektion mit dem Hepatitis C Virus (HCV) und eingeschränkt auch bei einer Hepatitis B Virus (HBV) Infektion (Degertekin & Lok, 2009). Gleichwohl ist eine Interferontherapie bisher bei den meisten Patienten mit starken Nebenwirkungen belegt, angefangen bei Beschwerden durch die subkutane Injektion des Proteins, über generalisierte grippe-ähnliche Symptome (Sleijfer *et al.*, 2005) bis hin zu Stimmungsschwankungen und Depressionen (Lai *et al.*, 2023). Manche Effekte sind dosisabhängig, beispielsweise Übelkeit und Fieber, und können durch eine verringerte Dosierung reduziert oder verhindert werden, während andere hiervon unabhängig, oder über einen längeren Therapiezeitraum entstehen. Hier ist das steigende Risiko für Anämie und Thrombozytopenie zu nennen, welches vermutlich dadurch zustande kommen, dass die wachstumshemmenden Effekte der Interferone sich nicht lokal begrenzen lassen, sondern auch die Replikation hämatopoetischer Stammzellen beeinträchtigen (Sleijfer *et al.*, 2005). Bei der Therapie von Leukämie wird sich dies zu Nutzen gemacht, doch gegen solide Tumore sind IFNs in der Anwendung eher eingeschränkt (Cull *et al.*, 2003).

Der Einsatz von Typ I Interferonen bringt zwar eine Menge Vorteile bei der Therapie von Erkrankungen, bisher ist er aber leider noch mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen und Komplikationen belegt, die in manchen Fällen sogar den Therapieabbruch notwendig machen (Lai *et al.*, 2023). Der zielgerichtete Einsatz von IFNs wäre daher therapeutisch wünschenswert.

## 1.2 Synthetische Zytokine und Zytokinrezeptoren

Die Rolle von Zytokinen in der Immunabwehr rückte ihre Funktion, Modulation und eventuelle therapeutische Anwendung immer weiter in den Fokus der Wissenschaft. Bereits 1986 wurde die erste Tumorimmuntherapie mit IFN $\alpha$  in den USA zugelassen,

## EINLEITUNG

doch viele Nebenwirkungen bei systemischer Anwendung und eine geringe therapeutische Breite limitierten die Anwendung (Zheng *et al.*, 2022). Wachsende Erkenntnisse um die Wirkung von Zytokinen und die Entdeckung neuer Methoden zu *protein engineering* und synthetischer Biologie ermöglichen es, dass mittlerweile einige negative Wirkungsweisen durch Modifikationen der Zytokine oder ihrer Signalkaskaden, beispielsweise mit Antikörpern, minimiert werden können (Scheller *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2022). Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um synthetische Zytokine zu modulieren und für die Forschung und den therapeutischen Nutzen zu verbessern. Von diesen Ansätzen ausgehend lassen sich unterschiedliche Gruppen an synthetischen Zytokinen herleiten, die zur Übersicht in Tabelle 1 aufgeführt werden.

**Tabelle 1: Einteilung synthetischer Zytokine nach ihrem strukturellen Ursprung.** Angelehnt an Scheller *et al.* (2019) und Zheng *et al.* (2022).

Gruppe	Beschreibung	Eigenschaften
<b>Superzytokine</b>	natürliche Zytokine werden durch Mutationen und Deletionen für den therapeutischen Nutzen optimiert	bspw. erhöhte Halbwertszeit, verbesserte Gewebspenetration, oder Bindungsaffinität
<b>Dominant-negative Zytokinvarianten</b>	Superzytokine mit nur einer funktionalen Rezeptorbindestelle	verhindern Rezeptordimerisierung und damit die Signaltransduktion (Antagonisten)
<b>Synthekine</b>	Fusion zweier dominant-negativer Zytokinvarianten	Bildung dimerer Rezeptorkomplexe (Agonisten), unphysiologische Rezeptorkombinationen und modifizierte Signalkaskaden möglich
<b>Immunozytokine</b>	Fusion eines Zytokins mit einem Antikörper	je nach Antikörper kann der Wirkort der Zytokine eingegrenzt werden, dadurch verringern sich systemische Nebenwirkungen
<b>Fusokine</b>	Fusion zweier Zytokine, oder Rezeptoragonisten	ermöglicht neue heteromere Rezeptorkonstrukte
<b>Neoleukine</b>	synthetische Stoffe, mit selektiver Zytokinfunktion, ohne Ähnlichkeiten in Aminosäuresequenz und Struktur	höhere Affinitäten und spezifischere Wirkung
<b>auf Nanopartikeln lokalisierte Zytokine</b>		lokale Anwendung durch Spezifizierung des Nanopartikels möglich, bspw. tumorspezifisch

## EINLEITUNG

Die Interaktion der natürlichen und synthetischen Zytokine mit ihren Rezeptoren, bzw. die darauffolgende Signaltransduktion *in vitro* und *in vivo* zu analysieren, ist jedoch nur schwer möglich, da eine unabhängige, spezifische Aktivierung unter Ausschluss von Kreuz- oder Fremdaktivierung, auch über Spezies hinweg (Kotenko *et al.*, 1999), nicht sichergestellt werden kann. Für eine isolierte Darstellung wurde schon früh versucht synthetische Rezeptoren zu erstellen, beispielsweise wurde in einer Arbeit von 1999 der extrazelluläre Rezeptoranteil des IFNAR durch die ECD (*extracellular domain*) des Erythropoietinrezeptors (EpoR) ersetzt (Pattyn *et al.*, 1999). Dieses Fusionsprotein erlaubt in EpoR-negativen Zelllinien eine gezielte Rezeptorstimulation, ist jedoch auf jene Zelllinien begrenzt und nicht *in vivo* einsetzbar.

Neue Optionen entstehen durch die zunehmende Bedeutung monoklonaler Antikörper, die eine noch recht junge eigene Klasse an therapeutischen Biomolekülen bilden. Antikörper können einerseits Zytokine binden und antagonisieren (Wesolowski *et al.*, 2009), andererseits selbst als Zytokine (siehe Neoleukine, Tabelle 1; Scheller *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2022) wirksam werden und durch Rezeptorbindung und Aktivierung die Signaltransduktion anstoßen (Bonfa *et al.*, 2020). Des Weiteren können sie, fusioniert mit intrazellulären Rezeptordomänen, auch als membrangebundene Rezeptoren eingesetzt werden. Solche synthetische Zytokinrezeptoren beginnen als Bausteine für immuntherapeutische Anwendungen Einsatz zu finden (Scheller *et al.*, 2019), wobei die *chimeric antigen receptor* (CAR) T-Zelltherapie als erste Gentherapie für die Behandlung von therapieresistenter, akuter lymphatischer Leukämie (ALL) zugelassen wurde (Si *et al.*, 2018). Hierbei werden T-Zellen des Patienten isoliert und mit CARs modifiziert, die spezifisch CD19 binden, das klassischerweise auf B-Zellen exprimiert ist. Der CAR besteht extrazellulär aus dem Fragment eines Einkettenantikörpers, intrazellulär aus klassischen T-Zell Signalmolekülen und sorgt für eine antigenspezifische T-Zellaktivierung gegen B-Zellen, auch bei bereits erfolgtem *immune escape* der Tumorzellen (Bonfa *et al.*, 2020; Si *et al.*, 2018). Eine Applikation der Therapie auf solide Tumoren war bislang noch nicht erfolgreich, was vermutlich auf die Heterogenität der Tumorzellen und die inhibitorischen Eigenschaften des *tumor microenvironment* (TME) zurückzuführen ist (Bonfa *et al.*, 2020).

2018 wurde ein komplett synthetisches System an Zytokinen und Zytokinrezeptoren publiziert, welches beispielhaft die Signaltransduktion der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin (IL-) 6, IL-23, TNF $\alpha$  und die anti-inflammatorischen Zytokine IL-22 und *death ligand Fas* imitiert (Engelowski *et al.*, 2018; Mossner *et al.*, 2021; Mossner *et al.*, 2020). Systeme mit synthetischen Rezeptoren (Pattyn *et al.*, 1999), oder synthetischen Liganden (Eisenberg *et al.*, 1990) fanden bereits seit Jahren in der Forschung Anwendung, doch in diesem System wurden erstmals sowohl synthetisch hergestellte Zytokine als auch synthetische Rezeptoren verwendet (Engelowski *et al.*,

2018). In den synthetischen Zytokinrezeptoren (SyCyR) wurde die transmembrane (TMD) und intrazelluläre Domäne (ICD) des zu untersuchenden Rezeptors mit spezifischen Einkettenantikörpern (*nanobodies*) fusioniert (siehe Abb. 4D), die mit hoher Spezifität *green fluorescent protein* (GFP) oder mCherry erkennen und binden können (Fridy *et al.*, 2014; Rothbauer *et al.*, 2008). Die *nanobodies* dienen als extrazelluläre Sensoren für homo- und heteromere GFP-mCherry-Fusionsproteine, wobei eine Bindung zwischen *nobody* und Fusionsprotein in Rezeptordimerisierung und Stimulation resultiert (Mossner *et al.*, 2020). Das System ist dabei nicht auf dimere Rezeptorkonstrukte begrenzt, sondern kann auf diverse multimeren Rezeptoren angewendet werden, wie die Applikation auf die trimere TNF-Familie deutlich macht (Minafra *et al.*, 2023; Mossner *et al.*, 2021). Hierdurch können neben der Rezeptorstimulation, auch die stöchiometrische Rezeptorkonfiguration untersucht und unphysiologische Rezeptorkombinationen mit möglicherweise interessantem Signalpotential erstellt und auf Funktionalität analysiert werden (Engelowski *et al.*, 2018).

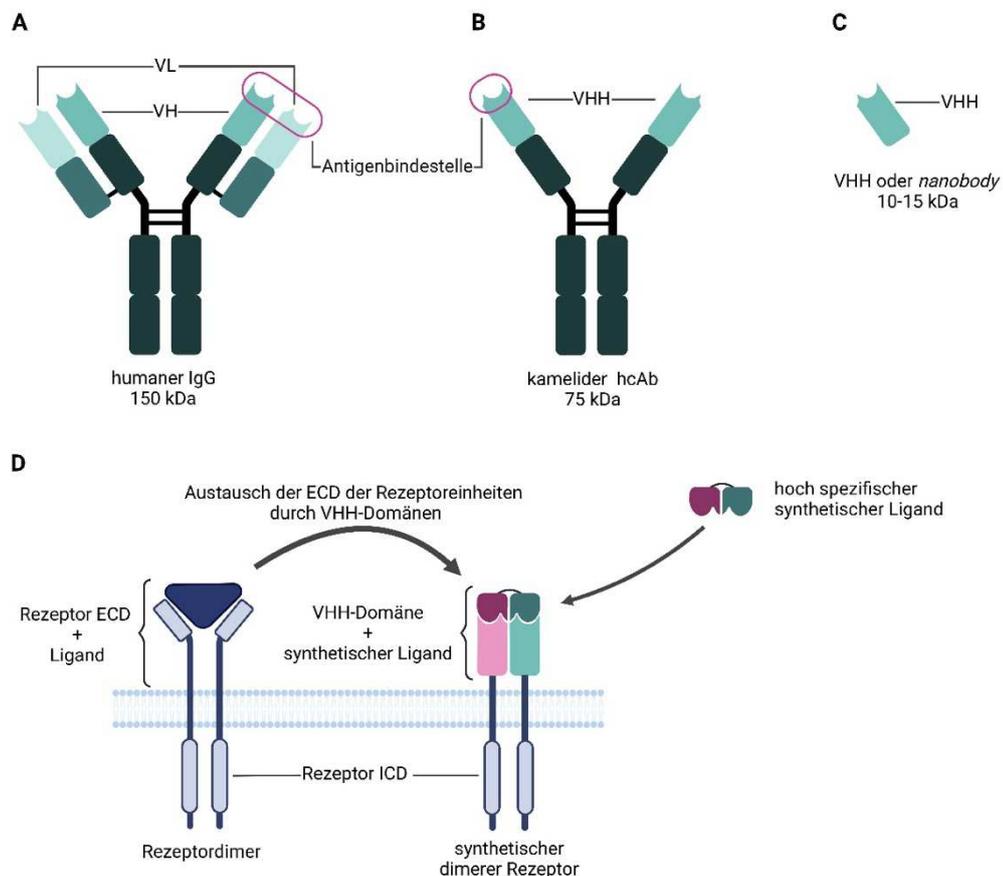
IgG (Immunglobulin G) Antikörper bestehen aus zwei schweren (H) und zwei leichten Ketten (L), die jeweils eine variable Domäne enthalten. Die Kombination aus der variablen Domäne einer schweren Kette (VH) und einer leichten Kette (VL) bildet eine Antigenbindestelle (siehe Abb. 4A). Im Gegensatz hierzu besitzen Haie und Kamelide einen weiteren Antikörpertypen, der nur aus zwei schweren Ketten besteht (*heavy chain antibody*, hcAb; siehe Abb. 4B). Die Antigenbindestelle wird hier von einer einzelnen variablen Domäne gebildet, die auch isoliert stabil und gut löslich ist (Bannas *et al.*, 2017). Sie wird bei Haien als V-NAR (*variable antigen-binding domain of the new antigen receptor antibodies in shark*) und bei Kameliden als VHH bezeichnet (*antigen-binding variable domain of the heavy chain of an heavychain antibody*). VHH und V-NAR werden allgemein unter dem Begriff *nobody* zusammengefasst (siehe Abb. 4B, C; Muyldermans, 2013; Wesolowski *et al.*, 2009). Diese Antikörpervarianten kombinieren mit ihrer hohen Hitzestabilität, Gewebepenetration *in vivo* und den vielen Anwendungsoptionen, durch die mögliche Fusion mit anderen Proteinen und Peptiden, viele Vorteile. Die Spezifität dieser Einkettenantikörper ist dabei sehr hoch. Im Gegensatz zu kleinen chemischen Antagonisten können *nanobodies* auch zwischen nahe verwandten Enzymfamilien diskriminieren (Fridy *et al.*, 2014; Wesolowski *et al.*, 2009).

Die geringe Größe der *nanobodies*, in Abb. 4A, C im Vergleich zu humanem IgG dargestellt, und die damit verbundene hohe Gewebepenetration eröffnen viele neue Optionen im therapeutischen und experimentellen Zusammenhang. So zeigte beispielsweise ein *nobody*-System zur Purifikation von GFP-Fusionsmolekülen, eine stark erhöhte Effizienz bei der Präzipitation im Vergleich zu etablierten monoklonalen IgG Antikörpern (Rothbauer *et al.*, 2008). Außerdem können sie über Konjugation an

## EINLEITUNG

Medikamente, Nanopartikel oder radiologische Signalmoleküle gekoppelt werden (Bannas *et al.*, 2017) und dadurch sogar intrazellulär wirken, oder die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Wesolowski *et al.*, 2009). Sie haben damit, im Gegensatz zu bisher genutzten Antikörpern, ein erweitertes Wirkspektrum, dabei ist eine Produktion in bakteriellen Expressionsmodellen schnell, kosteneffizient und ohne Chargenstreuung möglich (Fridy *et al.*, 2014; Scheller *et al.*, 2019).

Jedoch ist die synthetische Generierung von spezifischen *nanobodies* mit hoher Affinität gegen neue Zielantigene bisher immer noch komplex und zeitaufwendig. Die physiologischen Prozesse zur Selektion von Antikörpern in der B-Zellreifung müssten imitiert werden und oftmals wird deshalb weiterhin mit der Immunisierung von Lamas gearbeitet (Fridy *et al.*, 2014; Wesolowski *et al.*, 2009).



**Abb. 4: Schematische Darstellung verschiedener Antikörper und synthetischer Rezeptoren.** **A)** Humaner Immunglobulin G Antikörper (IgG) bestehend aus zwei schweren Ketten (dunkelgrün; *heavy*, H), zwei leichten Ketten (petrol; *light*, L) mit jeweils einer variablen Domäne: VL der leichten Kette und VH der schweren Kette. Durch die Kombination von VL und VH wird eine Antigenbindestelle gebildet. **B)** kamelider *heavychain* Antikörper (hcAb), bestehend nur aus zwei schweren Ketten (*heavy chain*) mit je einer variablen Domäne (VHH), die als Antigenbindestelle fungiert. **C)** Isolierte VHH-Domäne, auch *nanobody* genannt. **D)** Erstellung eines synthetischen Rezeptordimers, durch Austausch der extrazellulären Rezeptordomäne (ECD) mit *nanobodies*, die intrazelluläre Domäne (ICD) des Rezeptors bleibt erhalten; gezielte Stimulation über synthetische Liganden möglich. Die Masse der Moleküle in A-C ist zum Vergleich in Kilodalton (kDa) angegeben. Abbildung A-C angelehnt an Bannas *et al.* (2017), Chanier & Chames (2019) und Muyldermans *et al.* (2013), D angelehnt an Mossner *et al.* (2020), erstellt mit BioRender.com.

Um die Notwendigkeit neuer hochspezifischer Antikörper für die vielen Methoden der Molekularbiologie zur Analyse von Molekülen zu umgehen, werden die zu untersuchenden Moleküle häufig mit spezifischen Epitopen, oder Protein-*tags*, wie beispielsweise GFP, mCherry und Flag-*tag*, fusioniert, bei denen spezifische Antikörper bekannt und gut verfügbar sind (Fridy *et al.*, 2014; Rothbauer *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit werden GFP und mCherry zur gezielten Stimulation verwendet. Der Hauptvorteil von GFP und mCherry besteht hierbei darin, dass sie keine humanen Äquivalente besitzen. Demnach ermöglichen sie eine hintergrundfreie und Zelltyp-spezifische Aktivierung von SyCyRs durch dimere GFP- oder mCherry-Liganden (Engelowski *et al.*, 2018). Zukünftig könnten CAR T-Zellen funktional mit SyCyRs modifiziert werden, um durch die gezielte Stimulation mit synthetischen Liganden den Therapieerfolg zu verbessern (Scheller *et al.*, 2019).

### 1.3 Ziele der Arbeit

Typ I Interferone spielen bei vielen verschiedenen Krankheitsbildern, von physiologischer Wirtsabwehr bei SARS-CoV2 bis zur Induktion von Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis oder der medikamentösen Therapie von HCV, eine wichtige Rolle. Um die Mechanismen und Dynamiken der Pathologien besser verstehen und diese möglichst gut therapieren zu können, ist ein genaues Verständnis der IFN Typ I induzierten Signaltransduktion und der Funktion struktureller Abschnitte des IFNARs sehr wichtig. Dies ermöglicht beispielsweise das Erkennen neuer *targeting points* für Medikamente oder deren Verbesserung.

Synthetische Rezeptoren und Rezeptor-Liganden-Systeme sind neuere Entwicklungen, durch die eine funktionale Analyse von Signalwegen *in vitro* gezielter und differenzierter durchführbar ist. Die synthetischen Rezeptoren können hochspezifisch durch die korrespondierenden synthetischen Liganden angesprochen werden.

Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe Scheller bildeten die Grundlage für die vorliegende Dissertation (N. Coesfeld, FH. De Vos, E. Zimmer). In dieser Arbeit soll die Rolle der intrazellulären Domänen (ICD) der Interferon- $\alpha$  Rezeptoren bei der STAT1 und 2 Aktivierung untersucht werden. Ein besonderer Fokus soll hierbei auf den Tyrosinen der ICDs liegen, da in bisherigen Publikationen konträre Ergebnisse bezüglich deren Wichtigkeit und Funktion beschrieben wurden. Das von Engelowski und Kollegen etablierte SyCyR System wird hierfür auf die Typ I Interferone ausgeweitet und auf Funktionalität überprüft.

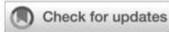
Initial sollen die cDNAs für die synthetischen IFNARs in Plasmid-DNA kloniert und über Transfektion in adhärenente Zellen eingebracht werden. Anschließend soll die funktionale Analyse der SyCyRs in zellbasierten Stimulationsassays durchgeführt werden. Hierfür

## EINLEITUNG

sollen die transfizierten Zellen mit den synthetischen Liganden stimuliert werden und nach der Lyse der Zellen soll die Analyse des Proteoms mittels Western Blot erfolgen. Primär soll überprüft werden, ob synthetische IFNARs ihr natürliches Vorbild in Signaltransduktion und Initiierung von ISGs, wie beispielsweise USP18 und Mx-Protein, phänokopieren, um anschließend durch Deletions- und Mutationsvarianten eine Analyse der ICD in Bezug auf STAT-Aktivierung durchzuführen. Mittels homomerer GFP- und mCherry-Liganden soll zudem die Bildung von aktiven Rezeptorhomodimeren überprüft werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle der intrazellulären Rezeptordomäne des IFNAR und der hier vorliegenden Tyrosine bei der Aktivierung von STAT1 und 2 zu analysieren, wobei die SyCyRs als unabhängige Methode zur Untersuchung der Signaltransduktion genutzt werden.

- 2 Synthetic mimics assigned a major role to IFNAR2 in type I interferon signaling, Zoellner N, Coesfeld N, De Vos FH, Denter J, Xu HC, Zimmer E, Knebel B, Al-Hasani H, Mossner S, Lang PA, Floss DM, Scheller J, *Frontiers in Microbiology, Volume 13: 1-17, (2022)***



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Safder Ganaie,  
Washington University in St. Louis,  
United States

## REVIEWED BY

Donna A. MacDuff,  
University of Illinois at Chicago,  
United States  
David Jesse Sanchez,  
Western University of Health Sciences,  
United States

## \*CORRESPONDENCE

Doreen M. Floss  
doreen.floss@uni-duesseldorf.de  
Jürgen Scheller  
jscheller@uni-duesseldorf.de

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Frontiers in Microbiology - Virology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

RECEIVED 07 June 2022

ACCEPTED 04 August 2022

PUBLISHED 02 September 2022

## CITATION

Zoellner N, Coesfeld N, De Vos FH,  
Denter J, Xu HC, Zimmer E, Knebel B,  
Al-Hasani H, Mossner S, Lang PA,  
Floss DM and Scheller J (2022) Synthetic  
mimetics assigned a major role to  
IFNAR2 in type I interferon signaling.  
*Front. Microbiol.* 13:947169.  
doi: 10.3389/fmicb.2022.947169

## COPYRIGHT

© 2022 Zoellner, Coesfeld, De Vos, Denter,  
Xu, Zimmer, Knebel, Al-Hasani, Mossner,  
Lang, Floss and Scheller. This is an open-  
access article distributed under the terms  
of the [Creative Commons Attribution  
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or  
reproduction in other forums is permitted,  
provided the original author(s) and the  
copyright owner(s) are credited and that  
the original publication in this journal is  
cited, in accordance with accepted  
academic practice. No use, distribution or  
reproduction is permitted which does not  
comply with these terms.

# Synthetic mimetics assigned a major role to IFNAR2 in type I interferon signaling

Nele Zoellner<sup>1</sup>, Noémi Coesfeld<sup>1</sup>, Frederik Henry De Vos<sup>1</sup>,  
Jennifer Denter<sup>2</sup>, Haifeng C. Xu<sup>2</sup>, Elena Zimmer<sup>1</sup>,  
Birgit Knebel<sup>3</sup>, Hadi Al-Hasani<sup>3</sup>, Sofie Mossner<sup>1</sup>,  
Philipp A. Lang<sup>2</sup>, Doreen M. Floss<sup>1\*</sup> and Jürgen Scheller<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Medical Faculty, Institute of Biochemistry and Molecular Biology II, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany, <sup>2</sup>Medical Faculty, Institute of Molecular Medicine II, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany, <sup>3</sup>Medical Faculty, Institute for Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, German Diabetes Center, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany

Type I interferons (IFNs) are potent inhibitors of viral replication. Here, we reformatted the natural murine and human type I interferon- $\alpha/\beta$  receptors IFNAR1 and IFNAR2 into fully synthetic biological switches. The transmembrane and intracellular domains of natural IFNAR1 and IFNAR2 were conserved, whereas the extracellular domains were exchanged by nanobodies directed against the fluorescent proteins Green fluorescent protein (GFP) and mCherry. Using this approach, multimeric single-binding GFP-mCherry ligands induced synthetic IFNAR1/IFNAR2 receptor complexes and initiated STAT1/2 mediated signal transduction via Jak1 and Tyk2. Homodimeric GFP and mCherry ligands showed that IFNAR2 but not IFNAR1 homodimers were sufficient to induce STAT1/2 signaling. Transcriptome analysis revealed that synthetic murine type I IFN signaling was highly comparable to IFN $\alpha$ 4 signaling. Moreover, replication of vesicular stomatitis virus (VSV) in a cell culture-based viral infection model using MC57 cells was significantly inhibited after stimulation with synthetic ligands. Using intracellular deletion variants and point mutations, Y510 and Y335 in murine IFNAR2 were verified as unique phosphorylation sites for STAT1/2 activation, whereas the other tyrosine residues in IFNAR1 and IFNAR2 were not involved in STAT1/2 phosphorylation. Comparative analysis of synthetic human IFNARs supports this finding. In summary, our data showed that synthetic type I IFN signal transduction is originating from IFNAR2 rather than IFNAR1.

## KEYWORDS

interferon, synthetic, cytokine, virus, nanobody

## Introduction

Signal transduction of cytokines is executed by cytokine receptors which are in an off-mode without cytokine and a dimeric or multimeric on-mode after cytokine binding (Croxford et al., 2012). The on-state eventually became interrupted by depletion of the cytokine and cytokine receptor, by natural cytokine antagonists or intracellular negative

feedback mechanisms. Monoclonal antibodies as synthetic cytokine antagonists are still a relatively recent but extremely successful development representing an own class of therapeutic biomolecules. Synthetic cytokine receptors are emerging tools for immunotherapeutic applications (Scheller et al., 2019), with chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy being the first example which has been approved as gene therapy for the treatment of severe cases of acute lymphatic leukemia (Si et al., 2018).

Recently, we have developed a fully synthetic cytokine/cytokine receptor system which phenocopied cytokine signaling, exemplified for the pro-inflammatory cytokines Interleukin (IL)-6, IL-23, TNF $\alpha$ , the anti-inflammatory cytokine IL-22 and death ligand Fas (Engelowski et al., 2018; Mossner et al., 2020, 2021). This fully synthetic cytokine receptor system (SyCyR) is based on nanobodies specifically recognizing GFP and mCherry (Rothbauer et al., 2008; Fridy et al., 2014) fused to the transmembrane and intracellular domains of the receptor of interest. The nanobodies serve as extracellular sensors for homo- and heteromeric GFP-mCherry fusion proteins which induce receptor dimerization (Mossner et al., 2020). A nanobody or VHH domain consists of the N-terminal variable domain of Camelidae heavy chain antibody which is sufficient for antigen binding (Wesolowski et al., 2009). The major advantage of GFP and mCherry was that they have no human equivalent, enabling background-free and cell-type specific activation of synthetic cytokine receptors by dimeric GFP/mCherry ligands, e.g., of CAR T-cells functionally modified by SyCyRs. For human therapeutic adoptive transfer approaches of T-cells transduced with synthetic receptors, potential immunogenicity of GFP and mCherry may be a barrier because of the development of antibodies directed against these synthetic ligands. In addition, the SyCyR contains a non-natural extracellular component, which is the ligand-binding nanobody. Nanobodies can be humanized to reduce immunogenicity (Rossotti et al., 2022). Moreover, also the chimeric antigen receptor (CAR) is a fusion protein consisting of an extracellular non-natural ligand-binding single-chain Fv fragment and did not result in major immune rejection. Therefore, SyCyRs might be relatively safe.

Type I interferons (IFNs) are potent inhibitors of viral replication. The ability of type I IFNs to inhibit virus replication was first reported more than 60 years ago (Isaacs et al., 1957; Isaacs and Lindenmann, 1957). Currently, type I IFNs constitute one of the most powerful innate immune defense mechanisms known. Lack of type I IFN signaling results in excessive viral replication resulting in fatal viral infection (Muller et al., 1994). Consistently, type I IFN malfunctions are associated with life-threatening coronavirus disease 2019 (COVID-19) after SARS-CoV-2 infection (Zhang et al., 2020). Furthermore, patients exhibiting changes in type I IFN signaling can develop severe diseases after vaccination with live attenuated viruses causing such as measles, mumps, rubella (MMR) or yellow fever (Duncan et al., 2015; Hernandez et al., 2019). Because of their

potent antiviral activity and their immune-stimulatory capacity, type I IFNs have been used clinically for the treatment of hepatitis C virus (HCV), and with limitation also for HBV (Degertekin and Lok, 2009). Apart from limiting viral replication, type I IFN can modify other immune cell subsets such as protection of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) from natural killer (NK) cell-mediated regulation (Xu et al., 2014, 2017). However, a prolonged IFN signaling can be observed during chronic LCMV viral infection, this leads to up-regulation of PD-L1 and IL-10 on dendritic cells and macrophages, thereby contributing to the T-cell exhaustion (Teijaro et al., 2013; Wilson et al., 2013). Moreover, in HIV-1 infection, a decrease in CD4-T-cell is associated with an increase in IFN-I (type I IFN) level (Hardy et al., 2013; Dagenais-Lussier et al., 2017). Therefore, depending on the context, IFN-I can be beneficial or harmful to the host.

The type I IFN family consists of 13 IFN $\alpha$  subtype genes in humans (14 in mice), single IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\kappa$ , IFN $\omega$  (humans), and IFN $\zeta$  (mice) subtypes (Lazear et al., 2019; Mesev et al., 2019). Type I IFNs are known to bind to heterodimers of type I IFN receptors (IFNAR1 and IFNAR2) which mainly signal *via* the Janus kinase (Jak)/signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway. IFNAR1 and IFNAR2 are constitutively associated with tyrosine kinase 2 (Tyk2; Uzé et al., 1990; Colamonici et al., 1994) and Jak1 (Novick et al., 1994; Lutfalla et al., 1995), respectively, at well described interaction sites (Yan et al., 1996; Wallweber et al., 2014). The canonical type I IFN signaling pathway relies on the phosphorylation and nuclear translocation of STAT proteins, mainly STAT1 and STAT2, which became phosphorylated following receptor dimerization/activation. Together with IFN regulatory factor 9 (IRF9) they form the heterotrimeric complex IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3) to regulate the transcription of genes under control of IFN-stimulated regulatory elements (Platanias, 2005). STAT2 is constitutively associated with the cytosolic domain of IFNAR2 (Saleh et al., 2002) and STAT1 docking to IFNAR2 occurs through STAT1-STAT2 heterodimerization in agreement with the requirement of STAT2 for STAT1 phosphorylation by IFN (Li et al., 1997; Nguyen et al., 2002). The STAT2 interaction site is located within the last 110 amino acids of IFNAR2 (Shemesh et al., 2021). A very recent report illustrates the importance of the tyrosine residues in human IFNAR2 for STAT phosphorylation in general (Shemesh et al., 2021), albeit previous reports have also assigned these roles for tyrosine residues in IFNAR1 (Li et al., 1997). Of note, the activation of Jak-STAT pathway alone is not sufficient for the generation of complete biological activities of type I IFNs.

Here, we adopted our synthetic cytokine receptor technology to type I IFN signaling and showed synthetic IFN signaling and viral defense. Furthermore, mutation of critical tyrosine residues in synthetic IFNAR2 abolish STAT1/2 phosphorylation. Albeit with slightly lower efficiency, synthetic IFNAR2 homodimers also led to STAT1/2 phosphorylation.

## Materials and methods

### Cloning

The genes for type I IFN receptor chains were translated in one open reading frame using expression cassettes containing the foot-and-mouth disease virus (FMDV) 2A (F2A) self-processing sequence and synthesized by BioCat GmbH (Heidelberg, Germany). The cDNA was generated by fusion of coding sequences for human IL-11R signal peptide (SP; Q14626, aa 1–24) followed by sequences for HA tag (YPYDVPDYA), murine IFNAR2 (O35664, aa 22–513), furin cleavage site (RAKR) followed by sequence for F2A peptide (Fang et al., 2005), coding sequences for human IL-11R SP, myc tag (EQKLISEEDL) and murine IFNAR1 (P33896, aa 27–590). For synthetic myc-tagged GFP-nanobody-mIFNAR1 ( $V_G$ mIFNAR1) or GFP-nanobody-hIFNAR1 ( $V_G$ hIFNAR1) coding sequences of GFP-VHH (Rothbauer et al., 2008) and murine (S415 to C590) or human IFNAR1 (P17181, S422 to V557) have been fused representing 15 aa of the extracellular domain, the transmembrane domain and the cytoplasmic part of the receptor. For synthetic HA-tagged mCherry-nanobody-mIFNAR2 ( $V_G$ mIFNAR2) or mCherry-nanobody-hIFNAR2 ( $V_G$ hIFNAR2) coding sequences of mCherry-VHH (Fridy et al., 2014) and murine (I228 to R513) or human IFNAR2 (P48551, L229 to R515) have been fused representing 15 aa of the extracellular domain, the transmembrane domain and the cytoplasmic part of the receptor. The pcDNA3.1 expression vectors containing the cDNAs for the synthetic receptors were used as template for the generation of receptor deletion variants by standard PCR. Mutation of tyrosine to phenylalanine was generated by PCR using Phusion high-fidelity DNA polymerase, followed by DpnI digestion of methylated template DNA (Edelheit et al., 2009). For retroviral transduction of Ba/F3-gp130 cells expression cassettes were transferred into the retroviral vector pMOWS-puro (Ketteler et al., 2002). All generated expression plasmids have been verified by sequencing.

### Cells and reagents

The generation of Ba/F3-gp130 cells was described elsewhere (Chalaris et al., 2007). The packaging cell line Phoenix-Eco was received from Ursula Klingmüller (DKFZ, Heidelberg, Germany). HEK293 (ACC 305) cells were purchased from the Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Culture (Braunschweig, Germany). Kinase-deficient human fibrosarcoma cell lines U4C,  $\gamma$ 2A, and U1A have been described (Behrmann et al., 2004). MC57 (CRL-2295) cells were from ATCC (Manassas, VA, United States). Cell lines were grown in DMEM high glucose culture medium (GIBCO®, Life Technologies, Darmstadt, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO®, Life Technologies), 60 mg/l penicillin and 100 mg/l streptomycin (Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Germany) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Proliferation of

Ba/F3-gp130 cells was maintained in the presence of 0.2% (10 ng/ml) human Hyper-IL-6 (HIL-6; Fischer et al., 1997). Synthetic cytokine ligands were expressed and purified as described (Mossner et al., 2020). Recombinant murine IFN $\alpha$ 4 (#12115–1) was obtained from pbl assay science (Piscataway, NJ, United States). Recombinant murine IFN $\beta$  [#8234-MB-010/CF], IFN $\gamma$  (#485-MI-100) and IFN $\lambda$ 2 (#4635-ML-025) were purchased from R&D Systems (bio-technie, Minneapolis, MN, United States). Phospho-STAT1 [(Tyr701; 58D6), #9167], STAT1 (#9172), phospho-STAT2 [(Tyr690; D3P2P), #88410], STAT2 [(D9J7L), #72604], HA-Tag [(C29F4), #3724], Myc-Tag [(71D10), #2278], Jak1 [(6G4), #3344], Jak2 [(D2E12), #3230], Tyk2 (#9312) antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Frankfurt, Germany). Goat anti-rabbit IgG (H + L) cross-adsorbed secondary antibody, peroxidase-conjugated (#31462) was obtained from Pierce (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States). Alexa Fluor 488 conjugated anti-rabbit IgG (H + L), F(ab')<sub>2</sub> fragment (#4412) was obtained from Cell Signaling Technology.

### Transfection of cells

HEK293, U4C,  $\gamma$ 2A, and U1A cells ( $2 \times 10^6$ ) were transiently transfected as indicated using TurboFect transfection reagent (Fermentas, Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. MC57 and Ba/F3-gp130 cells were retrovirally transduced with the pMOWS-puro expression plasmids as described (Floss et al., 2013). Transduced Ba/F3 cells were grown in DMEM medium as described above supplemented with 10 ng/ml HIL-6. Selection of transduced Ba/F3-gp130 and MC57 cells was performed with puromycin (1.5, 3  $\mu$ g/ml; Carl Roth, Karlsruhe, Germany) for at least 2 weeks. Afterward, the generated MC57 and Ba/F3-gp130 cell lines were analyzed for receptor cell surface expression *via* flow cytometry.

### Cell surface detection of synthetic IFNARs *via* flow cytometry

Cell surface expression of stably transfected Ba/F3-gp130 and MC57 cells was detected by specific antibodies against HA and myc tag.  $5 \times 10^5$  cells were washed in FACS buffer (PBS, 1% BSA) and then incubated in 50  $\mu$ l of FACS buffer containing the indicated specific primary antibody (Myc-Tag 1:100, HA-Tag 1:100). After incubation of at least 1 h at room temperature, cells were washed and resuspended in 50  $\mu$ l of FACS buffer containing secondary antibody (Alexa Fluor 488 conjugated anti-rabbit IgG (H + L), F(ab')<sub>2</sub> fragment 1:100) and incubated for 1 h at room temperature. Cells were washed and resuspended in 500  $\mu$ l of FACS buffer and analyzed by flow cytometry (BD FACSCanto II flow cytometer using the FACSDiva software, BD Biosciences). Data analysis was conducted using FCS Express 7 (De Novo Software, Pasadena, CA, United States).

## Cell viability assay

Ba/F3-gp130 cells were washed and  $5 \times 10^3$  cells were cultured for 3 days in a final volume of 100  $\mu$ l in the presence or absence of cytokine/synthetic cytokine ligands. The CellTiter-Blue<sup>®</sup> Reagent was used to determine cellular viability by recording the fluorescence (excitation 560 nm, emission 590 nm) using an Infinite M200 PRO plate reader (Tecan, Crailsheim, Germany) immediately after adding 20  $\mu$ l of reagent per well (time point 0) and up to 120 min thereafter. All conditions were measured in triplicate per experiment. Fluorescence values were normalized by subtraction of time point 0 values. Data are presented as means  $\pm$  SD. All experiments were performed at least three times, and one representative experiment was selected.

## Stimulation assays

Ba/F3-gp130 cells were washed and starved in serum-free medium for 4 h. Subsequently, cells were stimulated with the indicated ligands for the indicated time points, harvested by centrifugation at 4°C for 5 min at 1,500 rpm and frozen. Cells were lysed for 2 h in 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM sodium vanadate, and 10 mM MgCl<sub>2</sub> supplemented with complete protease inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics). Transiently transfected HEK293, U4C,  $\gamma$ 2A, and U1A cells were washed and starved in serum-free medium overnight. MC57 cells were seeded 2 days prior to stimulation at density of  $3\text{--}4 \times 10^6$  cells per 10 cm cell culture dish. The next day, MC57 cells were washed with PBS and starved in serum-free medium overnight. Cells were stimulated with the indicated ligands for the indicated time points, harvested and lysed for 2 h in lysis buffer described above. Protein concentration of cell lysates was determined by the BCA Protein Assay (Pierce, Thermo Scientific). Analysis of STAT1/2 activation was performed by Western blotting of 50  $\mu$ g of total soluble protein from total cell lysates and subsequent detection steps using the anti-pSTAT1/2 (1:1000) and anti-STAT1/2 (1:1000) antibodies described above.

## Western blotting

Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. The membranes were blocked in 5% fat-free dried skimmed milk in TBS-T (10 mM Tris HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Tween 20) and probed with the indicated primary antibodies in 5% BSA in TBS-T at 4°C overnight. After washing, membranes were incubated with secondary peroxidase-conjugated antibodies (1:2,500) diluted in 5% fat-free dried skimmed milk. The Immobilon<sup>™</sup> Western Reagents (Millipore Corporation, Billerica, MA, United States) and the ChemCam Imager (INTAS

Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Germany) were used for signal detection.

## In vitro VSV replication assay

Equal amount of MC57-GFP and MC57-V<sub>G</sub>mIFNAR1-V<sub>C</sub>mIFNAR2 cells were seeded into 24 wells. The next day cells were treated with 100 ng/ml GC, 150 U/ml IFN $\alpha$ 4 or left untreated, followed after 120 min by infection of VSV-Indiana at MOI 0.01 and 0.1. At 12 h or 24 h post-infection, virus in supernatant was analyzed for infectious virus using focus-forming assay on Vero cells (Lang et al., 2009).

## Microarray analysis

Ba/F3-gp130-V<sub>G</sub>mIFNAR1-V<sub>C</sub>mIFNAR2 cells were cultured as described before. Cells were washed four times with PBS to remove cytokines/synthetic cytokine ligands from the medium and then starved for 5 h in serum-free DMEM. Cells were stimulated for 240 min without cytokine or with 100 ng/ml GCCG or 100 U/ml IFN $\alpha$ 4. Total RNA extraction of four independent biological replicates was carried out by an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. The microarray analysis was performed as described (Engelowski et al., 2018). Data were analyzed pairwise Ba/F3-gp130-V<sub>G</sub>mIFNAR1-V<sub>C</sub>mIFNAR2 cells stimulated with 100 ng/ml GCCG versus without cytokine, stimulated with 100 U/ml IFN $\alpha$ 4 versus without cytokine, and stimulated with 100 ng/ml GCCG versus 100 U/ml IFN $\alpha$ 4. Transcriptome Analysis Console (TAC) software from Thermo Fisher Scientific was used for analysis.

## Statistical analyses

For proliferation assays, a representative experiment of  $n \geq 3$  assays with comparable results is displayed. IC<sub>50</sub> values were calculated using a non-linear regression analysis in GraphPad Prism 6.1 (version 6.1 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California United States). The data are presented as means  $\pm$  S.D. For multiple comparisons, one-way ANOVA, followed by Bonferroni correction, was used (GraphPad Prism 6.1). Statistical significance was set at the level of  $p \leq 0.05$  ( $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.001$ ).

## Data availability

The data of this study are available within the paper. Gene expression raw data have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) with the accession number GSE202839.

## Results

### Synthetic and natural cytokine receptors for type I interferons depend on Jak1 and Tyk2

Type I interferons resemble a large group of cytokines which all bind and signal *via* the IFN $\alpha/\beta$  receptor (IFNAR1)/2 (Figure 1A). Genetic exchange of the coding region for the extracellular domain of IFNAR1 by an anti-GFP nanobody (VHH<sub>GFP</sub>, V<sub>G</sub>) and of IFNAR2 by an anti-mCherry nanobody (VHH<sub>mCherry</sub>, V<sub>C</sub>) resulted in the synthetic cytokine receptors VHH<sub>GFP</sub>IFNAR1 (V<sub>G</sub>IFNAR1) and VHH<sub>mCherry</sub>IFNAR2 (V<sub>C</sub>IFNAR2). Whereas IFNAR1 and IFNAR2 are activated by type I interferons, V<sub>G</sub>IFNAR1 and V<sub>C</sub>IFNAR2 were expected to form functional receptor complexes after binding to the heterodimeric ligand GFP-mCherry (GC) fusion protein (Figure 1A). We used kinase-deficient U4C,  $\gamma$ 2A and U1A cells transiently transfected with cDNAs coding for murine IFNAR1 and IFNAR2 to demonstrate the dependence of type I interferons on the receptor associated Janus kinases Tyk2 for IFNAR1 and Jak1 for IFNAR2. Deficiency of Jak1 in U4C, Jak2 in  $\gamma$ 2A and Tyk2 in U1A cells was shown by Western blotting (Figures 1B,C). Expression of natural and synthetic mIFNAR1 and mIFNAR2 was also shown by Western blot detecting myc-tagged mIFNAR1 and HA-tagged mIFNAR2 (Figure 1B). Consequently, stimulation for 30 min with type I interferon IFN $\alpha$ 4 (200 U/ml) induced STAT1 phosphorylation only in Jak2 deficient  $\gamma$ 2A cells but not in Jak1 deficient U4C cells and Tyk2 deficient U1A cells (Figure 1B). Since all cells express the Jak1-dependent signal transducing Interleukin 6 receptor gp130, stimulation with 10 ng/ml of the IL-6/soluble IL-6R fusion protein Hyper-IL-6 (Fischer et al., 1997) for 20 min induced STAT1 phosphorylation in Jak2 deficient  $\gamma$ 2A and Tyk2 deficient U1A but only marginally in Jak1 deficient U4C cells. Importantly, 10 ng/ml of the synthetic cytokine ligand GC did not induce signaling in any of the cell lines (Figure 1B). After transfection of U4C,  $\gamma$ 2A and U1A cells with cDNAs coding for V<sub>G</sub>IFNAR1 and V<sub>C</sub>IFNAR2, only Jak2 deficient  $\gamma$ 2A showed STAT1 phosphorylation after stimulation with 10 ng/ml of the synthetic cytokine GC fusion protein for 30 min but not the Jak1 deficient U4C and Tyk2 deficient U1A cells. These data indicate that synthetic IFNARs are biologically active and depend on the same Janus kinases as shown for the natural IFNARs.

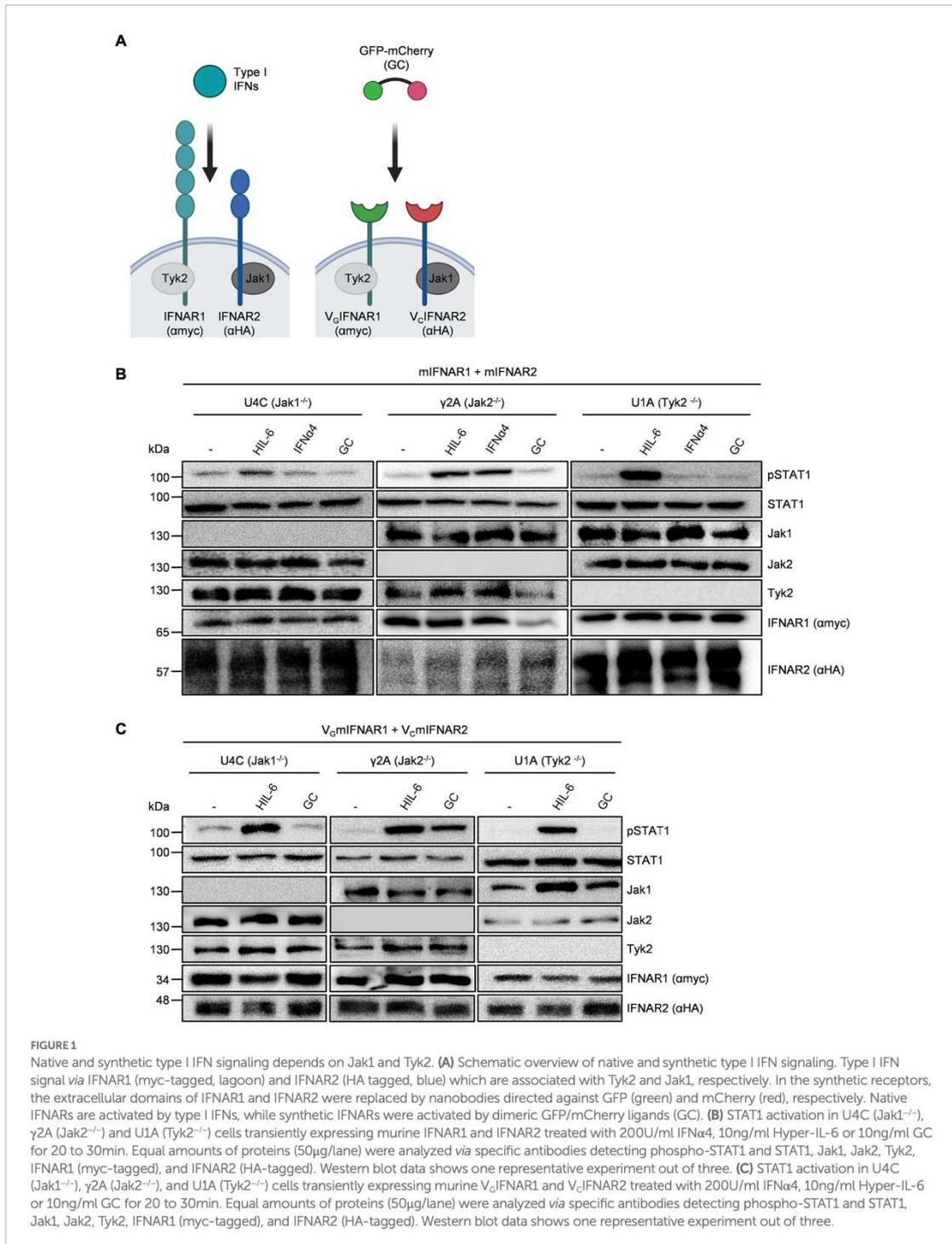
### Synthetic IFNAR2 is biologically active as homodimer and heterodimer with IFNAR1

Next, we used human (HEK293) and murine cells (Ba/F3) to verify functional heterodimeric receptor complex formation of V<sub>G</sub>mIFNAR1 and V<sub>C</sub>mIFNAR2 by dimeric GC and tetrameric GCCG synthetic ligands (Figure 2A). Moreover, we analyzed

IFNAR1 and IFNAR2 homodimerization using homodimeric synthetic ligands GG and CC. As described previously, GG, CC, and GCCG are based on dimeric IgG1 Fc-fusion proteins G-Fc, C-Fc, and GC-Fc, respectively (Mossner et al., 2020). As shown in Figure 2B, phosphorylation of STAT1 and STAT2 in HEK293 cells transiently transfected with cDNAs coding for mIFNAR1 and mIFNAR2 was achieved after stimulation with 1,000 U/ml IFN $\alpha$ 4 but not after stimulation with 100 ng/ml GCCG, GG, CC, and GC for 30 min. As expected, stimulation with 10 ng/ml Hyper-IL-6 (HIL-6) for 30 min induced STAT1 but not STAT2 phosphorylation (Fischer et al., 1997). HEK293 cells transiently transfected with cDNAs coding for murine or human V<sub>G</sub>IFNAR1 and V<sub>C</sub>IFNAR2 were also stimulated with 100 ng/ml GCCG, GG, CC, GC, and Hyper-IL-6 for 30 min. As seen for IFN $\alpha$ 4, GC, and GCCG induced STAT1 and STAT2 phosphorylation in HEK293 cells expressing murine or human V<sub>G</sub>IFNAR1 and V<sub>C</sub>IFNAR2. Interestingly, stimulation with 100 ng/ml CC but not with 100 ng/ml GG induced a similar but slightly weaker STAT1 and STAT2 phosphorylation pattern suggesting that homodimeric murine and human V<sub>C</sub>IFNAR2s were biologically active, whereas homodimeric murine and human V<sub>G</sub>IFNAR1 did not result in STAT1 and STAT2 phosphorylation (Figure 2B).

Next, we used the IL-6/sIL-6R dependent murine pre-B cell line Ba/F3-gp130. We stimulated Ba/F3-gp130 cells with the type I interferons IFN $\alpha$ 4 and IFN $\beta$ , the type II interferon IFN $\gamma$  and the type III interferon IFN $\lambda$ 2. As shown before type I IFN induced STAT1 phosphorylation (Jaster et al., 1997). Interestingly, also type II interferons but not type III interferons or GC induced STAT phosphorylation (Figure 2C). Next, Ba/F3-gp130 cells were stably transduced with cDNAs coding for murine or human V<sub>G</sub>IFNAR1 and V<sub>C</sub>IFNAR2, and cell-surface expression was analyzed by flow cytometry (Figure 2D). Stimulation of Ba/F3-gp130-V<sub>G</sub>IFNAR1-V<sub>C</sub>IFNAR2 cells with 100 ng/ml synthetic cytokine ligands for 30 min revealed that GC and GCCG also induced type I interferon-like STAT1 phosphorylation, whereas STAT1 phosphorylation by CC-induced homodimeric V<sub>C</sub>IFNAR2 was less intense (Figure 2E). A time course experiment was carried out to investigate the dynamics of STAT1 phosphorylation in Ba/F3-gp130-V<sub>G</sub>mIFNAR1-V<sub>C</sub>mIFNAR2 cells stimulated with IFN $\alpha$ 4 or GC. STAT1 phosphorylation was analyzed by Western blotting at the indicated time points (Figure 2F). Interestingly, STAT1 expression in Ba/F3-gp130-V<sub>G</sub>mIFNAR1-V<sub>C</sub>mIFNAR2 cells increased 240 min after stimulation with either IFN $\alpha$ 4 or GC.

Proliferation of Ba/F3-gp130 is dependent on Hyper-IL-6 and mediated by STAT3 and ERK phosphorylation (Fischer et al., 1997; Figure 3A). Stimulation of Ba/F3-gp130 cells with 200 U/ml type I interferon failed to induce cellular proliferation, which was also observed for Ba/F3-gp130-V<sub>G</sub>IFNAR1-V<sub>C</sub>IFNAR2 cells after stimulation with 1,000 ng/ml synthetic cytokine ligands GCCG, GG, CC, and GC (Figure 3A). It was, however, previously shown that type I IFN signaling blocks IL-3-induced cellular proliferation of Ba/F3 cells (Jaster et al., 1999). Ba/F3-gp130 cells expressing murine or human V<sub>C</sub>IFNAR1 and



V<sub>c</sub>IFNAR2 were stimulated with 10 ng/ml Hyper-IL-6, which induce cellular proliferation and was defined as 100% proliferation (Figures 3B,C). Simultaneous titration of increasing

amounts of GC, CC and GG into Hyper-IL-6 stimulated Ba/F3 cell lines resulted in dose-dependent inhibition of cellular proliferation for GC and CC which induced murine or human

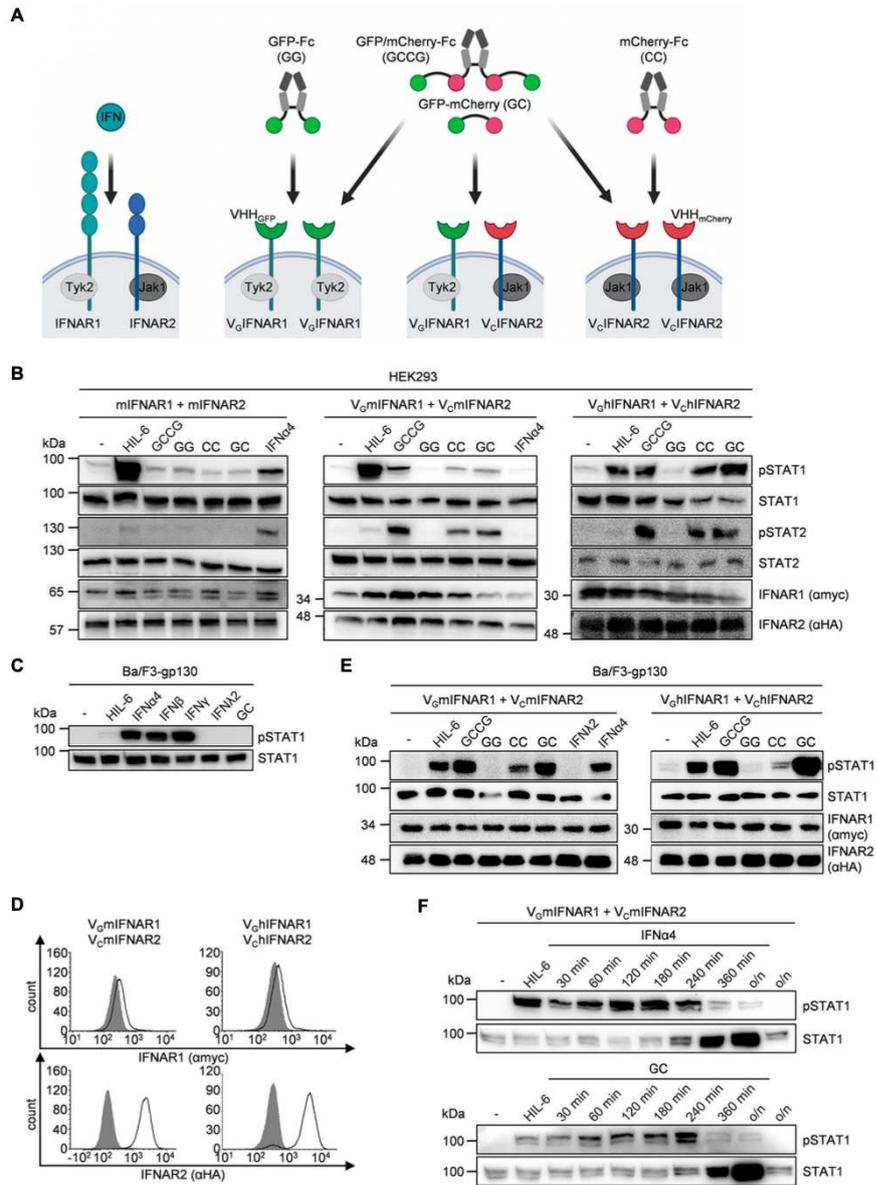


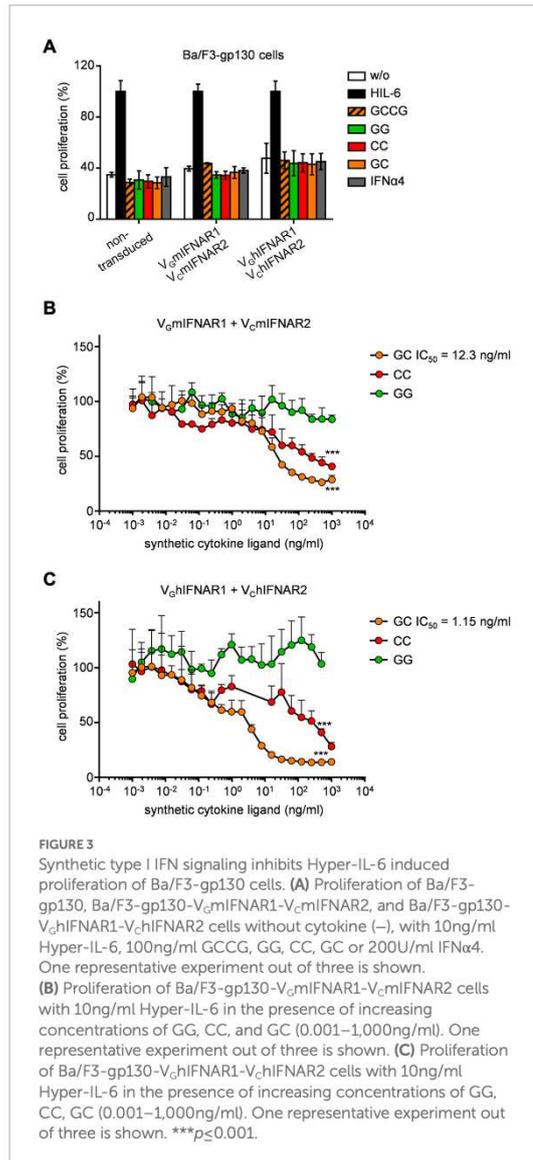
FIGURE 2

Comparable pattern and intensities of STAT activation by native and synthetic type I IFN receptors. (A) Whereas native type I IFN signaling depends on IFNAR1/2 heterodimers, the synthetic cytokines can engage different IFNAR1/2 receptor combinations. IFNAR1 (myc-tagged, lagoon) and IFNAR2 (HA-tagged, blue) which are associated with Tyk2 and Jak1, respectively. In the synthetic receptors, the extracellular domains of IFNAR1 and IFNAR2 were replaced by nanobodies directed against GFP (green) and mCherry (red), respectively. Native IFNARs are activated by type I IFNs, synthetic IFNARs were activated by multimeric GFP/mCherry ligands (GC, GG, CC, GCCG). (B) STAT1 and STAT2 activation in HEK293 cells transiently expressing murine IFNAR1 and IFNAR2 (left), murine V<sub>G</sub>IFNAR1 and V<sub>C</sub>IFNAR2 (middle) or human V<sub>G</sub>IFNAR1 and V<sub>C</sub>IFNAR2 (right) treated with 1,000U/ml IFNα4, 10ng/ml Hyper-IL-6 or 100ng/ml of the synthetic cytokine ligands (GCCG, GG, CC, GC) for 30min. Equal amounts of proteins (50µg/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT1, phospho-STAT2 and STAT1, STAT2, IFNAR1 (myc-tagged), and IFNAR2 (HA-tagged). Western blot data shows one representative experiment out of three. (C) STAT1 activation in Ba/F3-gp130 cells after stimulation with 200U/ml IFNα4, 100ng/ml IFNβ, 20ng/ml IFNγ, 20ng/ml IFNλ2, 10ng/ml Hyper-IL-6, or 100ng/ml of the synthetic cytokine ligands GC for 30min. Equal amounts of proteins (50µg/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT1 and STAT1. Western blot data shows one representative experiment out of three. (D) Cell surface expression of Ba/F3-gp130 cells transfected with either murine or human V<sub>G</sub>IFNAR1 and V<sub>C</sub>IFNAR2. Expression was detected via antibodies detecting myc-tagged IFNAR1 (upper panel) or HA-tagged IFNAR2 (lower panel)

(Continued)

**FIGURE 2 Continued**

and is indicated as solid line. Gray-shade areas indicate non transfected Ba/F3-gp130 cells (negative control). (E) STAT1 activation in Ba/F3-gp130 cells stably expressing murine  $V_C$ IFNAR1 and  $V_C$ IFNAR2 (left) or human  $V_C$ IFNAR1 and  $V_C$ IFNAR2 (right) treated with 10ng/ml Hyper-IL-6, 100ng/ml of the synthetic cytokine ligands (GCCG, GG, CC, GC), 200U/ml IFN $\alpha$ 4 or 20ng/ml IFN $\lambda$ 2 for 30min. Equal amounts of proteins (50 $\mu$ g/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT1, STAT1, IFNAR1, and IFNAR2. Western blot data shows one representative experiment out of three. (F) STAT1 activation in Ba/F3-gp130 cells stably expressing murine  $V_C$ IFNAR1 and  $V_C$ IFNAR2 treated with 10ng/ml Hyper-IL-6 (30min) and 200U/ml IFN $\alpha$ 4 or 100ng/ml of the synthetic cytokine ligand GC for the indicated time points. Equal amounts of proteins (50 $\mu$ g/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT1 and STAT1. Western blot data shows one representative experiment out of three.



$V_C$ IFNAR1 and  $V_C$ IFNAR2 heterodimers and murine or human  $V_C$ IFNAR2 homodimers, respectively. GG induced IFNAR1 homodimers had no effect. Half maximal inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) were calculated for GC for murine

synthetic IFNARs to be 12.3 ng/ml, respectively (Figure 3B) and for human synthetic IFNARs 1.15 ng/ml (Figure 3C).

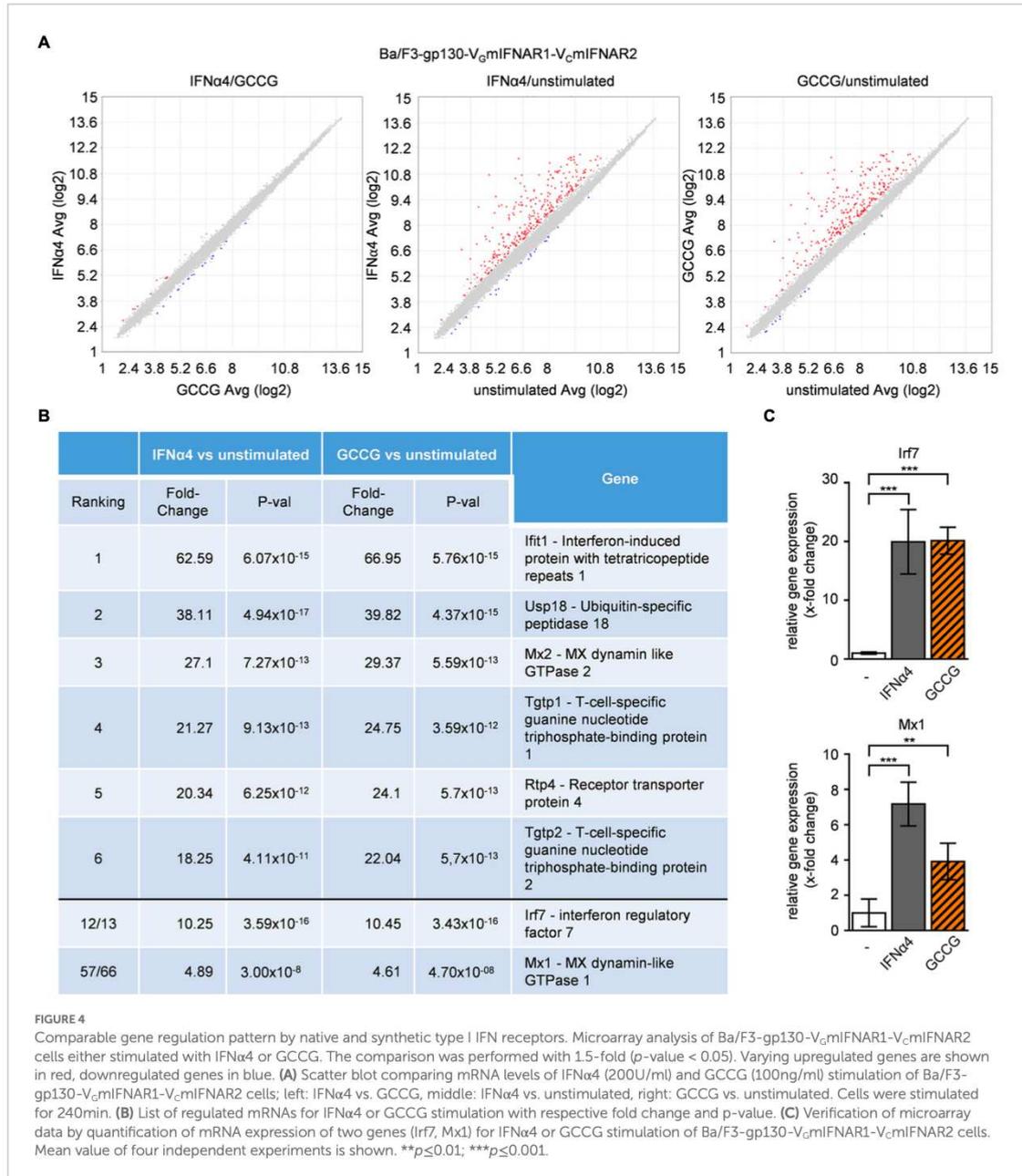
Next, we analyzed the mRNA-expression by gene-array analysis of Ba/F3-gp130- $V_C$ mIFNAR1- $V_C$ mIFNAR2 cells stimulated with 200 U/ml IFN $\alpha$ 4 and 100 ng/ml GCCG for 240 min, which indicated a high (99.91%) overlap of overall gene regulation (Figure 4A). The regulated genes are typical type I IFN target genes, including *Ifit1*, *Usp18*, *Mx1* and *Mx2* and *Irf7* (Figure 4B). mRNA-levels of *Irf7* and *Mx1* were independently verified by qPCR (Figure 4C) supporting our data obtained from the gene-array analysis. This indicates that the synthetic heterodimeric IFNARs induced the same biological outcome as the natural heterodimeric IFNARs.

### Synthetic IFNARs have antiviral activity

The mouse fibroblast cell line MC57 is used for *in vitro* infection assays with vesicular stomatitis virus (VSV; Lang et al., 2009). Stimulation of MC57 cells with type I IFNs significantly reduced VSV load as determined by plaque assays (Lang et al., 2009). Here, MC57 cells were stably transduced with  $V_C$ mIFNAR1 and  $V_C$ mIFNAR2 and cell surface expression was detected by flow cytometry (Figure 5A). Stimulation with 100 ng/ml induced STAT1 phosphorylation in MC57- $V_C$ mIFNAR1- $V_C$ mIFNAR2 cells but not in MC57 control cells transduced with GFP (Figure 5B). Type I IFN-like *Irf7* gene expression was also inducible in MC57 cells expressing  $V_C$ mIFNAR1- $V_C$ mIFNAR2 but not in GFP expressing MC57 cells after stimulation with GC (Figure 5C). MC57- $V_C$ mIFNAR1- $V_C$ mIFNAR2 and MC57-GFP cells were infected with VSV (multiplicity of infection [MOI] = 0.1 and 0.01). Cells were pre-incubated for 120 min with 100 ng/ml GC, IFN $\alpha$ 4 (150 U/ml) or left untreated. GC and IFN $\alpha$ 4 reduced viral load after infection in MC57- $V_C$ mIFNAR1- $V_C$ mIFNAR2 cells compared to the untreated control and GC-treated MC57-GFP cells (12 and 24 h time points in Figures 5D,E). These data showed that synthetic IFNARs have antiviral activity.

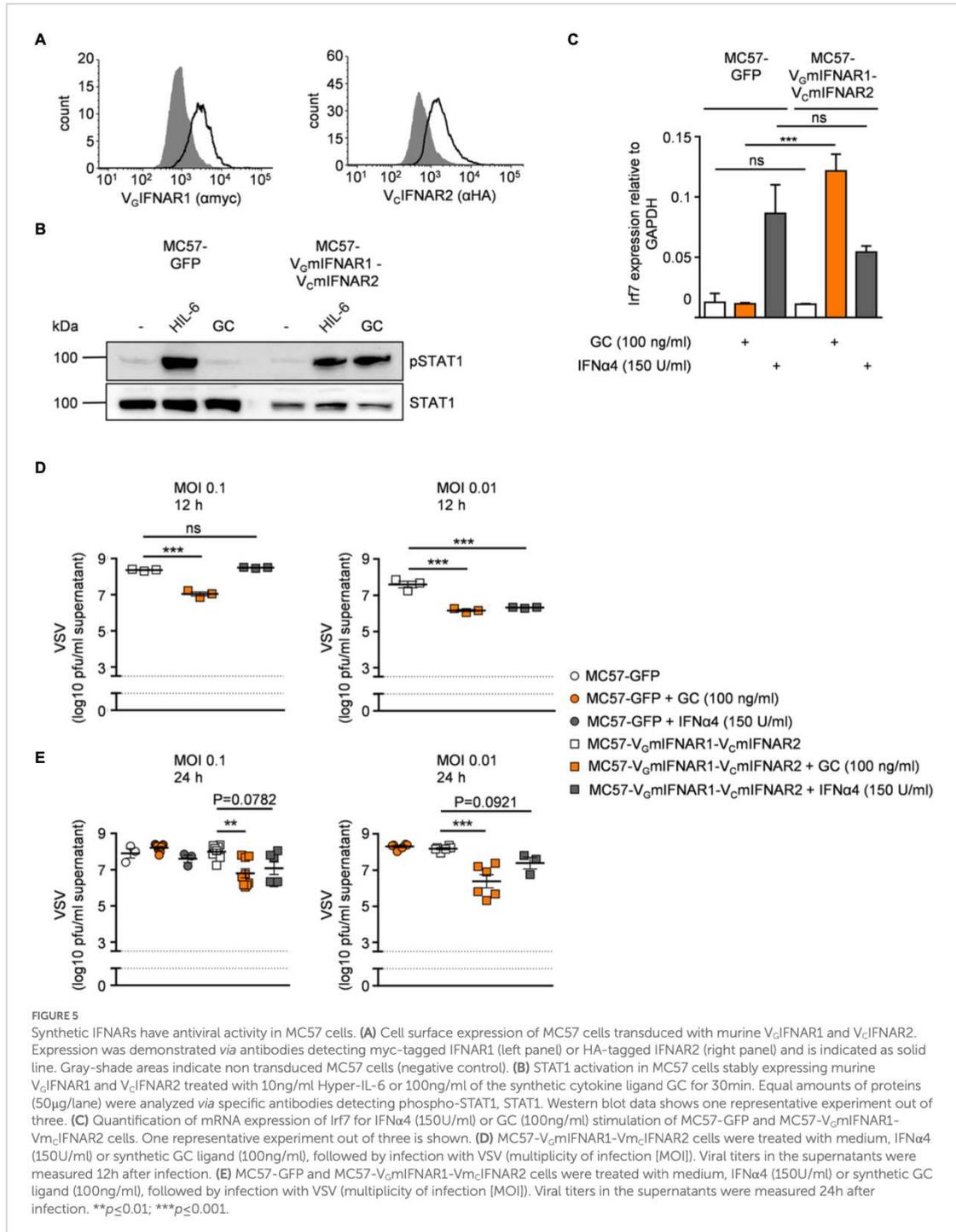
### Deletion variants for synthetic IFNARs assign a major role for Y510 in murine IFNAR2 for STAT1 and STAT2 phosphorylation

In mice, the intracellular domain of IFNAR1 has four (455, 518, 529, 576) tyrosine residues and four in humans (466, 481, 527, 538). Murine IFNAR2 has six (268, 315, 317, 335, 398, 510)



and human IFNAR2 seven intracellular tyrosine residues (269, 306, 316, 318, 337, 411, 512), which in both receptors might serve as STAT binding sites (Table 1), albeit the tyrosines are not imbedded in classical SH2 domain binding sites [pYxxP for STAT1, pYxxQ for STAT3, pYxxL for STAT5, pYxxF for STAT6 (Morris et al., 2018)]. However, some binding site deviations and tyrosine-independent mechanisms were described (Puigdevall et al., 2022).

Previous work suggested that only the tyrosine residues in human IFNAR2 are important for STAT1/2 activation (Shemesh et al., 2021). Here, we used the synthetic IFNARs to reassign tyrosine residues as STAT activation sites. First of all, we entirely deleted the intracellular domain including Janus kinase binding sites in V<sub>c</sub>MIFNAR1Δ455 and V<sub>c</sub>MIFNAR2Δ268. As expected, co-expression of V<sub>c</sub>MIFNAR1Δ455 with V<sub>c</sub>MIFNAR2Δ268 in



HEK293 cells failed to induce STAT1/2 phosphorylation after stimulation with 100ng/ml GCCG, GG, CC and GC for 30min (Figure 6A). The variants  $V_c$ mIFNAR1 $\Delta$ 518 and

$V_c$ mIFNAR2 $\Delta$ 345 contain Janus kinase Box1 and Box2 binding motifs. Moreover, they include tyrosine residues Y455 but lacked Y518, Y529 and Y576 in murine IFNAR1, and include Y268, Y315,

Y317, Y335 but lacked Y398 and Y510 in murine IFNAR2. No activation with any of the synthetic cytokines was, however, observed after co-expression of V<sub>C</sub>mIFNAR1Δ455 (no Tyk2 binding)/V<sub>C</sub>mIFNAR2Δ345 (Jak1 binding, but no conserved Y510; **Figure 6B**), V<sub>C</sub>mIFNAR1Δ518 (Tyk2 binding, lacking conserved Y518/529)/V<sub>C</sub>mIFNAR2Δ268 (no Jak1 binding; **Figure 6C**), V<sub>C</sub>mIFNAR1/V<sub>C</sub>mIFNAR2Δ268 (no Jak1 binding; **Figure 6D**), V<sub>C</sub>mIFNAR1Δ518 (Tyk2 binding, lacking conserved Y518/529)/V<sub>C</sub>mIFNAR2Δ345 (Jak1 binding, no conserved Y510; **Figure 6E**) and V<sub>C</sub>mIFNAR1/V<sub>C</sub>mIFNAR2Δ345 (Jak1 binding, no conserved Y510; **Figure 6F**). These experiments suggested that apart from Jak binding site(s), Y510 in murine IFNAR2 is crucial for STAT1 and STAT2 activation.

Next, V<sub>C</sub>mIFNAR1Δ455 (no Tyk2 binding)/V<sub>C</sub>mIFNAR2 showed STAT1 and STAT2 phosphorylation only after stimulation with GCCG and CC which point to functional homodimerization of full-length V<sub>C</sub>mIFNAR2 (**Figure 6G**). Finally, we combined V<sub>C</sub>mIFNAR1Δ518 (Tyk2 binding, lacking conserved Y518/529) and V<sub>C</sub>mIFNAR2 which resulted in STAT1 and STAT2 phosphorylation after stimulation with GCCG, CC and GC (**Figure 6H**). As seen before, GG stimulation did not result in STAT1 and STAT2 phosphorylation for any IFNAR1 combination (**Figure 6**). Our data showed that homodimeric activation of IFNAR2 results in STAT1/2 phosphorylation only for the full-length synthetic receptor. For heterodimeric IFNAR-induced STAT1/2 phosphorylation, binding of Tyk2 to IFNAR1 and the complete intracellular domain of IFNAR2 were needed. Taken together, the tyrosine residues in the intracellular domain of IFNAR1 did not contribute to STAT1/2 phosphorylation and Y510 in IFNAR2 appears to be critical for STAT1/2 phosphorylation.

### Mutational analysis assigned a minor role for Y335 and a major role for Y510 in murine IFNAR2 for STAT1 and STAT2 phosphorylation

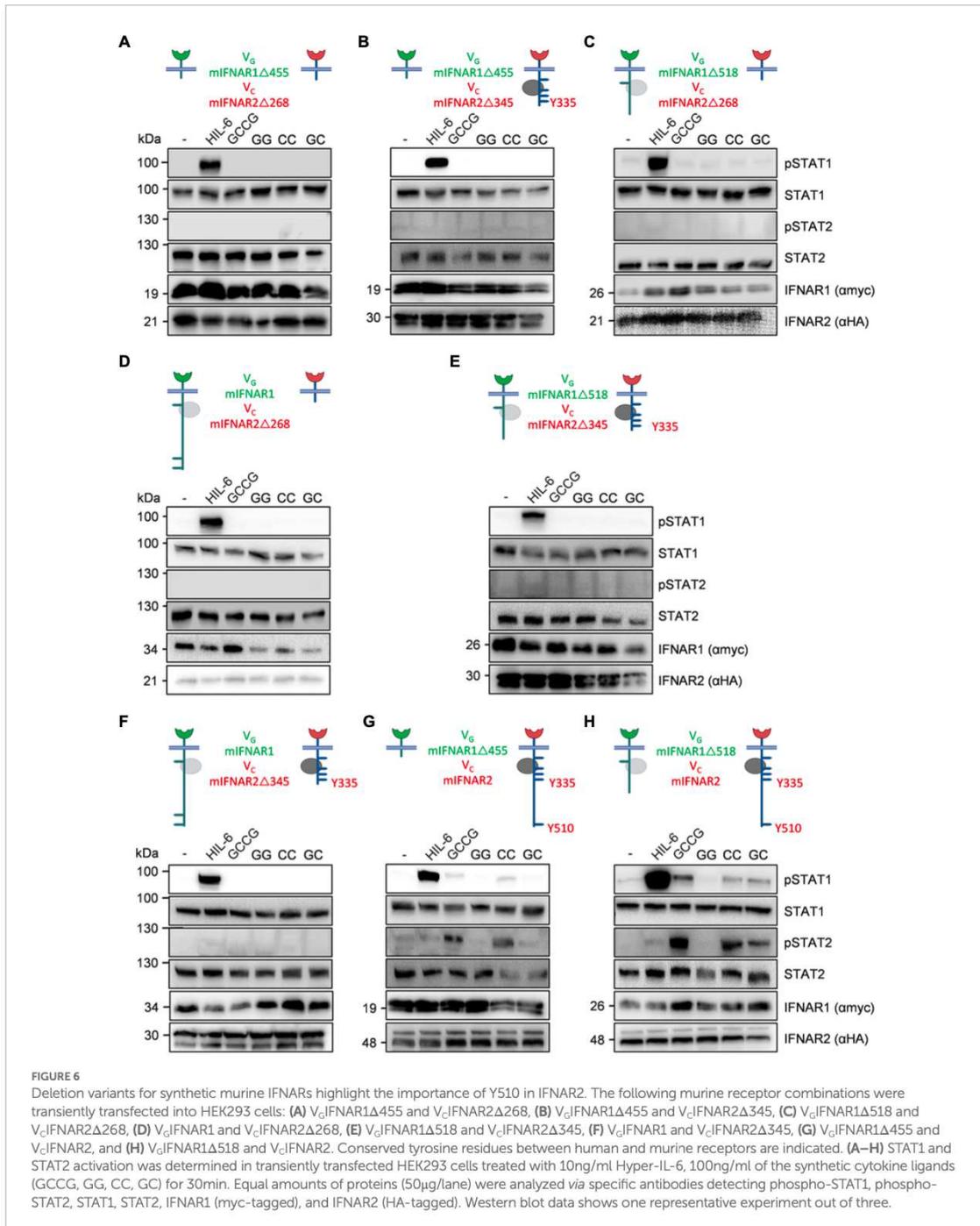
To independently define the tyrosine residues, responsible for STAT1 and STAT2 phosphorylation in type I IFN signaling, we decided to mutate Y335 and Y510 in mIFNAR2 into F335

and F510. Albeit Y335 appears not to be involved in STAT1/2 phosphorylation as suggested by IFNAR2 deletion variant V<sub>C</sub>mIFNAR2Δ345 (see **Figure 6**), we cannot exclude that the STAT binding site at Y335 might simply be disturbed by the nearby deletion at position 345. Single and double tyrosine (Y) to phenylalanine (F) mutants at position 335 and 510 of V<sub>C</sub>mIFNAR2 were combined with V<sub>C</sub>mIFNAR1Δ455 (no Tyk2 binding), V<sub>C</sub>mIFNAR1Δ518 (Tyk2 binding, lacking conserved Y518/529) or full-length V<sub>C</sub>mIFNAR1 in HEK293 cells (**Figure 7**). Stimulation of transiently transfected HEK293 cells with cDNAs coding for V<sub>C</sub>mIFNAR1Δ455 (no Tyk2 binding) and V<sub>C</sub>mIFNAR2\_Y335F, V<sub>C</sub>mIFNAR2\_Y510F or V<sub>C</sub>mIFNAR2\_Y335F\_Y510F with 100 ng/ml GCCG, GG, CC, and GC for 30 min showed that STAT1 and STAT2 phosphorylation was only detectable after homodimeric activation of V<sub>C</sub>mIFNAR2\_Y335F and V<sub>C</sub>mIFNAR2\_Y510F but not of V<sub>C</sub>mIFNAR2\_Y335F\_Y510F by GCCG and CC (**Figures 7A–C**). Next, the cDNA coding for V<sub>C</sub>mIFNAR1Δ518 (Tyk2 binding, lacking conserved Y518/529) was transiently transfected into HEK293 cells together with cDNAs coding for V<sub>C</sub>mIFNAR2\_Y335F, V<sub>C</sub>mIFNAR2\_Y510F or V<sub>C</sub>mIFNAR2\_Y335F\_Y510F and stimulated with 100 ng/ml GCCG, GG, CC, and GC for 30 min (**Figures 7D–F**). Here, heterodimeric receptor activation *via* GC and GCCG was detected for V<sub>C</sub>mIFNAR1Δ518 with V<sub>C</sub>mIFNAR2\_Y335F and V<sub>C</sub>mIFNAR2\_Y510F but not with V<sub>C</sub>mIFNAR2\_Y335F\_Y510F. The same pattern of STAT1/2 phosphorylation in HEK293 cells was seen for the combination of full length V<sub>C</sub>mIFNAR1 with V<sub>C</sub>mIFNAR2\_Y335F, V<sub>C</sub>mIFNAR2\_Y510F or V<sub>C</sub>mIFNAR2\_Y335F\_Y510F after stimulation with GCCG, GG, CC, and GC (**Figures 7G–I**). Albeit on different blots, homodimeric stimulation V<sub>C</sub>mIFNAR2\_Y335F resulted in slightly stronger STAT1/2 phosphorylation compared to V<sub>C</sub>mIFNAR2\_Y510F (compare CC stimulation of **Figures 7A,D,G** with CC stimulation of **Figures 7B,E,H**), suggesting that Y510 is more important as Y335. Taken together, our data indicated that IFNAR1 did not directly contribute to STAT1 and STAT2 phosphorylation *via* direct STAT binding sites. For IFNAR2, Y510 has a stronger impact on STAT1 and STAT2 phosphorylation as Y335, which only played a minor role.

TABLE 1 Overview about amino acid surrounding tyrosine residues.

IFNAR1		IFNAR2	
Murine	Human	Murine	Human
VWKY <sub>455</sub> LCH	CINY <sub>466</sub> VFF	RIGY <sub>268</sub> ICL	WIGY <sub>269</sub> ICL
	IDEY <sub>481</sub> FSE		EVIIY <sub>306</sub> INR
LRKY <sub>518</sub> SSQ	HKKY <sub>527</sub> SSQ	LWNY <sub>315</sub> DY <sub>317</sub> EDG	VWDY <sub>316</sub> NY <sub>318</sub> DDE
SGNY <sub>529</sub> SNE	SGNY <sub>538</sub> SNE	VTGY <sub>335</sub> TMH	GGGY <sub>337</sub> TMH
NEKY <sub>576</sub> LQS		TGPY <sub>398</sub> ERR	EEDY <sub>411</sub> SST
		GDGY <sub>510</sub> LMR	GDGY <sub>512</sub> LMR

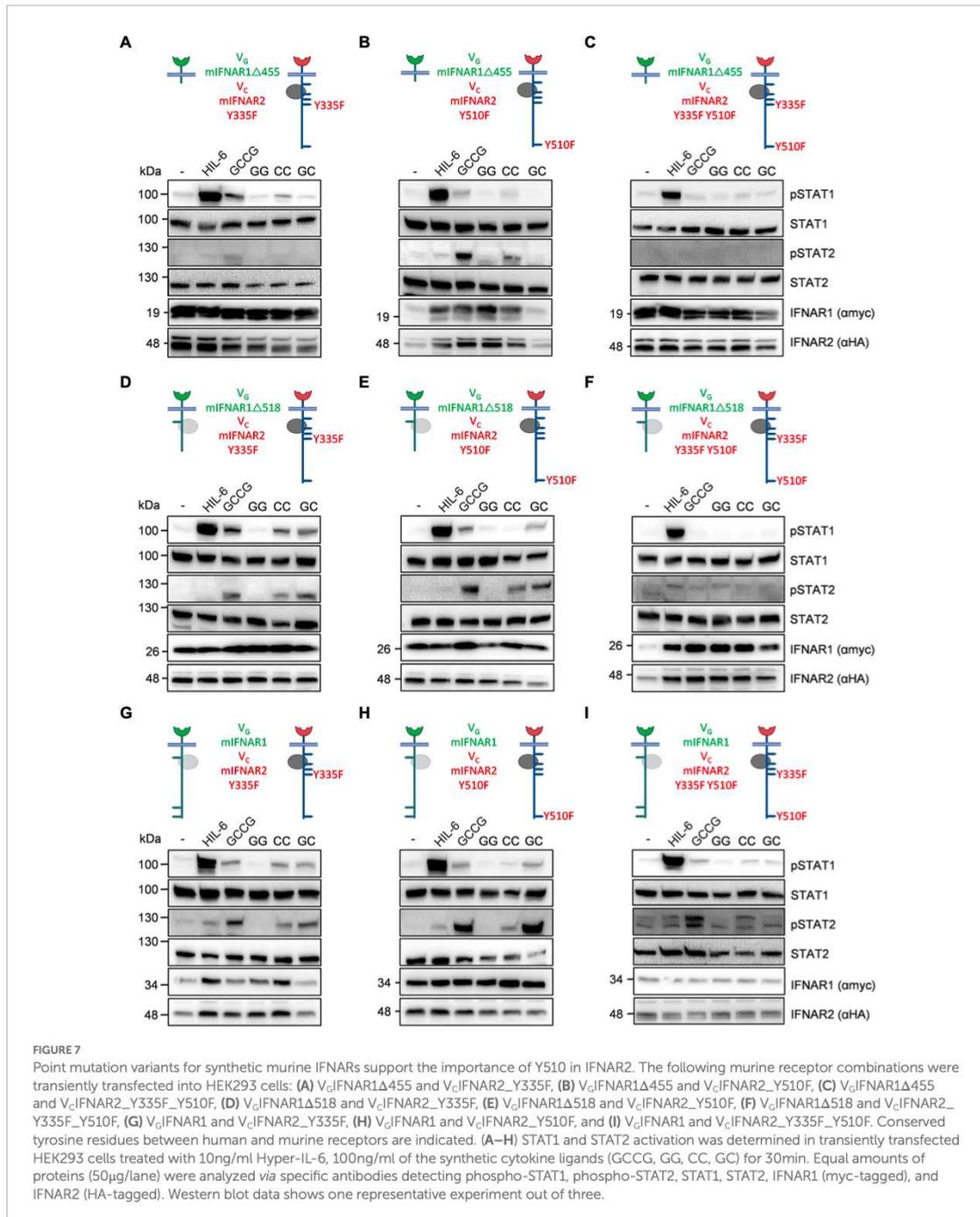
Classical SH2 domain binding sites pYxxP for STAT1, pYxxQ for STAT3, pYxxL for STAT5, pYxxF for STAT6. Tyrosine residues are highlighted in bold.



### Human IFNAR2 is critical for STAT1 and STAT2 phosphorylation

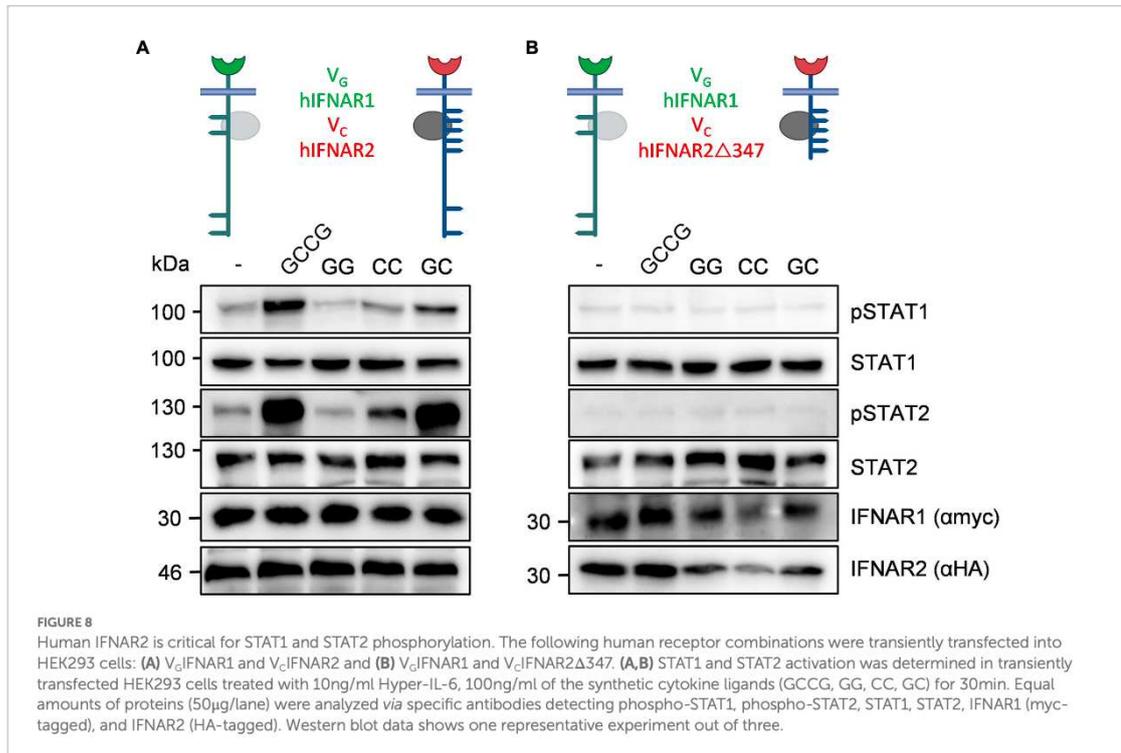
Finally, we analyzed STAT1 and STAT2 phosphorylation in the synthetic human IFNARs. cDNAs coding for  $V_{\Delta}$ hIFNAR1

and  $V_{\Delta}$ hIFNAR2 or  $V_{\Delta}$ hIFNAR2 $\Delta$ 347 were transiently transfected into HEK293 cells.  $V_{\Delta}$ hIFNAR1 $\Delta$ 347 (Jak1 binding, no Y411, Y512) is the equivalent to  $V_{\Delta}$ hIFNAR2 $\Delta$ 345 (Jak1 binding, no Y510). HEK293 cells, transfected with cDNAs coding for  $V_{\Delta}$ hIFNAR1 and  $V_{\Delta}$ hIFNAR2 showed sustained



heterodimeric IFNAR1/2 and slight homodimeric IFNAR2 receptor activation of STAT1 and STAT2 phosphorylation after stimulation with the synthetic cytokine ligands GCCG, CC and GC but not with GG (100 ng/ml; Figure 8A). HEK293 cells

expressing V<sub>c</sub>hIFNAR1 and V<sub>c</sub>hIFNAR2Δ347, however, failed to induce STAT1 and STAT2 phosphorylation after stimulation with GCCG, CC or GC, indicating that also human IFNAR2 carry the STAT1/2 binding sites, with a major involvement of



Y512 (Figure 8B). Surprisingly, Y512 which is the homologue residue to Y510 in murine IFNAR2 is not embedded in a typical STAT binding site (Puigdevall et al., 2022). We cannot, however, exclude an involvement of Y411. Alternatively, the missing STAT activation might be due to the deletion of the constitutive binding site in IFNAR2Δ347 (Shemesh et al., 2021).

## Discussion

We embedded the type I IFN receptors IFNAR1 and IFNAR2 into a fully synthetic receptor/ligand system, which was achieved by replacing the extracellular domain of the IFNARs by nanobodies directed against GFP and mCherry. To initiate synthetic type I IFN signaling, we used heteromeric GFP-mCherry fusion proteins with high specificity and affinity. Synthetic IFNARs behave like their natural counterparts with respect to Jak activation, STAT1/2 phosphorylation and transcriptomic regulation. We focused on STAT1 and STAT2 phosphorylation as read-out of synthetic IFNAR activation because these are characteristic for type I IFNs. However, we are aware that overall signal transduction of type I IFNs is much more complex (Puigdevall et al., 2022). Since we did not modify the transmembrane and intracellular domain of IFNAR1 and IFNAR2 and also performed in depth transcriptomic analysis, it is,

however, very likely that the replacement of the extracellular domains did not change signaling of the synthetic vs. natural receptors.

We used IFNα4 to compare signaling of natural IFNARs with GC-induced signaling of synthetic IFNARs. We chose IFNα4 and not IFNα2, which is the predominantly type I IFN used in the clinic (Pestka, 2007), because IFNα4 has stronger antiviral effects (Gerlach et al., 2009) and was among the IFNs with the most profound effect on CD8<sup>+</sup> T-cells, with respect to anti-proliferative effects, improved cytokine production and cytotoxicity (Dickow et al., 2019). We decided to not include additional IFN subtypes which eventually have diverse biological functions (Zwarthoff et al., 1985; Hardy et al., 2004), which might be related to different binding affinities to the two IFNAR subunits (Jaks et al., 2007; Lavoie et al., 2011) as well as their ability to activate different downstream signaling pathways (Cull et al., 2003). The induction of distinct type I IFN-stimulated gene (ISG) expression patterns for each IFNα subtype (Li et al., 2017) contribute to their individual responses (Li and Sherry, 2010; Moll et al., 2011). Since one possible application of synthetic IFNARs are reinfused cytotoxic T-cells for viral but especially tumor defense, we were interested in the similarities of IFNα4 and our synthetic IFN system. Our transcriptomic analysis showed a high (99.91%) overlap of overall gene regulation including typical ISGs for viral defense. Moreover, we showed efficient

VSV clearance in MC57 cells after stimulation of the synthetic IFNARs. Systemic application of type I IFNs in tumor therapy to enhance CD8 T-cell responses is, however, only resulting in short-term anti-tumor action because of negative effects during prolonged IFN signaling by inducing immunosuppressive factors such as PD-L1 and IL-10 (Zhou et al., 2020). Cell-type restricted type I IFN signaling using synthetic IFNs might prevent immunosuppression because these IFN actions might not be directly caused by action of type I IFNs on CD8 T-cells but by collateral cellular activation within the tumor environment.

Using our synthetic murine IFNARs, we re-evaluated the intracellular signaling with respect to STAT1/2 signaling. A previous study suggested that for murine IFNAR2, a single mutation in Y510 (the equivalent to human Y512) almost completely abolished STAT1/2 phosphorylation and biological activity, whereas a second tyrosine, Y335 (the equivalent to human Y337), plays a minor role (Zhao et al., 2008). Using deletion variants of our synthetic IFNARs, we showed that synthetic IFNAR1 did not contribute to STAT1/2 signaling directly. The main function of synthetic IFNAR1 was to facilitate Janus kinase activation, followed by synthetic IFNAR2 dependent STAT1/2 activation. Introduction of the single and double loss-of-function point mutations Y335F and Y510F in synthetic IFNAR2 and combination with full-length and deletion variants of synthetic IFNAR1 verified the major function of Y510 for STAT1/2 activation and devised a minor role to Y335. We also generated the synthetic human deletion variant IFNAR2 $\Delta$ 347 which was co-expressed with full-length synthetic human IFNAR1. In good agreement with the murine synthetic deletion equivalent IFNAR2 $\Delta$ 345, this combination of human receptors failed to induce STAT1/2 phosphorylation. In the synthetic deletion variant IFNAR2 $\Delta$ 347, the conserved tyrosine 512 and the non-conserved tyrosine 411 were deleted. Also the constitutive STAT2-binding site was deleted in synthetic IFNAR2 $\Delta$ 347, whereas Jak1 binding and activation was not affected (Shemesh et al., 2021). We decided to only test the synthetic hIFNAR2 $\Delta$ 347 deletion variant and not generate single tyrosine mutants for human IFNAR2 because it was previously shown that single mutations of each of the seven tyrosines including Y512 in human IFNAR2 did not result in any change of activity. Moreover, also simultaneous mutation of all seven tyrosines did not completely abolish STAT signaling (Shemesh et al., 2021), albeit this was not seen in another study (Wagner et al., 2002). We were more interested to confirm the important role of synthetic human IFNAR2 in STAT1/2 phosphorylation than to assign a certain tyrosine residue to STAT signaling. However, future work using our synthetic human IFNARs might contribute to unravel this controversial STAT activation pattern.

Using CC and GG synthetic ligands, we also tested the biological activity of homodimeric IFNAR1 and IFNAR2 complexes. IFNAR1 homodimeric complexes *via* Epo<sub>R</sub><sup>EC</sup>-IFNAR1<sub>ICD</sub> fusion proteins were previously shown to activate

Tyk2 but no STAT2 phosphorylation (Krishnan et al., 1996). Moreover, homodimeric Epo<sub>R</sub><sup>EC</sup>-IFNAR2<sub>ICD</sub> complexes were biologically active, albeit with lower efficacy compared to the natural receptor complex (Pattyn et al., 1999). Therefore, we expected activation of signal transduction also by homodimeric IFNAR2 but not by IFNAR1. Since intracellular tyrosine motifs for STAT binding within IFNAR1 are missing, IFNAR1 cannot directly contribute to STAT signaling. Therefore, we did not observe any STAT1/2 phosphorylation following induction of homodimeric murine and human IFNAR1 complexes. Albeit rather unlikely (Urin et al., 2019), we cannot exclude that other than STAT, p38, Akt or ERK signaling cascades might be triggered by homodimeric IFNAR1 complexes (Krishnan et al., 1996; de Weerd et al., 2013). We observed STAT1 and STAT2 phosphorylation following homodimerization of murine and human IFNAR2 in HEK293 cells which was as strong as induced by heterodimeric IFNAR2 complexes. For unknown reasons, homodimeric activation of murine and human IFNAR2 complexes was lower in murine Ba/F3-gp130 cells compared to heterodimeric IFNARs as shown by Western blotting and in inhibitory proliferation assays.

Synthetic redesign of murine and human IFNARs exemplified that synthetic IFN receptors might be of good use to unravel general IFNAR signaling because they phenocopied natural IFNAR signaling. In the case of murine IFNARs, synthetic murine IFNARs independently verified the importance of Y510 and Y335 for STAT1/2 activation in a background-free cellular environment. Here, signaling of endogenous and synthetic IFN signaling was analyzed and compared within the same cell lines, natural IFNARs were activated by type I IFNs and synthetic IFNARs by synthetic cytokine ligands. Other models rely on knock-downs or knock-outs of the natural cytokine receptors or on cells that normally do not respond to the respective cytokine at all, making site-by-site comparisons in one cell line impossible. Our synthetic system might also be useful to analyze the biologic consequences of patient-derived non-synonymous single nucleotide variants (SNVs) in IFNARs.

## Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, GSE202839.

## Author contributions

NZ, NC, FV, JD, HX, and EZ: formal analysis, validation, and investigation. DF: supervision and data curation. BK, HA-H, SM, and PL: resources. JS: visualization and funding acquisition. JS and DF: conceptualization and project administration. NZ, JS, and DF: writing—review and editing.

DF, HX, and BK: methodology. NZ and JS: writing—original draft. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Funding

This work was funded by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (RTG1949) and the Jürgen Manchot Foundation.

## Acknowledgments

We thank Yvonne Arlt for technical assistance.

## References

- Behrmann, I., Smyczek, T., Heinrich, P., Schmitz-Van de Leur, H., Komyod, W., Giese, B., et al. (2004). Janus kinase (Jak) subcellular localization revisited: the exclusive membrane localization of endogenous Janus kinase 1 by cytokine receptor interaction uncovers the Jak.Receptor complex to be equivalent to a receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 279, 35486–35493. doi: 10.1074/jbc.M404202200
- Chalaris, A., Rabe, B., Paliga, K., Lange, H., Laskay, T., Fielding, C. A., et al. (2007). Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood* 110, 1748–1755. doi: 10.1182/blood-2007-01-067918
- Colamonici, O., Yan, H., Domanski, P., Handa, R., Smalley, D., Mullersman, J., et al. (1994). Direct binding to and tyrosine phosphorylation of the alpha subunit of the type I interferon receptor by p135tyk2 tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 14, 8133–8142. PMID: 7526154
- Croxford, A. L., Mair, F., and Becher, B. (2012). IL-23: one cytokine in control of autoimmunity. *Eur. J. Immunol.* 42, 2263–2273. doi: 10.1002/eji.201242598
- Cull, V., Tilbrook, P., Bartlett, E., Brekalo, N., and James, C. (2003). Type I interferon differential therapy for erythroleukemia: specificity of STAT activation. *Blood* 101, 2727–2735. doi: 10.1182/blood-2002-05-1521
- Dagenais-Lussier, X., Loucif, H., Murira, A., Laulhe, X., Stager, S., Lamarre, A., et al. (2017). Sustained IFN-I expression during established persistent viral infection: a “bad seed” for protective immunity. *Viruses* 10:12. doi: 10.3390/v10010012
- de Weerd, N., Vivian, J., Nguyen, T., Mangan, N., Gould, J., Braniff, S., et al. (2013). Structural basis of a unique interferon- $\beta$  signaling axis mediated via the receptor IFNAR1. *Nat. Immunol.* 14, 901–907. doi: 10.1038/ni.2667
- Degertekin, B., and Lok, A. S. (2009). Update on viral hepatitis: 2008. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 25, 180–185. doi: 10.1097/MOG.0b013e328324f478
- Dickow, J., Francois, S., Kaiserling, R., Malysheva, A., Drexler, I., Westendorf, A., et al. (2019). Diverse immunomodulatory effects of individual IFN $\alpha$  subtypes on virus-specific CD8 + T cell responses. *Front. Immunol.* 10:2255. doi: 10.3389/fimmu.2019.02255
- Duncan, C. J., Mohamad, S. M., Young, D. F., Skelton, A. J., Leahy, T. R., Munday, D. C., et al. (2015). Human IFNAR2 deficiency: lessons for antiviral immunity. *Sci. Transl. Med.* 7:307ra154. doi: 10.1126/scitranslmed.aac4227
- Edelheit, O., Hanukoglu, A., and Hanukoglu, I. (2009). Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnol.* 9:61. doi: 10.1186/1472-6750-9-61
- Engelowski, E., Schneider, A., Franke, M., Xu, H., Clemen, R., Lang, A., et al. (2018). Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands. *Nat. Commun.* 9:2034. doi: 10.1038/s41467-018-04454-8
- Fang, J., Qian, J., Yi, S., Harding, T., Tu, G., VanRoey, M., et al. (2005). Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nat. Biotechnol.* 23, 584–590. doi: 10.1038/nbt1087
- Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J. P., Kallen, K. J., Wollmer, A., et al. (1997). A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat. Biotechnol.* 15, 142–145. doi: 10.1038/nbt0297-142
- Floss, D. M., Mrotzek, S., Klöcker, T., Schröder, J., Grözinger, J., Rose-John, S., et al. (2013). Identification of canonical tyrosine-dependent and non-canonical

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor. *J. Biol. Chem.* 288, 19386–19400. doi: 10.1074/jbc.M112.432153

Fridy, P. C., Li, Y., Keegan, S., Thompson, M. K., Nudelman, I., Scheid, J. F., et al. (2014). A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires. *Nat. Methods* 11, 1253–1260. doi: 10.1038/nmeth.3170

Gerlach, N., Gibbert, K., Alter, C., Nair, S., Zelinskyy, G., James, C., et al. (2009). Anti-retroviral effects of type I IFN subtypes in vivo. *Eur. J. Immunol.* 39, 136–146. doi: 10.1002/eji.200838311

Hardy, M., Owczarek, C., Jermini, L., Ejdebäck, M., and Hertzog, P. (2004). Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics* 84, 331–345. doi: 10.1016/j.ygeno.2004.03.003

Hardy, G. A., Sieg, S., Rodriguez, B., Anthony, D., Asaad, R., Jiang, W., et al. (2013). Interferon- $\alpha$  is the primary plasma type-I IFN in HIV-1 infection and correlates with immune activation and disease markers. *PLoS One* 8:e56527. doi: 10.1371/journal.pone.0056527

Hernandez, N., Bucciol, G., Moens, L., Le Pen, J., Shahrooie, M., Goudouris, E., et al. (2019). Inherited IFNAR1 deficiency in otherwise healthy patients with adverse reaction to measles and yellow fever live vaccines. *J. Exp. Med.* 216, 2057–2070. doi: 10.1084/jem.20182295

Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 147, 258–267. doi: 10.1098/rspb.1957.0048

Isaacs, A., Lindenmann, J., and Valentine, R. C. (1957). Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 147, 268–273. doi: 10.1098/rspb.1957.0049

Jaks, E., Gavutis, M., Uzé, G., Martal, J., and Pihler, J. (2007). Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation. *J. Mol. Biol.* 366, 525–539. doi: 10.1016/j.jmb.2006.11.053

Jaster, R., Tschirch, E., Bittorf, T., and Brock, J. (1999). Interferon- $\alpha$  inhibits proliferation of Ba/F3 cells by interfering with interleukin-3 action. *Cell. Signal.* 11, 769–775. doi: 10.1016/S0898-6568(99)00050-9

Jaster, R., Zhu, Y., Pless, M., Bhattacharya, S., Mathey-Prevot, B., and D'Andrea, A. (1997). JAK2 is required for induction of the murine DUB-1 gene. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3364–3372. doi: 10.1128/MCB.17.6.3364

Ketteler, R., Glaser, S., Sandra, O., Martens, U., and Klingmüller, U. (2002). Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther.* 9, 477–487. doi: 10.1038/sj.gt.3301653

Krishnan, K., Yan, H., Lim, J., and Krolewski, J. (1996). Dimerization of a chimeric CD4-interferon- $\alpha$  receptor reconstitutes the signaling events preceding STAT phosphorylation. *Oncogene* 13, 125–133. PMID: 8700538

Lang, P. A., Cervantes-Barragan, L., Verschoor, A., Navarini, A. A., Recher, M., Pellegrini, M., et al. (2009). Hematopoietic cell-derived interferon controls viral replication and virus-induced disease. *Blood* 113, 1045–1052. doi: 10.1182/blood-2007-10-117861

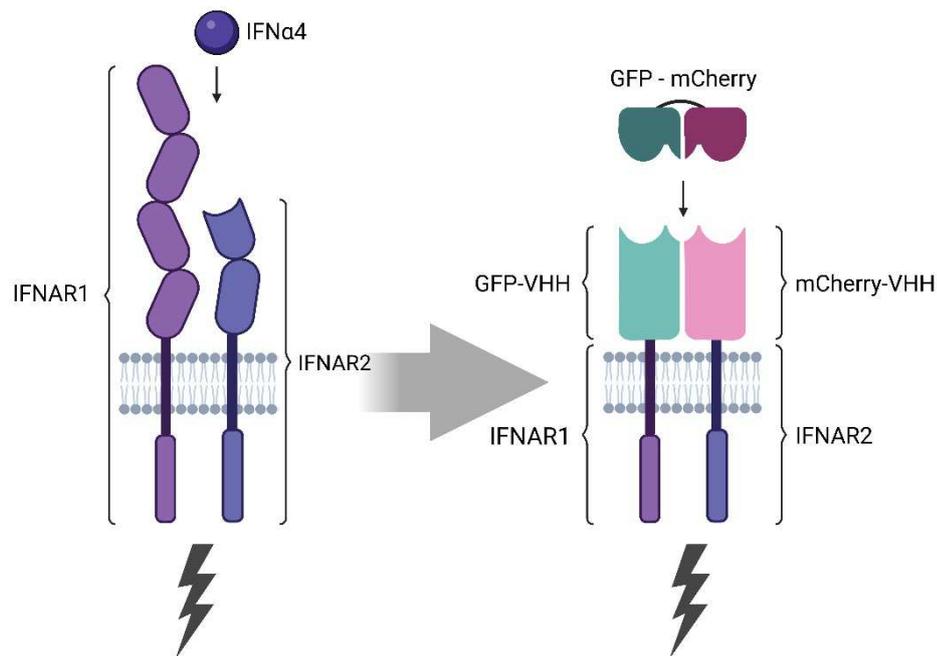
Lavoie, T., Kalie, E., Crisafulli-Cabatu, S., Abramovich, R., DiGioia, G., Moolchan, K., et al. (2011). Binding and activity of all human alpha interferon subtypes. *Cytokine* 56, 282–289. doi: 10.1016/j.cyto.2011.07.019

- Lazear, H. M., Schoggins, J. W., and Diamond, M. S. (2019). Shared and distinct functions of type I and type III Interferons. *Immunity* 50, 907–923. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.025
- Li, X., Leung, S., Kerr, I., and Stark, G. (1997). Functional subdomains of STAT2 required for preassociation with the alpha interferon receptor and for signaling. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2048–2056. doi: 10.1128/MCB.17.4.2048
- Li, L., and Sherry, B. (2010). IFN- $\alpha$  expression and antiviral effects are subtype and cell type specific in the cardiac response to viral infection. *Virology* 396, 59–68. doi: 10.1016/j.virol.2009.10.013
- Li, Y., Sun, B., Esser, S., Jessen, H., Streeck, H., Widera, M., et al. (2017). Expression pattern of individual IFNA subtypes in chronic HIV infection. *J. Interferon Cytokine Res.* 37, 541–549. doi: 10.1089/jir.2017.0076
- Lutfalla, G., Holland, S., Cinato, E., Monneron, D., Reboul, J., Rogers, N., et al. (1995). 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 J.* 14, 5100–5108. doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00192.x
- Mesev, E. V., LeDesma, R. A., and Ploss, A. (2019). Decoding type I and III interferon signalling during viral infection. *Nat. Microbiol.* 4, 914–924. doi: 10.1038/s41564-019-0421-x
- Moll, H., Maier, T., Zommer, A., Lavoie, T., and Brostjan, C. (2011). The differential activity of interferon-alpha subtypes is consistent among distinct target genes and cell types. *Cytokine* 53, 52–59. doi: 10.1016/j.cyt.2010.09.006
- Morris, R., Kershaw, N., and Babon, J. (2018). The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. *Protein Sci.* 27, 1984–2009. doi: 10.1002/pro.3519
- Mossner, S., Floss, D., and Scheller, J. (2021). Pro- and anti-apoptotic fate decisions induced by di- and trimeric synthetic cytokine receptors. *iScience* 24:102471. doi: 10.1016/j.isci.2021.102471
- Mossner, S., Kuchner, M., Fazel Modares, N., Knebel, B., Al-Hasani, H., Floss, D., et al. (2020). 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. *J. Biol. Chem.* 295, 12378–12397. doi: 10.1074/jbc.RA120.013927
- Mossner, S., Phan, H., Triller, S., Moll, J., Conrad, U., and Scheller, J. (2020). Multimerization strategies for efficient production and purification of highly active synthetic cytokine receptor ligands. *PLoS One* 15:e0230804. doi: 10.1371/journal.pone.0230804
- Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M., et al. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264, 1918–1921. doi: 10.1126/science.8009221
- Nguyen, V., Saleh, A., Arch, A., Yan, H., Piazza, F., Kim, J., et al. (2002). Stat2 binding to the interferon-alpha receptor 2 subunit is not required for interferon-alpha signaling. *J. Biol. Chem.* 277, 9713–9721. doi: 10.1074/jbc.M111161200
- Novick, D., Cohen, B., and Rubinstein, M. (1994). The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 77, 391–400. doi: 10.1016/0092-8674(94)90154-6
- Pattyn, E., Van Ostade, X., Schauvliege, L., Verhee, A., Kalai, M., Vandekerckhove, J., et al. (1999). Dimerization of the interferon type I receptor IFNAR2–2 is sufficient for induction of interferon effector genes but not for full antiviral activity. *J. Biol. Chem.* 274, 34838–34845. doi: 10.1074/jbc.274.49.34838
- Pestka, S. (2007). The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J. Biol. Chem.* 282, 20047–20051. doi: 10.1074/jbc.R700004200
- Platanias, L. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 375–386. doi: 10.1038/nri1604
- Puigdevall, L., Michiels, C., Stewardson, C., and Dumoutier, L. (2022). JAK/STAT: why choose a classical or an alternative pathway when you can have both? *J. Cell. Mol. Med.* 26, 1865–1875. doi: 10.1111/jcmm.17168
- Rossotti, M., Bélanger, K., Henry, K., and Tanha, J. (2022). Immunogenicity and humanization of single-domain antibodies. *FEBS J.* 289, 4304–4327. doi: 10.1111/febs.15809
- Rothbauer, U., Zolghadr, K., Muylderms, S., Schepers, A., Cardoso, M. C., and Leonhardt, H. (2008). A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 282–289. doi: 10.1074/mcp.M700342-MCP200
- Saleh, A., Nguyen, V., and Krolewski, J. (2002). Affinity of Stat2 for the subunits of the interferon alpha receptor. *Biochemistry* 41, 11261–11268. doi: 10.1021/bi025913f
- Scheller, J., Engelowski, E., Moll, J., and Floss, D. (2019). Immunoreceptor engineering and synthetic cytokine signaling for therapeutics. *Trends Immunol.* 40, 258–272. doi: 10.1016/j.it.2019.01.001
- Shemesh, M., Lochte, S., Piehler, J., and Schreiber, G. (2021). IFNAR1 and IFNAR2 play distinct roles in initiating type I interferon-induced JAK-STAT signaling and activating STATs. *Sci. Signal.* 14:eabe4627. doi: 10.1126/scisignal.abe4627
- Si, W., Li, C., and Wei, P. (2018). Synthetic immunology: T-cell engineering and adoptive immunotherapy. *Synth. Syst. Biotechnol.* 3, 179–185. doi: 10.1016/j.synbio.2018.08.001
- Teijaro, J. R., Ng, C., Lee, A. M., Sullivan, B. M., Sheehan, K. C., Welch, M., et al. (2013). Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science* 340, 207–211. doi: 10.1126/science.1235214
- Urin, V., Shemesh, M., and Schreiber, G. (2019). CRISPR/Cas9-based knockout strategy elucidates components essential for type I interferon signaling in human HeLa cells. *J. Mol. Biol.* 431, 3324–3338. doi: 10.1016/j.jmb.2019.06.007
- Uzé, G., Lutfalla, G., and Gresser, I. (1990). Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. *Cell* 60, 225–234. doi: 10.1016/0092-8674(90)90738-Z
- Wagner, T., Velichko, S., Vogel, D., Rani, M., Leung, S., Ransohoff, R., et al. (2002). Interferon signaling is dependent on specific tyrosines located within the intracellular domain of IFNAR2c. *J. Biol. Chem.* 277, 1493–1499. doi: 10.1074/jbc.M108928200
- Wallweber, H., Tam, C., Franke, Y., Starovasnik, M., and Lupardus, P. (2014). Structural basis of recognition of interferon- $\alpha$  receptor by tyrosine kinase 2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 443–448. doi: 10.1038/nsmb.2807
- Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., et al. (2009). Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med. Microbiol. Immunol.* 198, 157–174. doi: 10.1007/s00430-009-0116-7
- Wilson, E. B., Yamada, D. H., Elsaesser, H., Herskovitz, J., Deng, J., Cheng, G., et al. (2013). Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* 340, 202–207. doi: 10.1126/science.1235208
- Xu, H., Grusdat, M., Pandya, A., Polz, R., Huang, J., Sharma, P., et al. (2014). Type I interferon protects antiviral CD8+ T cells from NK cell cytotoxicity. *Immunity* 40, 949–960. doi: 10.1016/j.immuni.2014.05.004
- Xu, H., Huang, J., Pandya, A., Lang, E., Zhuang, Y., Thöns, C., et al. (2017). Lymphocytes negatively regulate NK cell activity via Qa-1b following viral infection. *Cell Rep.* 21, 2528–2540. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.001
- Yan, H., Krishnan, K., Lim, J., Contillo, L., and Krolewski, J. (1996). Molecular characterization of an alpha interferon receptor 1 subunit (IFNAR1) domain required for TYK2 binding and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2074–2082. doi: 10.1128/MCB.16.5.2074
- Zhang, Q., Bastard, P., Liu, Z., Le Pen, J., Moncada-Velez, M., Chen, J., et al. (2020). Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 370:abd4570. doi: 10.1126/science.abd4570
- Zhao, W., Lee, C., Piganis, R., Plumlee, C., de Weerd, N., Hertzog, P., et al. (2008). A conserved IFN- $\alpha$  receptor tyrosine motif directs the biological response to type I IFNs. *J. Immunol.* 180, 5483–5489. doi: 10.4049/jimmunol.180.8.5483
- Zhou, L., Zhang, Y., Wang, Y., Zhang, M., Sun, W., Dai, T., et al. (2020). A dual role of type I Interferons in antitumor immunity. *Adv. Biosyst.* 4:e1900237. doi: 10.1002/abdi.201900237
- Zwarthoff, E., Mooren, A., and Trapman, J. (1985). Organization, structure and expression of murine interferon alpha genes. *Nucleic Acids Res.* 13, 791–804. doi: 10.1093/nar/13.3.791

### 3 Diskussion

#### 3.1 Synthetische Interferon- $\alpha$ Rezeptoren sind funktionell aktiv

Die Rezeptoren für Typ 1 Interferone, IFNAR1 und IFNAR2, wurden analog zu den Arbeiten von Engelowski und Mossner in ein voll synthetisches Rezeptor-Liganden-System eingebettet (Engelowski *et al.*, 2018; Mossner *et al.*, 2021; Mossner *et al.*, 2020; Zoellner *et al.*, 2022). Die extrazellulären Domänen der IFNARs wurden hierbei durch *nanobodies* ersetzt, die spezifisch und mit hoher Affinität GFP oder mCherry binden. Durch die Stimulation der so entstandenen synthetischen Zytokinrezeptoren (SyCyRs) mit heteromeren GFP-mCherry-Fusionsmolekülen (GC) konnte die synthetische Typ I IFN-Signaltransduktion initiiert und anschließend analysiert werden (siehe Abb. 5). Synthetische IFNARs verhalten sich hierbei, wie ihre natürlichen Gegenstücke, in Bezug auf die Aktivierung der Januskinasen, Phosphorylierung von STAT1/2 und Regulation des Transkriptoms (De Vos und Zimmer, unveröffentlichte Dissertationen; Zoellner *et al.*, 2022).



**Abb. 5: SyCyRs des mIFNAR sind funktionell aktiv.** Die extrazellulären Domänen des murinen Interferon- $\alpha$  Rezeptors (IFNAR) wurden durch *nanobodies* (VHH) ersetzt, die spezifisch *green fluorescent protein* (GFP) und mCherry binden. Die transmembranären und intrazellulären Rezeptordomänen bleiben erhalten, sodass die synthetischen Untereinheiten  $V_G$ mIFNAR1 und  $V_C$ mIFNAR2 entstehen, durch Stimulation mit synthetischen GFP-mCherry Fusionsproteinen wird die Signaltransduktion initiiert. Abbildung angelehnt an Mossner *et al.* (2020) und erstellt mit BioRender.com.

Die STAT1- und STAT2-Phosphorylierung wurde als Beurteilungskriterium bei der Rezeptoraktivierung ausgewählt, da diese charakteristisch für die Signalkaskade der

IFNARs ist. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass sich die Signaltransduktion der Typ I Interferone insgesamt noch viel komplexer darstellt (Puigdevall *et al.*, 2022). So kann nicht ausgeschlossen werden, dass der synthetische IFNAR, durch den Austausch der extrazellulären Domänen (ECD) und die Fusion mit den *nanobodies*, in der Signalkaskade vom natürlichen Typ I Interferonrezeptor abweicht. Um dies zu untersuchen wurde eine Analyse des Transkriptoms der synthetischen Rezeptoren durchgeführt, welche vergleichbare Ergebnisse zum natürlichen IFNAR lieferte (De Vos, unveröffentlichte Dissertation; Zoellner *et al.*, 2022). Diese Ergebnisse, zusammen mit der Tatsache, dass die transmembranen (TMD) und intrazellulären Domänen (ICD) von IFNAR1 und IFNAR2 bei der Klonierung der SyCyRs nicht verändert wurden, legen nahe, dass sich mit hoher Wahrscheinlichkeit die Signaltransduktion des SyCyR gegenüber dem natürlichen Rezeptor nicht maßgeblich verändert hat (Engelowski *et al.*, 2018).

Für den Vergleich zwischen der Signaltransduktion des natürlichen IFNARs und der von GC-aktivierten synthetischen IFNARs wurde IFN $\alpha$ 4 herangezogen. Im Gegensatz zu IFN $\alpha$ 2, welches hauptsächlich in der Klinik genutzt wird (Pestka, 2007), hat IFN $\alpha$ 4 stärkere antivirale Eigenschaften (Gerlach *et al.*, 2009). Zudem gehört es zu den Typ I Interferonen mit stark ausgeprägtem Effekt auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen, in Bezug auf anti-proliferative Eigenschaften, verbesserte Zytokinproduktion und Zytotoxizität (Dickow *et al.*, 2019). Obwohl andere IFN $\alpha$  Subtypen eventuell verschiedene biologische Funktionen aufweisen (Hardy *et al.*, 2004; Zwarthoff *et al.*, 1985), beispielsweise durch andere Bindungsaffinitäten zu den Rezeptoreinheiten (Jaks *et al.*, 2007; Lavoie *et al.*, 2011) oder ihrer Fähigkeit andere Signalkaskaden anzustoßen (Cull *et al.*, 2003), wurde aufgrund zeitlicher Limitationen darauf verzichtet, diese in die Arbeit mit einzubeziehen. Vielmehr sollte zuerst die prinzipielle Vergleichbarkeit von natürlichen und synthetischen IFNARs aufgezeigt und sich anschließend auf die möglichst unabhängige funktionelle Untersuchung der ICDs fokussiert werden.

### **3.2 SyCyRs imitieren die IFN $\alpha$ 4 induzierte Signaltransduktion des IFNAR**

Die Aktivierung von bestimmten Typ I ISG-Expressionsmustern für jeden IFN $\alpha$  Subtyp (Li *et al.*, 2017), führt zu deren individueller Rezeptorantwort (Jaks *et al.*, 2007; Li & Sherry, 2010; Moll *et al.*, 2011). Wie bereits beschrieben, steigert IFN $\alpha$ 4 unter anderem die Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Dickow *et al.*, 2019) und da eine mögliche Anwendung der synthetischen IFNARs die Re-Infusion zytotoxischer T-Zellen für die virale Abwehr, aber besonders bei der Tumorbekämpfung darstellt, sollten die

Ähnlichkeiten zwischen der IFN $\alpha$ 4 induzierten Signaltransduktion und dem synthetischen IFN-Typ I-System untersucht werden.

Um sicher zu gehen, dass die Signaltransduktion von mIFNAR und SyCyR weiterhin in Abhängigkeit von TYK2 und JAK1 steht, wurde initial eine Stimulationsreihe in Kinase-defizienten Zellen durchgeführt. Diese Abhängigkeit für TYK2 und JAK1 konnte sowohl für den murinen natürlichen IFNAR als auch den synthetischen mIFNAR bestätigt werden, da jeweils nur eine STAT1 Aktivierung in JAK2-defizienten  $\gamma$ 2A-Zellen und nicht in JAK1-defizienten U4A oder TYK2-defizienten U1A Zellen gesehen werden konnte (De Vos, unveröffentlichte Dissertation; Zoellner *et al.*, 2022). Anschließend wurde in zellkulturbasierten Verfahren die Signaltransduktion des natürlichen murinen IFNAR mit den SyCyRs des murinen und des humanen IFNAR verglichen. Der natürliche mIFNAR wurde hierbei mit IFN $\alpha$ 4 stimuliert, während für die Stimulation der SyCyRs jeweils synthetische GFP-mCherry-Fusionsproteine verwendet wurden. Besonderer Fokus lag hierbei auf der Aktivierung von STAT1 und STAT2. Die Analyse im Western Blot zeigte eine vergleichbare Rezeptorantwort der beiden SyCyRs nach Stimulation mit GC, zu der des natürlichen mIFNARs auf IFN $\alpha$ 4. Dies lässt darauf schließen, dass die SyCyRs die Signaltransduktion des natürlichen Rezeptors maßgeblich phänokopieren (De Vos, unveröffentlichte Dissertation; Zoellner *et al.*, 2022). Eine anschließende Analyse des Transkriptoms zeigte zudem eine hohe (99,91%) Überlagerung der allgemeinen Genregulierung, inklusive typischer *interferon stimulated genes* (ISGs) für virale Abwehrmechanismen (De Vos, unveröffentlichte Dissertation; Zoellner *et al.*, 2022). Des Weiteren konnte eine effiziente *VSV-clearance* in MC57 Zellen nach Stimulation der synthetischen IFNARs nachgewiesen werden (Zoellner *et al.*, 2022).

Das hier etablierte SyCyR-System für den Typ I Interferonrezeptor scheint demnach in der Lage zu sein, die Signaltransduktion des mIFNAR zu phänokopieren, Genregulation und Transkription mIFNAR-typischer ISGs zu induzieren sowie bei viraler Infektion aktiv gegen den Virus vorzugehen (De Vos, unveröffentlichte Dissertation; Zoellner *et al.*, 2022).

### **3.3 IFNAR2 ist essenziell für die STAT1/2-Aktivierung der Typ I Interferone**

Unter Nutzung der synthetischen murinen IFNARs wurde die intrazelluläre Signaltransduktion, in Bezug auf die Aktivierung von STAT1 und STAT2, untersucht. Die Studienlage ist diesbezüglich noch uneindeutig, so wurde eine STAT2-Bindestelle im mIFNAR1 bei Y455 gezeigt (Yan *et al.*, 1996), welche jedoch in einer späteren Studie nicht bestätigt werden konnte (Zhao *et al.*, 2008). Auch im mIFNAR2 konnte bisher keine eindeutige STAT-Bindestelle definiert werden und die Rolle der einzelnen Tyrosine blieb

## DISKUSSION

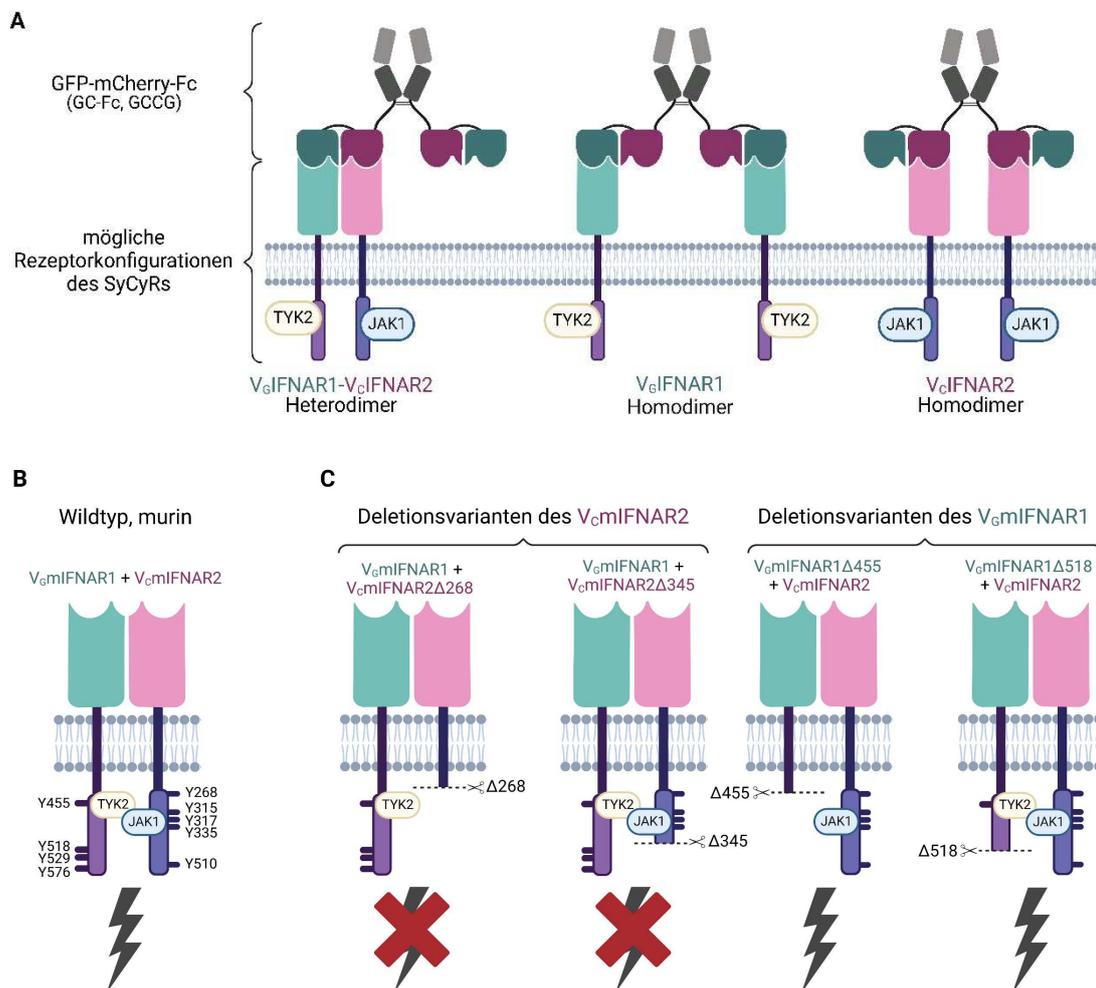
ungewiss (Nadeau *et al.*, 1999; Russell-Harde *et al.*, 2000; Shemesh *et al.*, 2021; Wagner *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2008). Neuere Daten wiesen hier auf eine ausgedehnte, segmentierte konstitutive STAT2-Bindestelle hin, deren Phosphorylierung nicht wie bisher vermutet die Bindung, sondern die Dissoziation von STAT2 nach deren Phosphorylierung zur Folge haben könnte. Von den Autoren wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich die ICD des mIFNAR2 um das STAT2-Molekül windet und an mehreren Stellen Interaktionspunkte mit STAT2 bildet (Shemesh *et al.*, 2021). Dies könnte erklären, weshalb bisher keine eindeutig strukturierte und konservierte Bindestelle gefunden wurde. Eine Validierung des Modells steht jedoch noch aus und die Ausdehnung und Lokalisation dieser möglichen konstitutiven Bindestelle wurde noch nicht genauer definiert (Shemesh *et al.*, 2021). In einer weiteren Arbeit wurde dagegen die These aufgestellt, dass für den murinen IFNAR2 bei einer Einzelmutation des Y510 (äquivalent zum humanen Y512) die STAT1/2 Phosphorylierung und die biologische Aktivität beinahe komplett ausbliebe, während ein zweites Tyrosin, Y335 (äquivalent zum humanen Y337), eine untergeordnete Rolle spiele (Zhao *et al.*, 2008).

Bisher wurde die Diskussion und Interpretation der verschiedenen Ergebnisse durch die physiologische Anwesenheit von IFNARs auf nahezu allen Zellen stark erschwert (Lazear *et al.*, 2019). Untersuchungen wurden hierdurch auf Zelllinien anderer Spezies, oder *knock-out*, bzw. *knock-down* von Genen in Zellen limitiert. In diesen Modellen können Kreuzaktivität über Speziesgrenzen hinweg oder unerwartete Änderungen im Proteom durch den *knock-out* nicht sicher ausgeschlossen werden. Da SyCyRs durch die Interaktion von *nanobodies* mit synthetischen Liganden stimuliert werden, ermöglichen sie eine isolierte Analyse der Signaltransduktion, unabhängig der zelllinienspezifischen Oberflächenrezeptoren (Engelowski *et al.*, 2018). Zuvor war es nur schwer möglich, murine und humane Rezeptoren in der gleichen Zelllinie vergleichend zu untersuchen, weshalb die Interpretation der Stimulationen immer durch den unterschiedlichen Versuchsaufbau erschwert wurde.

Mit Deletionsvarianten des synthetischen IFNAR-Systems konnte gezeigt werden, dass sowohl der humane synthetische IFNAR1 (V<sub>G</sub>hIFNAR1), als auch der murine (V<sub>G</sub>mIFNAR1) nicht direkt an der STAT1/2 vermittelten Signaltransduktion beteiligt sind (siehe Abb. 6). Die Hauptfunktion von synthetischem IFNAR1 ist demnach die Beteiligung an der Assoziation und Aktivierung der Januskinasen, gefolgt von der IFNAR2-abhängigen STAT1/2 Aktivierung (Zoellner *et al.*, 2022). Dies steht im Einklang mit aktuellen Ergebnissen (Shemesh *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2008), weshalb es als eher unwahrscheinlich anzusehen ist, dass wie ehemals angenommen (Nadeau *et al.*, 1999) auch die Tyrosine Y466 und Y481 im hIFNAR1 (oder das murine Analogon Y455 im mIFNAR1) maßgeblich an der STAT-Bindung und Aktivierung beteiligt sind. Zur Validierung der Ergebnisse wurde die synthetische humane Deletionsvariante

## DISKUSSION

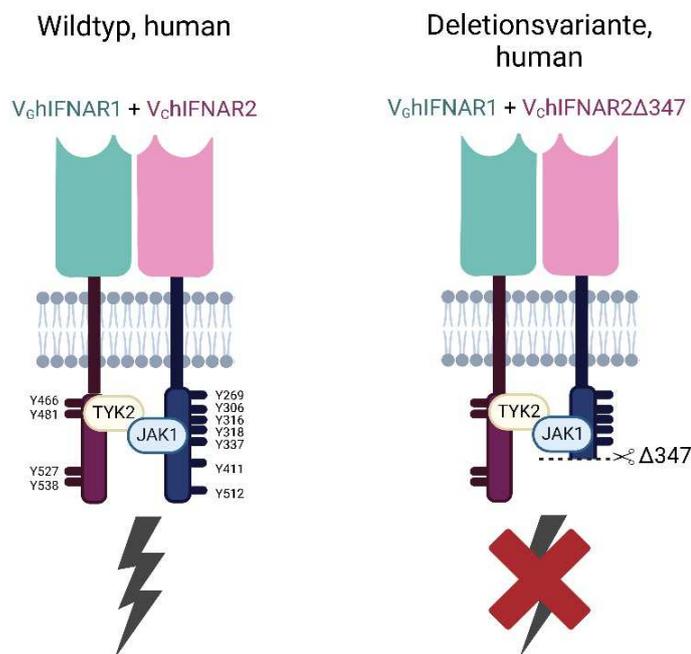
$V_C$ IFNAR2 $\Delta$ 347 kloniert und mit dem synthetischen humanen IFNAR1 ( $V_G$ hIFNAR1) co-exprimiert. Diese Kombination des humanen Rezeptors war, ebenso wie das murine Äquivalent,  $V_C$ mIFNAR2 $\Delta$ 345, nicht in der Lage, die STAT1/2 Phosphorylierung zu induzieren (siehe Abb. 7; Zoellner *et al.*, 2022). Bei  $V_C$ hIFNAR2 $\Delta$ 347 sind das konservierte Tyrosin Y512 und das nicht-konservierte Tyrosin Y411 nicht mehr vorhanden. Falls tatsächlich eine segmentierte konstitutive STAT2-Bindestelle existiert, die sich um das STAT2-Molekül windet und mit diesem verschiedene Interaktionspunkte aufweist (Shemesh *et al.*, 2021), so wird diese mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls durch die Deletion beeinträchtigt, oder sogar ganz eliminiert worden sein. Die Bindung und Aktivierung von JAK1 war dagegen nicht beeinträchtigt (Zoellner *et al.*, 2022).



**Abb. 6: Deletionen im mIFNAR2 verhindern die Signaltransduktion.** **A)** Das GFP-mCherry-Fusionsprotein (GC-Fc oder GCCG) besteht aus *green fluorescent protein* (GFP, G), mCherry (C) und dem Fc-Teil eines Antikörpers (*crystallizable fragment*). Durch Stimulation der *synthetic cytokine receptors* (SyCyRs) des Interferon- $\alpha$  Rezeptors (IFNAR,  $V_G$ IFNAR1 und  $V_C$ IFNAR2) können sowohl Heterodimere als auch Homodimere gebildet werden. **B)** Der synthetische mIFNAR induziert auf Stimulation mit GC-Fc die STAT1/2-Aktivierung; die Tyrosine (Y) der intrazellulären Domänen (ICD) sind eingezeichnet. **C)** Nur Deletionsvarianten des  $V_G$ mIFNAR1 können auf GC-Fc Stimulation weiterhin STAT1/2 aktivieren, demnach ist  $V_G$ mIFNAR1 an der Signaltransduktion nicht maßgeblich beteiligt. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

### 3.4 Y510 des IFNAR2 scheint bei der STAT1/2-Aktivierung wichtiger zu sein als Y335

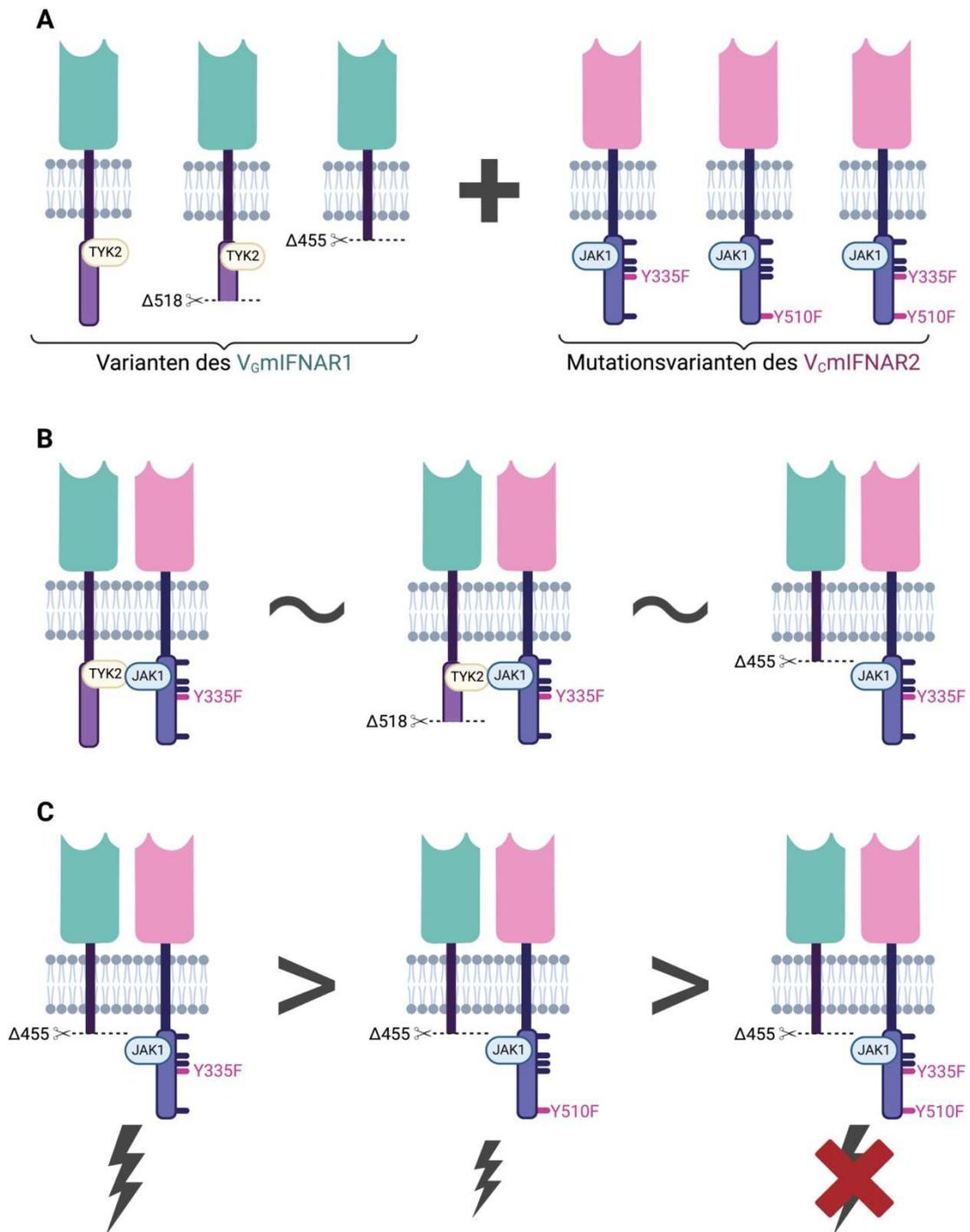
Des Weiteren wurden Einzel- und Doppel-Punktmutationen von Y510 und Y335 im  $V_{cm}IFNAR2$  eingeführt. Durch die Kombination der mutierten  $V_{cm}IFNAR2$  ( $V_{cm}IFNAR2$ -Y510F,  $V_{cm}IFNAR2$ -Y335F und  $V_{cm}IFNAR2$ -Y335F-Y510F) mit  $V_{Gm}IFNAR1$ , bzw. mit  $V_{Gm}IFNAR1$ -Deletionsvarianten ( $V_{Gm}IFNAR1\Delta455$  und  $V_{Gm}IFNAR1\Delta518$ ), konnte die größere Funktion von Y510 für die STAT1/2 Aktivierung verifiziert und Y335 eine geringere Wichtigkeit zugeordnet werden (zusammengefasst in Abb. 8; Zhao *et al.*, 2008; Zoellner *et al.*, 2022).



**Abb. 7: Die Signaltransduktion des hIFNARs ist abhängig von hIFNAR2.** Vergleichende Darstellung des *synthetic cytokine receptor* (SyCyRs) für humanes Interferon- $\alpha$  (hIFNAR), bestehend aus den Rezeptoren  $V_{Gh}IFNAR1$  und  $V_{ch}IFNAR2$  im Wildtyp (links) und als Deletionsvariante (rechts). Durch die Deletion findet keine Signaltransduktion mit Aktivierung von STAT1/2 mehr statt. Die Tyrosine (Y) der intrazellulären Domäne (ICD) sind eingezeichnet und die letzte Aminosäure vor der Deletion durch Delta ( $\Delta$ ) markiert. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

In dieser Arbeit wurde, in Bezug auf den synthetischen humanen IFNAR, nur die Deletionsvariante  $V_{ch}IFNAR2\Delta347$  untersucht (siehe Abb. 7) und auf die Erstellung von einzelnen Tyrosin-zu-Phenylalanin-Mutationen verzichtet, da bereits gezeigt wurde, dass Einzelmutationen jedes der sieben Tyrosine der ICD des humanen IFNAR2, inklusive Y512, nicht zu einer Änderung der Rezeptorantwort führten. Auch eine gleichzeitige Mutation aller sieben Tyrosine konnte die Signaltransduktion über STAT-Proteine nicht komplett eliminieren (Shemesh *et al.*, 2021), obwohl dies im Widerspruch zu den Ergebnissen einer anderen Studie stand (Wagner *et al.*, 2002).

## DISKUSSION



**Abb. 8:  $V_C$ mIFNAR2 benötigt mindestens eines der Tyrosine Y335 und Y510 zur Signaltransduktion, wobei Y510 stärker zur STAT1/2 Aktivierung beiträgt als Y335.** A) Kombinationen aus  $V_G$ mIFNAR1, oder einer der zwei Deletionsvarianten,  $V_G$ mIFNAR1 $\Delta$ 455 und  $V_G$ mIFNAR1 $\Delta$ 518, wurden mit einer der  $V_C$ mIFNAR2-Mutationsvarianten ( $V_C$ mIFNAR2-Y510F,  $V_C$ mIFNAR2-Y335F und  $V_C$ mIFNAR2-Y335F-Y510F) exprimiert. Die Stelle der Deletion ist mit Delta  $\Delta$  gekennzeichnet, bei den Mutationen wurde jeweils Tyrosin (Y) durch Phenylalanin (F) ersetzt. B) Die Stimulation einer  $V_C$ mIFNAR2-Mutationsvariante in Kombination mit den unterschiedlichen  $V_G$ mIFNAR1-Varianten zeigt vergleichbare Ergebnisse, ist also von diesen unabhängig; beispielhaft gezeigt für  $V_C$ mIFNAR2-Y335F. C) Die STAT1/2 Aktivierung bei der Stimulation von  $V_C$ mIFNAR2-Y335F ist stärker ausgeprägt als bei  $V_C$ mIFNAR2-Y510F. Die Doppelmutante  $V_C$ mIFNAR2-Y335F-Y510F ist nicht mehr in der Lage, STAT1/2 zu aktivieren, demnach wird mindestens eines der beiden Tyrosine zur Signaltransduktion mit STAT1/2 benötigt, aber Y510 ist potenter; beispielhaft in Kombination mit  $V_G$ mIFNAR1 $\Delta$ 455 dargestellt. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Der Fokus dieser Arbeit lag daher eher darin, die wichtige Rolle des  $V_C$ hIFNAR2 in der Phosphorylierung von STAT1/2 zu bestätigen, als einen bestimmten Tyrosinrest der STAT-Signaltransduktion zuzuordnen. Um das kontroverse STAT-Aktivierungsmuster zu enthüllen, wird weitere Forschung in diesem Bereich notwendig sein. Hierzu könnte sich die Anwendung von synthetischen humanen IFNARs in Zukunft als vorteilhaft erweisen.

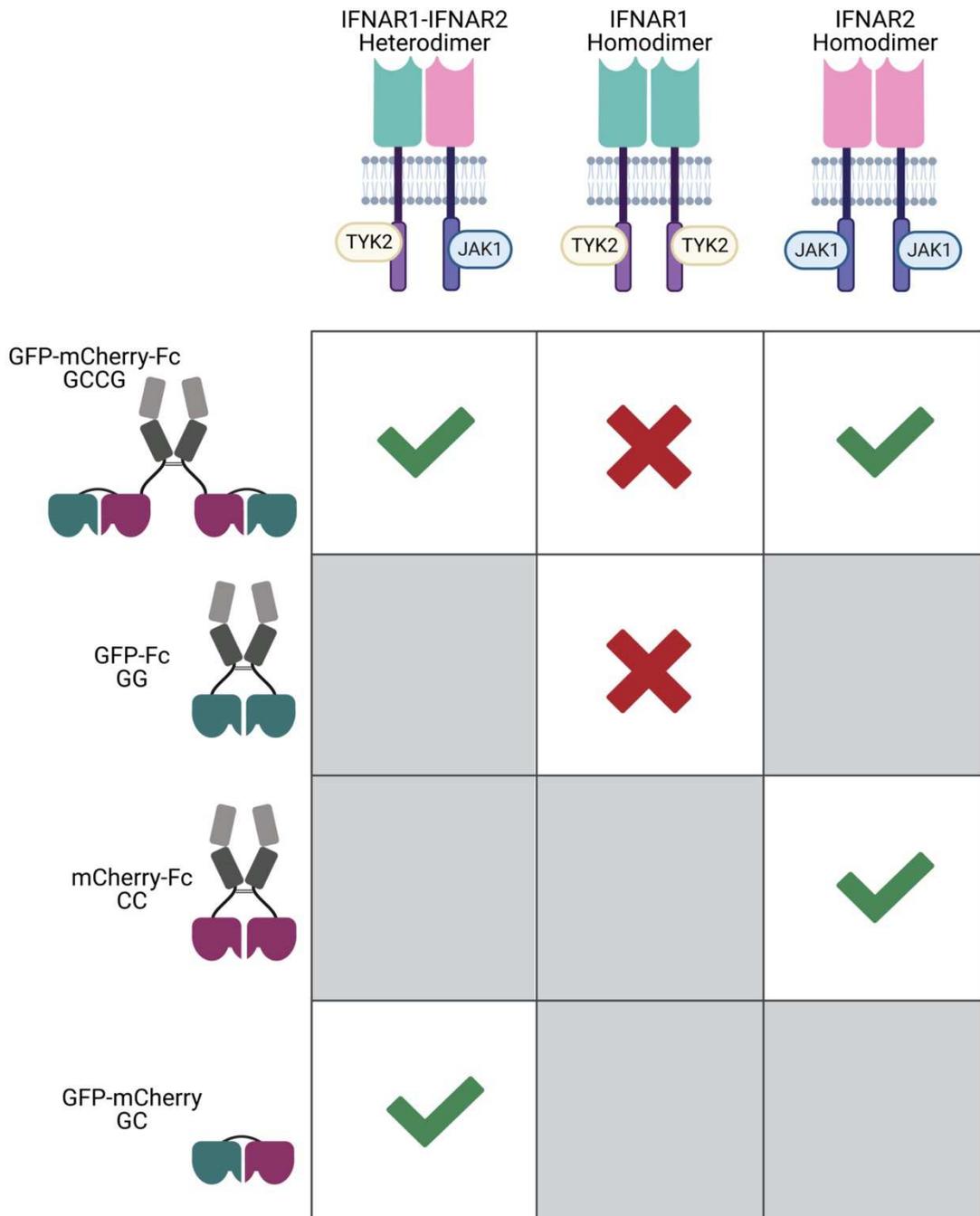
### **3.5 Nur der synthetische IFNAR2 kann aktive Homodimere bilden**

Unter der Nutzung von synthetischen CC- und GG-Liganden war es zudem möglich, zuverlässig und unter Ausschluss eines möglichen *crossstalk* mit anderen zelleigenen Rezeptoren, die biologische Aktivität von homodimeren IFNAR1- und IFNAR2-Rezeptorkomplexen zu untersuchen (siehe Abb. 6A und 9; Zoellner *et al.*, 2022).

In der Vergangenheit konnte für homodimere IFNAR1-Komplexe durch  $CD4_{ECD}$ -IFNAR1<sub>ICD</sub>-Fusionsproteine bereits eine Aktivierung von TYK2 gezeigt werden, wobei eine STAT2 Phosphorylierung ausblieb (Krishnan *et al.*, 1996). IFNAR1 allein scheint demnach zwar in der Lage zu sein, die Typ I Interferon induzierte Signaltransduktion anzustoßen, für die komplette Kaskade sind jedoch wohl noch weitere Faktoren notwendig (Krishnan *et al.*, 1996). Dagegen sind Homodimere des IFNAR2 aus  $EpoR_{ECD}$  und IFNAR2<sub>ICD</sub> biologisch aktiv, wenn auch mit geringerer Wirksamkeit im Vergleich zum natürlichen Rezeptorkomplex (Pattyn *et al.*, 1999). Angelehnt an die Arbeit von Pattyn und Kollegen wurde daher die These aufgestellt, dass  $V_C$ IFNAR2 aktive Homodimere bilden kann, während  $V_G$ IFNAR1 hierzu nicht in der Lage ist (Pattyn *et al.*, 1999). Diese These konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Zoellner *et al.*, 2022).

In der Vergangenheit wurden Thesen, bezüglich des Vorkommens von STAT-Bindungsmotiven im IFNAR1 (Nadeau *et al.*, 1999) alle widerlegt (Shemesh *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2008). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass der IFNAR1 nur über die Bereitstellung der Kinaseaktivität an der Aktivierung von STAT1/2 beteiligt ist, was mit den Ergebnissen dieser Arbeit korreliert. Hier konnte keine Phosphorylierung von STAT1/2 als Folge einer Stimulation der synthetischen humanen oder murinen IFNAR1-Homodimeren gesehen werden (Zoellner *et al.*, 2022). Obwohl es als sehr unwahrscheinlich anzusehen ist (Urin *et al.*, 2019) kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass andere Signalmoleküle als STATs, p38, Akt, oder ERK durch homodimere IFNAR1 Komplexe getriggert werden können (de Weerd *et al.*, 2013; Krishnan *et al.*, 1996).

## DISKUSSION



**Abb. 9: IFNAR1 Homodimere sind nicht aktiv.** Übersicht der synthetischen Liganden (links) und der verschiedenen Rezeptorkonfigurationen des synthetischen Interferon- $\alpha$  Rezeptors (IFNAR; oben). Die Liganden bestehen aus *green fluorescent protein* (GFP, G), mCherry (C) und dem Fc-Teil eines Antikörpers (*crystallizable fraction*). Theoretisch mögliche Konfigurationen bei Stimulation mit dem entsprechenden synthetischen Liganden sind weiß hinterlegt. Ist die Bildung der oben aufgeführten Rezeptorkonfiguration durch Stimulation mit dem links abgebildeten Rezeptor nicht möglich, ist dies grau hinterlegt. Die Funktionalität des Rezeptors ist symbolisch verdeutlicht: ✗ = inaktiv, ✓ = aktiv. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Die STAT1/2 Phosphorylierung, welche nach Stimulation synthetischer humaner und muriner IFNAR2 Homodimere mit CC-Liganden in HEK293 Zellen beobachtet werden konnte, war in Stärke vergleichbar mit der Phosphorylierung durch heterodimere Interferonrezeptorkomplexe. Bei der Kontrolle der Ergebnisse in murinen Ba/F3-gp130 Zellen fiel die homodimere Aktivierung des murinen und humanen IFNAR2, in Western

Blot und inhibitorischen Proliferationsassay, im Vergleich zu heterodimerem IFNAR, jedoch geringer aus (Zoellner *et al.*, 2022). Dies könnte auf bisher unbekannte zellspezifische Differenzen zwischen den verschiedenen Zelllinien zurückzuführen sein. Zudem handelt es sich bei Ba/F3-gp130 Zellen um murine und bei HEK293 Zellen um humane Zellen, was ebenfalls Einfluss auf die unterschiedlich starke Ausprägung der Rezeptorantwort haben könnte. Dieser Aspekt sollte in Zukunft noch weiter beleuchtet werden, da neue Erkenntnisse helfen könnten, die Vergleichbarkeit verschiedener Studiendesigns besser beurteilen zu können. Das etablierte synthetische Zytokin-/Zytokinrezeptor-System (Engelowski *et al.*, 2018) besitzt hierfür den großen Vorteil, dass die cDNAs der SyCyRs theoretisch in jede Zelllinie *in vitro* eingebracht werden können und anschließend eine Stimulation durch zellunabhängige synthetische Liganden hintergrundfrei möglich ist.

### 3.6 Zukünftige Anwendungsmöglichkeiten des SyCyR-Systems

Bereits in mehreren Studien deuteten sich zellspezifische Variationen in der Signaltransduktion der Typ I Interferone an (Moll *et al.*, 2011). Weitere Forschung mit den SyCyRs könnte helfen, diese genauer zu spezifizieren und zudem zu überprüfen, ob diese Variationen physiologischer Natur sind, oder durch die Bedingungen *in vitro* erzeugt werden. Aufgrund der ubiquitären Verteilung von IFNARs auf eukaryotischen Zellen und den vielen verschiedenen Typ I Interferonsubtypen, liegt die Hypothese jedoch nahe, dass zellspezifische Komponenten zur Feineinstellung der Rezeptorantwort beitragen. Vor allem da die Typ I Interferonsubtypen, trotz Überschneidungen in der Rezeptorantwort, keinesfalls als redundant bezeichnet werden können (Li *et al.*, 2017; Piehler *et al.*, 2012; Plataniias, 2005). Diese Mechanismen genauer zu verstehen, könnte die therapeutischen Möglichkeiten in Bezug auf Typ I Interferone verbessern oder sogar revolutionieren. Wie zuvor bereits beschrieben, könnten so Medikamente spezifischer eingesetzt und Nebenwirkungen reduziert werden.

Die systemische Applikation von Typ I IFN kann ein breites Spektrum an Nebenwirkungen in nahezu allen Organsystemen hervorrufen (Sleijfer *et al.*, 2005). Auch ist die Wirkung in der Tumorthherapie, beispielsweise durch Aktivierung CD8<sup>+</sup> T-Zellen oder die Einleitung der Apoptose von Tumorzellen, begrenzt, da während langanhaltender IFN-Signaltransduktion negative Effekte, inklusive immunsuppressiver Faktoren wie PD-L1 (*programmed cell death-ligand 1*), überwiegen. Mit der Weiterentwicklung des Tumors scheint das *tumor microenvironment* (TME) zunehmend Immunzellen zu rekrutieren, sodass Zeitpunkt, Dauer und Ort der Applikation für die

Therapie mit IFN von entscheidender Bedeutung zu sein scheinen (Zhou *et al.*, 2020). Eine auf bestimmte Zelltypen begrenzte Typ I IFN-Rezeptorantwort durch synthetische Interferonrezeptorsysteme könnte der Immunsuppression und anderen Nebenwirkungen entgegenwirken. Bisher führt eine therapeutische Gabe von Interferonen immer zu systemisch erhöhten Konzentrationen des aktiven Zytokins, was eine Reihe von Nebenwirkungen, wie beispielsweise Übelkeit, Depression oder, in seltenen Fällen, die Ausbildung von Autoimmun-erkrankungen, mit sich bringt und bei manchen Patienten das Erreichen der optimalen Wirkmenge verhindert oder sogar in Therapieabbruch endet (Lai *et al.*, 2023; Pestka, 2007; Sleijfer *et al.*, 2005).

Dennoch könnte der Ansatz, T-Zellen für den Nutzen am Menschen direkt mit SyCyRs zu transduzieren, problematisch sein. Auf Grund der potenziellen Immunogenität von GFP und mCherry, könnten *antidrug antibodies* (ADAs) gegen die synthetischen Liganden gebildet werden. Zudem enthalten die SyCyRs unter Verwendung der *nanobodies* eine nicht-natürliche extrazelluläre Komponente. Zwar sind die *nanobodies* sehr klein, was die Anzahl an möglichen Epitopen minimiert, jedoch ist eine Immunisierung weiterhin möglich (Rossotti *et al.*, 2022; Wesolowski *et al.*, 2009). Aus dem Grund müssten die *nanobodies* humanisiert werden, ähnlich wie dies bei der Nutzung muriner Antikörper als Therapeutika für den Menschen notwendig ist (Vincke *et al.*, 2009). Hierbei werden die in der dreidimensionalen Proteinstruktur oberflächlich gelegenen xenogenen Sequenzen gegen humane ausgetauscht (Rossotti *et al.*, 2022; Vincke *et al.*, 2009). Eine Bildung von ADAs ist dadurch zwar nicht ausgeschlossen, aber bisher wurde in klinischen Studien zu löslichen *nanobodies* keine, oder eine nur sehr geringe Immunogenität, vergleichbar mit humanem, oder humanisiertem IgG beobachtet (Rossotti *et al.*, 2022). Die Eingrenzung der Wirkung therapeutischer Typ I Interferone auf spezifische Zellen abhängig von der zu behandelnden Krankheit könnte, angelehnt an die Erfolge der CAR T-Zell-Therapie, eine Möglichkeit bieten, die Lebensqualität der Patienten und die Wirksamkeit der Therapeutika zu verbessern. Bis dahin muss jedoch noch Vieles genauer erforscht werden.

### 3.7 Schlussfolgerung

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit das SyCyR-System erfolgreich auf Typ I Interferonrezeptoren ausgeweitet. Die Analyse der Signaltransduktion mittels Deletions- und Mutationsvarianten der SyCyRs, welche mit GFP-mCherry-Fusionsproteinen stimuliert wurden, ordnet dem IFNAR2 die größere Rolle bei der STAT1/2 Aktivierung zu und bestätigt die Bildung funktionaler IFNAR2-Homodimere. Im Rahmen dieser Arbeit wurde beispielhaft gezeigt, dass synthetische murine und humane IFN-Rezeptoren bei der Entschlüsselung der allgemeinen, Interferon-abhängigen Signaltransduktion eine wichtige Rolle einnehmen können. SyCyRs phänokopieren die physiologische IFN-

## DISKUSSION

Signaltransduktion und können in verschiedenen Zelllinien gleichermaßen eingesetzt und isoliert analysiert werden. Im Falle der murinen IFNARs konnte mit synthetischen Rezeptoren die Bedeutung von Y510 und Y335 im mIFNAR2 für die STAT1/2 Aktivierung in einer zellulären Umgebung, ohne Hintergrundrauschen und unabhängig, verifiziert werden. Da die beiden Rezeptoruntereinheiten mit verschiedenen VHH kloniert wurden (GFP und mCherry), ist zudem ein gezieltes Ansprechen der einzelnen Rezeptoreinheiten möglich und die Bildung von homomeren Rezeptorkomplexen konnte überprüft werden, wobei nur V<sub>cm</sub>IFNAR2-Homodimere funktional aktiv sind.

In vorherigen Arbeiten basierten die Modelle auf dem gezielten *knock-down* oder *knock-out* von Genen natürlicher Zytokinrezeptoren, oder auf Zellen, die normalerweise nicht auf das zu untersuchende Zytokin reagieren. Dies macht eine Gegenüberstellung von Ergebnissen, oder den direkten Vergleich innerhalb einer Zelllinie unmöglich. In dieser Arbeit war es dagegen möglich, in der gleichen Zelllinie die Signaltransduktion des endogenen/natürlichen und des synthetischen IFNARs zu analysieren. Hierbei wurden die natürlichen IFNARs über ein Typ I IFN, IFN $\alpha$ 4, und synthetische IFNARs mit synthetischen Zytokinliganden stimuliert.

Weitere Untersuchungen der Signalkaskade von Typ I Interferonen und dem Einfluss zellspezifischer Faktoren sind notwendig, um die komplexen Mechanismen der Immunabwehr besser zu verstehen. SyCyR-Systeme könnten sich nicht nur hierfür als hilfreich erweisen, sondern auch bei der Analyse biologischer Konsequenzen von Patientenbasierten nicht-synonymen *single nucleotide variants* (SNVs) in IFNARs.

## 4 Literaturverzeichnis

- Bannas P., Hambach J. & Koch-Nolte F. (2017) Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics. *Frontiers in Immunology*, 8, 1-13. 10.3389/fimmu.2017.01603
- Bonfa G., Blazquez-Roman J., Tarnai R. & Siciliano V. (2020) Precision tools in immunoncology: synthetic gene circuits for cancer immunotherapy. *Vaccines*, 8 (4), 1-18. 10.3390/vaccines8040732
- Chanier T. & Chames P. (2019) Nanobody engineering: Toward next generation immunotherapies and immunoimaging of cancer. *Antibodies*, 8 (1), 1-21. 10.3390/antib8010013
- Cull V.S., Tilbrook P.A., Bartlett E.J., Brekalo N.L. & James C.M. (2003) Type I interferon differential therapy for erythroleukemia: specificity of STAT activation. *Blood*, 101 (7), 1-9. 10.1182/blood-2002-05-1521
- Dagenais-Lussier X., Loucif H., Murira A., Laulhe X., Stager S., Lamarre A. & van Grevenynghe J. (2017) Sustained IFN-I expression during established persistent viral infection: a „bad seed“ for protective immunity. *Viruses*, 10 (1), 1-11. 10.3390/v10010012
- de Weerd N.A., Vivian J.P., Nguyen T.K., Mangan N.E., Gould J.A., Braniff S.J., Zaker-Tabrizi L., Fung K.Y., Forster S.C., Beddoe T., Reid H.H., Rossjohn J. & Hertzog P.J. (2013) Structural basis of a unique interferon-beta signaling axis mediated via the receptor IFNAR1. *Nature Immunology*, 14 (9), 1-9. 10.1038/ni.2667
- Degertekin B. & Lok A.S. (2009) Update on viral hepatitis: 2008. *Current Opinion Gastroenterology*, 25 (3), 1-6. 10.1097/MOG.0b013e328324f478
- Dickow J., Francois S., Kaiserling R.L., Malyshkina A., Drexler I., Westendorf A.M., Lang K.S., Santiago M.L., Dittmer U. & Sutter K. (2019) Diverse immunomodulatory effects of individual IFNalpha subtypes on virus-specific CD8(+) T cell responses. *Frontiers in Immunology*, 10, 1-16. 10.3389/fimmu.2019.02255
- Duncan C.J., Mohamad S.M., Young D.F., Skelton A.J., Leahy T.R., Munday D.C., Butler K.M., Morfopoulou S., Brown J.R., Hubank M., Connell J., Gavin P.J., McMahon C., Dempsey E., Lynch N.E., Jacques T.S., Valappil M., Cant A.J., Breuer J., Engelhardt K.R., Randall R.E. & Hambleton S. (2015) Human IFNAR2 deficiency: Lessons for antiviral immunity. *Science Translational Medicine*, 7 (307), 1-8. 10.1126/scitranslmed.aac4227
- Eisenberg S.P., Evans R.J., Arend W.P., Verderber E., Brewer M.T., Hannum C.H. & Thompson R.C. (1990) Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature*, 343 (6256), 1-6. 10.1038/343341a0
- Engelowski E., Schneider A., Franke M., Xu H., Clemen R., Lang A., Baran P., Binsch C., Knebel B., Al-Hasani H., Moll J.M., Floss D.M., Lang P.A. & Scheller J. (2018) Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands. *Nature Communications*, 9 (1), 1-15. 10.1038/s41467-018-04454-8
- Fridy P.C., Li Y., Keegan S., Thompson M.K., Nudelman I., Scheid J.F., Oeffinger M., Nussenzweig M.C., Fenyo D., Chait B.T. & Rout M.P. (2014) A robust pipeline for rapid

## LITERATURVERZEICHNIS

production of versatile nanobody repertoires. *Nature Methods*, 11 (12), 1-12. 10.1038/nmeth.3170

Gerlach N., Gibbert K., Alter C., Nair S., Zelinsky G., James C.M. & Dittmer U. (2009) Anti-retroviral effects of type I IFN subtypes in vivo. *European Journal of Immunology*, 39 (1), 1-11. 10.1002/eji.200838311

Hardy G.A., Sieg S., Rodriguez B., Anthony D., Asaad R., Jiang W., Mudd J., Schacker T., Funderburg N.T., Pilch-Cooper H.A., Debernardo R., Rabin R.L., Lederman M.M. & Harding C.V. (2013) Interferon-alpha is the primary plasma type-I IFN in HIV-1 infection and correlates with immune activation and disease markers. *PLoS One*, 8 (2), 1-9. 10.1371/journal.pone.0056527

Hardy M.P., Owczarek C.M., Jermini L.S., Ejdeback M. & Hertzog P.J. (2004) Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *BMC Genomics*, 84 (2), 1-15. 10.1016/j.ygeno.2004.03.003

Hernandez N., Bucciol G., Moens L., Le Pen J., Shahrooei M., Goudouris E., Shirvani A., Changi-Ashtiani M., Rokni-Zadeh H., Sayar E.H., Reisli I., Lefevre-Utile A., Zijlmans D., Jurado A., Pholien R., Drutman S., Belkaya S., Cobat A., Boudewijns R., Jochmans D., Neyts J., Seeleuthner Y., Lorenzo-Diaz L., Enemchukwu C., Tietjen I., Hoffmann H.H., Momenilandi M., Poyhonen L., Siqueira M.M., de Lima S.M.B., de Souza Matos D.C., Homma A., Maia M.L.S., da Costa Barros T.A., de Oliveira P.M.N., Mesquita E.C., Gijssbers R., Zhang S.Y., Seligman S.J., Abel L., Hertzog P., Marr N., Martins R.M., Meyts I., Zhang Q., MacDonald M.R., Rice C.M., Casanova J.L., Jouanguy E. & Bossuyt X. (2019) Inherited IFNAR1 deficiency in otherwise healthy patients with adverse reaction to measles and yellow fever live vaccines. *Journal of Experimental Medicine*, 216 (9), 1-14. 10.1084/jem.20182295

Isaacs A. & Lindenmann J. (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 147 (927), 1-10. 10.1098/rspb.1957.0048

Isaacs A., Lindenmann J. & Valentine R.C. (1957) Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 147 (927), 1-6. 10.1098/rspb.1957.0049

Ivashkiv L.B. & Donlin L.T. (2014) Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, 14 (1), 1-14. 10.1038/nri3581

Jaks E., Gavutis M., Uze G., Martal J. & Piehler J. (2007) Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation. *Journal of Molecular Biology* 366 (2), 1-15. 10.1016/j.jmb.2006.11.053

Kienes I., Weidl T., Mirza N., Chamailard M. & Kufer T.A. (2021) Role of NLRs in the regulation of type I interferon signaling, host defense and tolerance to inflammation. *International Journal of Molecular Sciences (MDPI)*, 22 (3), 1-29. 10.3390/ijms22031301

Kotenko S.V. & Durbin J.E. (2017) Contribution of type III interferons to antiviral immunity: location, location, location. *Journal of Biological Chemistry*, 292 (18), 1-9. 10.1074/jbc.R117.777102

Kotenko S.V., Izotova L.S., Mirochnitchenko O.V., Lee C. & Pestka S. (1999) The intracellular domain of interferon-alpha receptor 2c (IFN-alphaR2c) chain is responsible for STAT activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (9), 1-6. 10.1073/pnas.96.9.5007

## LITERATURVERZEICHNIS

- Krishnan K., Yan H., Lim J.T. & Krolewski J.J. (1996) Dimerization of a chimeric CD4-interferon-alpha receptor reconstitutes the signaling events preceding STAT phosphorylation. *Oncogene*, 13 (1), 1-9.
- Lai J.Y., Ho J.X., Kow A.S.F., Liang G., Tham C.L., Ho Y.C. & Lee M.T. (2023) Interferon therapy and its association with depressive disorders - A review. *Frontiers in Immunology*, 14, 1-18. 10.3389/fimmu.2023.1048592
- Lavoie T.B., Kalie E., Crisafulli-Cabatu S., Abramovich R., DiGioia G., Moolchan K., Pestka S. & Schreiber G. (2011) Binding and activity of all human alpha interferon subtypes. *Cytokine*, 56 (2), 1-8. 10.1016/j.cyto.2011.07.019
- Lazear H.M., Schoggins J.W. & Diamond M.S. (2019) Shared and distinct functions of type I and type III interferons. *Immunity*, 50 (4), 1-17. 10.1016/j.immuni.2019.03.025
- Li L. & Sherry B. (2010) IFN-alpha expression and antiviral effects are subtype and cell type specific in the cardiac response to viral infection. *Virology Journal*, 396 (1), 1-10. 10.1016/j.virol.2009.10.013
- Li Y., Sun B., Esser S., Jessen H., Streeck H., Widera M., Yang R., Dittmer U. & Sutter K. (2017) Expression pattern of individual IFNA subtypes in chronic HIV infection. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 37 (12), 1-9. 10.1089/jir.2017.0076
- Mesev E.V., LeDesma R.A. & Ploss A. (2019) Decoding type I and III interferon signalling during viral infection. *Nature Microbiology*, 4 (6), 1-11. 10.1038/s41564-019-0421-x
- Minafra A.R., Rafii P., Mossner S., Bazgir F., Floss D.M., Moll J.M. & Scheller J. (2023) Synthetic receptor platform to identify loss-of-function single nucleotide variants and designed mutants in the death receptor Fas/CD95. *Journal of Biological Chemistry*, 299 (8), 1-16. 10.1016/j.jbc.2023.104989
- Moll H.P., Maier T., Zommer A., Lavoie T. & Brostjan C. (2011) The differential activity of interferon-alpha subtypes is consistent among distinct target genes and cell types. *Cytokine*, 53 (1), 1-8. 10.1016/j.cyto.2010.09.006
- Mossner S., Floss D.M. & Scheller J. (2021) Pro- and anti-apoptotic fate decisions induced by di- and trimeric synthetic cytokine receptors. *iScience*, 24 (5), 1-16. 10.1016/j.isci.2021.102471
- Mossner S., Kuchner M., Fazel Modares N., Knebel B., Al-Hasani H., Floss D.M. & Scheller J. (2020) 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*, 295 (35), 1-20. 10.1074/jbc.RA120.013927
- Müller U., Steinhoff U., Reis L.F., Hemmi S., Pavlovic J., Zinkernagel R.M. & Aguet M. (1994) Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*, 264 (5167), 1-4. 10.1126/science.8009221
- Muyldermans S. (2013) Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 1-26. 10.1146/annurev-biochem-063011-092449
- Nadeau O.W., Domanski P., Usacheva A., Uddin S., Plataniias L.C., Pitha P., Raz R., Levy D., Majchrzak B., Fish E. & Colamonici O.R. (1999) The proximal tyrosines of the cytoplasmic domain of the beta chain of the type I interferon receptor are essential for signal transducer and activator of transcription (Stat) 2 activation. Evidence that two

- Stat2 sites are required to reach a threshold of interferon alpha-induced Stat2 tyrosine phosphorylation that allows normal formation of interferon-stimulated gene factor 3. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (7), 1-8. 10.1074/jbc.274.7.4045
- Negishi H., Taniguchi T. & Yanai H. (2018) The interferon (IFN) class of cytokines and the IFN regulatory factor (IRF) transcription factor family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10 (11), 1-15. 10.1101/cshperspect.a028423
- Nguyen V.P., Saleh A.Z., Arch A.E., Yan H., Piazza F., Kim J. & Krolewski J.J. (2002) Stat2 binding to the interferon-alpha receptor 2 subunit is not required for interferon-alpha signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (12), 1-9. 10.1074/jbc.M111161200
- Pattyn E., Van Ostade X., Schauvliege L., Verhee A., Kalai M., Vandekerckhove J. & Tavernier J. (1999) 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*, 274 (49), 1-8. 10.1074/jbc.274.49.34838
- Pestka S. (2007) The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (28), 1-5. 10.1074/jbc.R700004200
- Piehler J., Thomas C., Garcia K.C. & Schreiber G. (2012) Structural and dynamic determinants of type I interferon receptor assembly and their functional interpretation. *Immunological Reviews*, 250 (1), 1-25. 10.1111/imr.12001
- Platanias L.C. (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology*, 5 (5), 1-12. 10.1038/nri1604
- Puigdevall L., Michiels C., Stewardson C. & Dumoutier L. (2022) JAK/STAT: Why choose a classical or an alternative pathway when you can have both? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26 (7), 1-11. 10.1111/jcmm.17168
- Rossotti M.A., Belanger K., Henry K.A. & Tanha J. (2022) Immunogenicity and humanization of single-domain antibodies. *the FEBS Journal*, 289 (14), 1-24. 10.1111/febs.15809
- Rothbauer U., Zolghadr K., Muyldermans S., Schepers A., Cardoso M.C. & Leonhardt H. (2008) A versatile nanotrapp for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7 (2), 1-8. 10.1074/mcp.M700342-MCP200
- Russell-Harde D., Wagner T.C., Rani M.R., Vogel D., Colamonici O., Ransohoff R.M., Majchrzak B., Fish E., Perez H.D. & Croze E. (2000) Role of the intracellular domain of the human type I interferon receptor 2 chain (IFNAR2c) in interferon signaling. Expression of IFNAR2c truncation mutants in U5A cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (31), 1-5. 10.1074/jbc.M002518200
- Sadler A.J. & Williams B.R. (2008) Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Reviews Immunology*, 8 (7), 1-10. 10.1038/nri2314
- Scheller J., Engelowski E., Moll J.M. & Floss D.M. (2019) Immunoreceptor engineering and synthetic cytokine signaling for therapeutics. *Trends in Immunology*, 40 (3), 1-15. 10.1016/j.it.2019.01.001

## LITERATURVERZEICHNIS

- Schneider W.M., Chevillotte M.D. & Rice C.M. (2014) Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annual Review of Immunology*, 32, 1-35. 10.1146/annurev-immunol-032713-120231
- Schoggins J.W. & Rice C.M. (2011) Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current Opinion in Virology*, 1 (6), 1-8. 10.1016/j.coviro.2011.10.008
- Schreiber G. (2017) The molecular basis for differential type I interferon signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 292 (18), 1-10. 10.1074/jbc.R116.774562
- Schwartz D.M., Bonelli M., Gadina M. & O'Shea J.J. (2016) Type I/II cytokines, JAKs, and new strategies for treating autoimmune diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 12 (1), 1-12. 10.1038/nrrheum.2015.167
- Shemesh M., Lochte S., Piehler J. & Schreiber G. (2021) IFNAR1 and IFNAR2 play distinct roles in initiating type I interferon-induced JAK-STAT signaling and activating STATs. *Science Signaling*, 14 (710), 1-16. 10.1126/scisignal.abe4627
- Si W., Li C. & Wei P. (2018) Synthetic immunology: T-cell engineering and adoptive immunotherapy. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 3 (3), 1-7. 10.1016/j.synbio.2018.08.001
- Sleijfer S., Bannink M., Van Gool A.R., Kruit W.H. & Stoter G. (2005) Side effects of interferon-alpha therapy. *Pharmacy World & Science*, 27 (6), 1-9. 10.1007/s11096-005-1319-7
- Urin V., Shemesh M. & Schreiber G. (2019) CRISPR/Cas9-based knockout strategy elucidates components essential for type 1 interferon signaling in human HeLa cells. *Journal of Molecular Biology*, 431 (17), 1-15. 10.1016/j.jmb.2019.06.007
- Usacheva A., Sandoval R., Domanski P., Kotenko S.V., Nelms K., Goldsmith M.A. & Colamonici O.R. (2002) Contribution of the box 1 and box 2 motifs of cytokine receptors to Jak1 association and activation. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (50), 1-7. 10.1074/jbc.M205757200
- van Boxel-Dezaire A.H., Rani M.R. & Stark G.R. (2006) Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity*, 25 (3), 1-12. 10.1016/j.immuni.2006.08.014
- Vincke C., Loris R., Saerens D., Martinez-Rodriguez S., Muyldermans S. & Conrath K. (2009) General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (5), 1-12. 10.1074/jbc.M806889200
- Wagner T.C., Velichko S., Vogel D., Rani M.R., Leung S., Ransohoff R.M., Stark G.R., Perez H.D. & Croze E. (2002) 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*, 277 (2), 1-7. 10.1074/jbc.M108928200
- Wallweber H.J., Tam C., Franke Y., Starovasnik M.A. & Lupardus P.J. (2014) Structural basis of recognition of interferon-alpha receptor by tyrosine kinase 2. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21 (5), 1-8. 10.1038/nsmb.2807

- Wesolowski J., Alzogaray V., Reyelt J., Unger M., Juarez K., Urrutia M., Cauerhff A., Danquah W., Rissiek B., Scheuplein F., Schwarz N., Adriouch S., Boyer O., Seman M., Licea A., Serreze D.V., Goldbaum F.A., Haag F. & Koch-Nolte F. (2009) Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical Microbiology and Immunology*, 198 (3), 1-18. 10.1007/s00430-009-0116-7
- Wilmes S., Beutel O., Li Z., Francois-Newton V., Richter C.P., Janning D., Kroll C., Hanhart P., Hotte K., You C., Uze G., Pellegrini S. & Piehler J. (2015) Receptor dimerization dynamics as a regulatory valve for plasticity of type I interferon signaling. *Journal of Cell Biology*, 209 (4), 1-15. 10.1083/jcb.201412049
- Yan H., Krishnan K., Greenlund A.C., Gupta S., Lim J.T.E., Schreiber R.D., Schindler C.W. & Krolewski J.J. (1996) Phosphorylated interferon-alpha receptor 1 subunit (IFN $\alpha$ R1) acts as a docking site for the latent form of the 113 kDa STAT2 protein. *The EMBO Journal*, 15 (5), 1-12. DOI 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00444.x
- Zhang Q., Bastard P., Liu Z., Le Pen J., Moncada-Velez M., Chen J., Ogishi M., Sabli I.K.D., Hodeib S., Korol C., Rosain J., Bilguvar K., Ye J., Bolze A., Bigio B., Yang R., Arias A.A., Zhou Q., Zhang Y., Onodi F., Korniotis S., Karpf L., Philippot Q., Chbihi M., Bonnet-Madin L., Dorgham K., Smith N., Schneider W.M., Razooky B.S., Hoffmann H.H., Michailidis E., Moens L., Han J.E., Lorenzo L., Bizien L., Meade P., Neehus A.L., Ugurbil A.C., Corneau A., Kerner G., Zhang P., Rapaport F., Seeleuthner Y., Manry J., Masson C., Schmitt Y., Schluter A., Le Voyer T., Khan T., Li J., Fellay J., Roussel L., Shahrooei M., Alosaimi M.F., Mansouri D., Al-Saud H., Al-Mulla F., Almourfi F., Al-Muhsen S.Z., Alshome F., Al Turki S., Hasanato R., van de Beek D., Biondi A., Bettini L.R., D'Angio M., Bonfanti P., Imberti L., Sottini A., Paghera S., Quiros-Roldan E., Rossi C., Oler A.J., Tompkins M.F., Alba C., Vandernoot I., Goffard J.C., Smits G., Migeotte I., Haerynck F., Soler-Palacin P., Martin-Nalda A., Colobran R., Morange P.E., Keles S., Colkesen F., Ozcelik T., Yasar K.K., Senoglu S., Karabela S.N., Rodriguez-Gallego C., Novelli G., Hraiech S., Tandjaoui-Lambiotte Y., Duval X., Laouenan C., Clinicians C.-S., Clinicians C., Imagine C.G., French C.C.S.G., Co V.C.C., Amsterdam U.M.C.C.-B., Effort C.H.G., Group N.-U.T.C.I., Snow A.L., Dalgard C.L., Milner J.D., Vinh D.C., Mogensen T.H., Marr N., Spaan A.N., Boisson B., Boisson-Dupuis S., Bustamante J., Puel A., Ciancanelli M.J., Meyts I., Maniatis T., Soumelis V., Amara A., Nussenzweig M., Garcia-Sastre A., Krammer F., Pujol A., Duffy D., Lifton R.P., Zhang S.Y., Gorochov G., Beziat V., Jouanguy E., Sancho-Shimizu V., Rice C.M., Abel L., Notarangelo L.D., Cobat A., Su H.C. & Casanova J.L. (2020) Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*, 370 (6515), 1-14. 10.1126/science.abd4570
- Zhao W., Lee C., Piganis R., Plumlee C., de Weerd N., Hertzog P.J. & Schindler C. (2008) A conserved IFN-alpha receptor tyrosine motif directs the biological response to type I IFNs. *The Journal of Immunology*, 180 (8), 1-8. 10.4049/jimmunol.180.8.5483
- Zheng X., Wu Y., Bi J., Huang Y., Cheng Y., Li Y., Wu Y., Cao G. & Tian Z. (2022) The use of supercytokines, immunocytokines, engager cytokines, and other synthetic cytokines in immunotherapy. *Cellular & Molecular Immunology*, 19 (2), 1-18. 10.1038/s41423-021-00786-6
- Zhou L., Zhang Y., Wang Y., Zhang M., Sun W., Dai T., Wang A., Wu X., Zhang S., Wang S. & Zhou F. (2020) A dual role of type I interferons in antitumor immunity. *Advanced Biosystems*, 4 (11), 1-14. 10.1002/adbi.201900237
- 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. (2022) Synthetic mimetics

## LITERATURVERZEICHNIS

assigned a major role to IFNAR2 in type I interferon signaling. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1-17. 10.3389/fmicb.2022.947169

Zwarthoff E.C., Mooren A.T. & Trapman J. (1985) Organization, structure and expression of murine interferon alpha genes. *Nucleic Acids Research*, 13 (3), 1-14. 10.1093/nar/13.3.791

## 5 Anhang

### 5.1 Frontiers' policies

#### Frontiers' policies

##### Open access and copyright

All Frontiers articles from July 2012 onwards are published with open access under the Creative Commons [CC-BY license](#) (the current version is CC-BY, version 4.0). This means that the author(s) retains copyright, but the content is free to download, distribute, and adapt for commercial or non-commercial purposes, given appropriate attribution to the original article.

Upon submission, the author(s) grants Frontiers a license to publish, including to display, store, copy, and reuse the content. The CC-BY Creative Commons attribution license enables anyone to use the publication freely, given appropriate attribution to the author(s) and citing Frontiers as the original publisher. The CC-BY Creative Commons attribution license does not apply to third-party materials that display a copyright notice to prohibit copying. Unless the third-party content is also subject to a CC-BY Creative Commons attribution license, or an equally permissive license, the author(s) must comply with any third-party copyright notices.

Entnommen von der Frontiers Website unter:

<https://www.frontiersin.org/guidelines/policies-and-publication-ethics> (28.10.2023)

### 5.2 CC-BY license

Die genauen Richtlinien der *CC-BY license* können unter folgendem Link abgerufen werden:

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.en> (28.10.2023)

## 6 Danksagung

Ich möchte diese Stelle nutzen, um mich bei allen zu bedanken, die mich sowohl fachlich als auch persönlich im Schaffensprozess dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gebührt in erster Linie meiner Doktormutter PD Dr. Doreen Manuela Floss, die mir die Möglichkeit zu dieser Doktorarbeit gegeben und mich in die Welt des wissenschaftlichen Arbeitens eingeführt hat. Ihre große Begeisterung an der Forschung hat mich förmlich angesteckt und ich werde ihr auf ewig für ihre hervorragende Betreuung und immerwährende Unterstützung dankbar sein, ohne die diese Arbeit kaum zu realisieren gewesen wäre.

Einen großen Dank möchte ich zudem an Prof. Dr. Jürgen Scheller aussprechen, der mich in seinem Institut willkommen geheißen und mich in der Umsetzung dieser Arbeit stets mit großem Interesse und konstruktiver Kritik begleitet hat.

Ich möchte mich herzlich bei allen Beteiligten des Projekts und der damit verbundenen Publikation bedanken, insbesondere bei Professor Philipp Lang und Dr. Haifeng Xu. Außerdem möchte ich den vielen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II, vor allem Petra Oprée-Jeremic und Yvonne Arlt für die schöne Zusammenarbeit danken.

Mein letzter Dank, der mir persönlich sehr wichtig ist, geht an meine Familie, meine Eltern und Großeltern, meine Schwester und meine beste Freundin. Für den ständigen Rückhalt, die Liebe und die Kraft, um meinen eigenen Weg zu gehen und zu erreichen, was ich mir nur schwer erträumen konnte.