Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Leiter: Univ. - Prof. Dr. Jürgen Scheller

Untersuchung der Signaltransduktion von Klasse II Zytokinrezeptoren unter Verwendung synthetischer Zytokinrezeptoren

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von Frederik Henry De Vos 2024

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter/in: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Philipp Lang "Glaube denen, die die Wahrheit suchen, und zweifle an denen, die sie gefunden haben." André Paul Guillaume Gide

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Zoellner, N., N. Coesfeld, F.H. De Vos, J. Denter, H.C. Xu, E. Zimmer, B. Knebel, H. Al-Hasani, S. Mossner, P.A. Lang, D.M. Floss and J. Scheller, (2022), Synthetic mimetics assigned a major role to IFNAR2 in type I interferon signaling, *Frontiers in Microbioligy*, (13) p. 947169.

### Zusammenfasssung

Interferone sind, wie auch andere Zytokine, Proteine mit pleiotropen Effekten. Die in dieser Arbeit anhand von Interferon a4 analysierten Typ I Interferone nehmen dabei eine ambivalente Rolle ein. So sind sie essenziell an der Steuerung der Immunantwort beteiligt und treten dabei als ausschlaggebend in der körpereigenen Bekämpfung von viralen Infektionen und neoplastischen Erkrankungen auf. Andererseits gibt es eine Korrelation zwischen einer Überaktivität von Interferonen und autoimmunen Geschehen. Auch können chronisch niedrige Interferonspiegel das Immunsystem in seiner Funktion hindern. Angesichts der bislang limitierten Therapiemöglichkeiten auf diesen Gebieten, ist diese Zytokinklasse von großem Interesse für die Forschung. Ein Problem bei der therapeutischen Anwendbarkeit von Interferonen ist die mangelnde Steuerbarkeit der Signalantwort. Dies wird durch die besagten ambivalenten Effekte deutlich. Ziel dieser Arbeit war es, ein hintergrundfreies, steuerbares System zu erzeugen und zu analysieren, ob Signaltransduktion und Genexpression des synthetischen Systems dem natürlichen Rezeptor entsprechen. Es erfolgte die Konstruktion eines synthetischen Zytokin/Zytokinrezeptorsystems, bei dem die extrazelluären Domänen der beiden Untereinheiten des Interferon-α/β-Rezeptors (IFNAR), IFNAR1 und IFNAR2, jeweils gegen nanobodies (Einzeldomänenantikörper) ausgetauscht wurden. Diese erkannten die fluoreszierenden Proteine GFP (green fluorescent protein) und mCherry, welche als synthetische Liganden dienten und als heterodimere Fusionsproteine die Rezeptordimerisierung einleiteten. Die transmembranäre und intrazelluläre Domäne wurden beibehalten, damit die ursprüngliche Signaltransduktion, die hauptsächlich über den JAK-STAT-Weg vermittelt wird, stattfinden konnte. Zu Anfang wurde die cDNA für den synthetischen und den natürlichen Rezeptor in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Die Steuerbarkeit des synthetischen Rezeptors wurde anhand von Stimulationen in verschiedenen Zelllinien geprüft. Auch wurde die Signaltransduktion der Rezeptoren untereinander verglichen. Dazu wurden in verschiedenen Zelllinien vor allem Proteine des JAK-STAT-Weges mittels Western Blot nachgewiesen, anhand eines microarray das entsprechende Transkriptom näher analysiert, die Genexpression mittels real-time qPCR beobachtet und auch die Effekte auf die Zellproliferation verglichen.

Die Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass die synthetischen Zytokinrezeptoren die natürlichen Rezeptoren in ihrer Signaltransduktion imitieren. Als Teil des rasant an Bedeutung gewinnenden Feldes der synthetischen Zytokinbiologie, sind diese eigens konstruierten Systeme, aufgrund Ihrer Hintergrundfreiheit und Steuerbarkeit, ein wertvolles Werkzeug für die Erforschung entsprechender zellulärer Mechanismen und bieten damit neue Möglichkeiten in der Therapie verschiedenster Erkrankungen.

### Summary

Like other cytokines, interferons are proteins with pleiotropic effects. Type I interferons which were analyzed in this study on the basis of interferon  $\alpha 4$ , play an ambivalent role. On the one hand they are essential in controlling the immune response and crucial in the body's fight against viral infections and neoplastic diseases. On the other hand there is a correlation between overactivity of interferons and autoimmune diseases. Furthermore, chronically low levels of interferon can hinder the immune system in its function. In the view of limited therapeutic options in these areas this cytokine class is of great interest for current research. A major problem concerning therapeutical applicability of interferons are difficulties in controlling the signal response. This becomes clear with regard to the mentioned ambivalent effects. The goal of this work was to construct a background-free controllable system and to analyze whether signal transduction and gene expression correspond to the natural receptor. Therefore, a synthetic cytokine/cytokine receptor system was constructed, whereby the extracellular domains of both interferon α/β receptors (IFNAR), IFNAR1 and IFNAR2, were switched with nanobodies (single-domain antibodies). These antibodies recognized the fluorescent proteins GFP (green fluorescent protein) and mCherry, which served as synthetic ligands and composed as heterodimeric fusion proteins lead to receptor dimerization. The transmembrane and intracellular domains were kept, so the original signal transduction, mediated predominantly via the JAK-STAT pathway, was not altered. Initially, the cDNA for the synthetic and natural receptor was cloned into different expression vectors. The controllability of the synthetic receptor was analyzed by stimulation of various cell lines. Additionally, signal transduction of both receptor variants was compared to one another. Therefore, proteins of the JAK-STAT pathway were detected in different cell lines via Western blotting, the resulting transcriptome was determined by microarray, gene expression was illustrated using real-time qPCR and effects on cell proliferation were compared.

The results led to the conclusion that the synthetic receptors are able to imitate the natural signal transduction. As a part of the rapidly growing field of synthetic biology, these particularly designed systems with regard to their background-free and control-lable features are valuable tools for further exploration of cellular mechanisms and therapy of various kinds of diseases.

Ш

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Adoptive cell therapy	EGF	Epidermal growth factor
Antikörper	EGFP	Enhanced GFP
Aktivierte Proteinkinase B	elF	Eukaryotic initiation factor
Antigenpräsentierende Zellen	EPO	Erythropoietin
Aminosäure	ERK	Extracellular-signal-regula- ted kinases
B-cell acute lymphoblastic leukemia	FCS	Fetal calf serum
Bicinchoninic acid	FDA	Food and Drug Administra- tion
Chimeric antigen receptor	G-Fc	GFP-Fc
2xmCherry	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phos- phat-Dehydrogenase
Cluster of differentiation	GAS	Interferon γ activated se- quence
Complementary determi- ning region	GC	GFP-mCherry
Constant domain of heavy- chain	GC-Fc	GFP-mCherry-Fc
Chronisch myeloische Leu- kämie	GDP	Guanosindiphosphat
Coronavirus disease 2019	GFP	Green fluorescent protein
Cytokine release syndrome	GG	2xGFP
mCherry- <i>nanobody</i>	GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
Dendritic cell	GP	Glykoprotein
Diffuse large B-cell lym- phoma	GTP	Guanosintriphosphat
Dulbecco's Modified Ea- gle's Medium	G <sub>VHH</sub>	GFP-nanobody
Dominant negativ	$H_2O_{dd}$	Destilliertes Wasser
Desoxyribonucleic acid	hIFNAR	Humaner Interferon-α/β- Rezeptor
Extracellular domain	HIL-6	Hyper-Interleukin-6
Ethylendiamintetraacetat	IC	Immune complex
	Adoptive cell therapyAntikörperAktivierte Proteinkinase BAktivierte Proteinkinase BAntigenpräsentierende ZellenAminosäureB-cell acute lymphoblastic leukemiaBicinchoninic acidChimeric antigen receptor2xmCherryCluster of differentiationComplementary determi- ning regionConstant domain of heavy- chainChronisch myeloische Leu- kämieCoronavirus disease 2019Cytokine release syndromemCherry-nanobodyDendritic cellDiffuse large B-cell lym- phomaDulbecco's Modified Ea- gle's MediumDominant negativDesoxyribonucleic acidEthylendiamintetraacetat	Adoptive cell therapyEGFAntikörperEGFPAktivierte Proteinkinase BeIFAntigenpräsentierende ZellenEPOAminosäureERKB-cell acute lymphoblastic leukemiaFCSBicinchoninic acidFDAChimeric antigen receptorG-Fc2xmCherryGAPDHCluster of differentiationGASCornplementary determi- ning regionGCChronisch myeloische Leu- kämieGDPCoronavirus disease 2019GFPCytokine release syndromeGGDendritic cellGPDiffuse large B-cell lym- phomaGTPDulbecco's Modified Ea- gle's MediumGvnHDominant negativHIL-6Extracellular domainHIL-6EthylendiamintetraacetatIC

ICD	Intracellular domain	MX1	MX dynamin-like GTPase 1
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase	OASL1	2'-5'-oligoadenylate syn- thase-like 1
IFN	Interferon	PAGE	Polyacrylamidgelelektro- phorese
IFNAR	Interferon-α/β-Rezeptor	PBS	Phosphate-buffered saline
IFNGR	Interferon-gamma-Rezep- tor	PCR	Polymerase chain reaction
IFNLR	Interferon-lambda-Rezep- tor	PD-L1	Programmed cell death-lig- and 1
IG	Immunglobulin	pDC	Plasmazytoide dendritische Zellen
ΙΚΚε	Inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase- $\varepsilon$	PDGF	Platelet-derived growth factor
IL	Interleukin	PI3K	Phosphatidylinositol 3- Kinase
IRF	Interferon regulatory factor	PKR	Protein kinase RNA-acti- vated
ISG ISGF	Interferon stimulated gene Interferon stimulated gene	pSTAT	Phosphorylated signal transducer and activator of
ISRE	factor Interferon stimulated	RAC1	Ras-related C3 botulinum
	response element	RNA	toxin substrate 1 Ribonucleic acid
JAK	Januskinase		
JNK	C-Jun amino-terminal ki- nases	RNase	Ribonuklease
kb	Kiloblasen	ROR1	Receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1
kDa	Kilodalton	rpm	Rounds per minute
Lck	Lymphocyte kinase	RT	Raumtemperatur
LCMV	Lymphocytic choriomenin- gitis virus	SARS- CoV-2	Severe acute respiratory symdrome coronavirus 2
MAPK	- Mitogen-activated protein kinase	scFv	Single chain variable frag- ment
МАРКК	Mitogen-activated protein kinase-kinase	SDM	Site directed mutagenesis
MAPKKK	Mitogen-activated protein kinase-kinase-kinase	SDS	Sodium dodecyl sulfate
mIFNAR	Muriner Interferon-α/β-Re- zeptor	SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate Po- lyacrylamid-Gelelektropho- rese
mTOR	Mammalian target of ra- pamycin	SOCS	Suppressor of cytokine sig- nalling

SOE-PCR	Splicing by overlap exten- sion PCR	TLR	Toll-like-receptor
STAT	Signal transducer and acti- vator of transcription	TNFSF	Tumor necrosis factor su- perfamily
SyCyR	Synthetic cytokine receptor	ТҮК	Tyrosinkinase
TBS	Tris buffered saline	U	Units
TBS-T	Tris buffered saline with Tween20	USP18	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 18
tEGFR	Truncated epidermal growth factor receptor	VH	Variable domain of heavy- chain
TEV	Tobacco etch virus	VHH	Variable domain of heavy- chain only antibody
TIL	Tumor infiltrating lympho- cyte	VNAR	Variable domain of new an- tigen receptor
ТКІ	Tyrosinkinase-Inhibitoren		

# INHALTSVERZEICHNIS

1	Einle	eitung	1
	1.1	Zytoki	ine und Zytokinrezeptoren1
		1.1.1	Die Bedeutung von Zytokinen1
		1.1.2	Klassifikation der Zytokinrezeptoren1
		1.1.3	Signaltransduktion der Interferonrezeptorkomplexe2
		1.1.4	Weitere Signalwege der Typ I IFN-abhängigen Immunantwort 4
		1.1.5	Regulationsmechanismen der Typ I IFN-Antwort5
	1.2	Тур I I	FNs in Krankheit und Therapie6
		1.2.1	Einteilung der Typ I IFN-abhängigen Effekte6
		1.2.2	Antiviraler Zustand und Einfluss auf das Immunsystem7
		1.2.3	Typ II und Typ III IFNs8
		1.2.4	Die Rolle von Typ I IFNs bei Krebserkrankungen und
		chron	ischen Virusinfektionen9
		1.2.5	Typ I IFNs und Autoimmunerkrankungen10
	1.3	Synth	etische biochemische Systeme12
		1.3.1	Synthetische Zytokinbiologie12
		1.3.2	Nanobodies und fluoreszierende Proteine als Teile eines
		synthe	etischen biochemischen Systems12
		1.3.3	Bedeutung und Ausblick synthetischer biochemischer Systeme
		in For	schung und Therapie14
	1.4	Ziele (	der Arbeit16
2	Mate	erial un	d Methoden19
	2.1	Mater	ial19
		2.1.1	Chemikalien, Lösungen, Puffer und Medien19
		2.1.2	Enzyme22
		2.1.3	Kits, Verbrauchsmaterialien und Geräte22
		2.1.4	Antibiotika, Stimulanzien und Antikörper25

	2.1.5	Plasmide und Oligonukleotide	27
	2.1.6	Zelllinien	29
	2.1.7	Bakterien	30
2.2	Molek	ularbiologische Methoden	30
	2.2.1	Transformation chemisch kompetenter E. coli Bakterien	30
	2.2.2	Präparation der Plasmid-DNA	30
	2.2.3	Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA	31
	2.2.4	Restriktionsspaltung der Plasmid-DNA	31
	2.2.5	Agarosegelelektrophorese	32
	2.2.6	Gelextraktion	32
	2.2.7	Ligation	32
	2.2.8	Polymerasekettenreaktion	33
	2.2.9	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	38
	2.2.10	DNA-microarray	39
	2.2.11	DNA-Sequenzierung	39
2.3	Zellbio	ologische Methoden	39
	2.3.1	Subkultivierung von Zellkulturen	39
	2.3.2	Bestimmung der Zellzahl und -viabilität	40
	2.3.3	Transiente Transfektion	40
	2.3.4	Retrovirale Transduktion	41
	2.3.5	Stimulationsassay der Zelllinien	41
	2.3.6	Zellproliferationsassay	42
	2.3.7	Durchflusszytometrie	42
2.4	Protei	nbiochemische Methoden	43
	2.4.1	Proteinlysate und Quantifizierung	43
	2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
	2.4.3	Western Blot	44

3	Erge	ebnisse
	3.1	Konstruktion synthetischer Zytokinrezeptoren46
		3.1.1 Grundlagen
		3.1.2 Klonierung der pcDNA3.1 Expressionsvektoren für die
		Transfektion eukaryotischer Zellen49
		3.1.3 Generierung von Ba/F3-gp130-Zellinien mit den synthetischen
		Rezeptoren für Typ I Interferone
	3.2	Analyse der interferonabhängigen Signaltransduktion57
		3.2.1 SyCyRs zeigen eine mit wt-IFNARs vergleichbare Aktivierung
		des JAK-STAT-Signalweges in HEK293-Zellen57
		3.2.2 JAK1 und TYK2 sind essenziell für die IFNAR-
		Signaltransduktion
		3.2.3 Die Signaltransduktion von synthetischen IFNARs und den
		Wildtyprezeptoren ist vergleichbar61
		3.2.4 Ba/F3-gp130-Zellen mit SyCyRs oder wt-IFNARs zeigen keine
	0.0	IFIN-abhangige Proliferation
	3.3	Analyse der Interferon-Induzierten Genexpression
		3.3.1 Die Dynamik der Genexpression von MX1 und OASL1 durch
		2.2.0 Analyse der Canayarassian von synthetischen IENADe und
		Wildtyprezeptoren mittels <i>microarray</i>
	34	Analyse der IENAR-Signaltransduktion unter Verwendung von
	Rez	eptormutanten und -deletionen
		3.4.1 Übersicht der erfolgten Mutationen und Deletionen70
		3.4.2 Klonierungsprozess der Rezeptormutanten von pcDNA3.1-
		SyCyR-2A-mIFNAR71
		3.4.3 Klonierungsprozess einer Deletionsvariante von pcDNA3.1-
		SyCyR-2A-mIFNAR73
4	Disk	cussion

	4.1 Sigr	SyCyF altrans	Rs erlauben die Reproduktion der Typ I IFN- abhängigen duktion	
	_	4.1.1	Hintergrund76	
		4.1.2 und S	Das Aktivierungsmuster der STAT-Moleküle von wt-IFNARs yCyRs ist äquivalent77	
		4.1.3 Prolife Effekte	Die Analyse des wt-IFNAR- und SyCyR-vermittelten erationsverhaltens entspricht bekannten antiproliferativen en der Typ I IFNs	
		4.1.4 IFNAF	SyCyRs imitieren die Dynamik der Genexpression von wt- Rs	
	4.2	Unkor	ventionelle Rezeptorkombinationen80	
		4.2.1 Rezep	Bisherige Ansätze zur Generierung neuer torkombinationen	
		4.2.2	IFNAR2-Homodimere sind biologisch aktiv81	
	4.3	Neue	therapeutische Ansätze82	
		4.3.1	Optimierung der CAR-T-Zelltherapie82	
		4.3.2	Limitierungen von SyCyRs86	
	4.4	Schlus	ssfolgerungen	
5	Abbildungsverzeichnis90			
6	Tab	Tabellenverzeichnis92		
7	Lite	Literatur -und Quellenverzeichnis93		
8	Anh	ang		
	8.1	Vektor	rkarten106	
		8.1.1	pcDNA3.1-2A-mIFNAR	
		8.1.2	pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR106	
	8.2	Genex	pression von Ba/F3-gp130-Zellen107	

# 1 Einleitung

# 1.1 Zytokine und Zytokinrezeptoren

# 1.1.1 Die Bedeutung von Zytokinen

Zytokine sind eine heterogene Gruppe von Polypeptiden, die der Kommunikation zwischen Zellen dienen und dabei eine wichtige Rolle in der Koordination des Immunsystems einnehmen. Sekretiert von verschiedensten Zelltypen, übernehmen sie mit ihren pleiotropen Effektmechanismen unterschiedlichste Aufgaben [1]. Sie entfalten ihre Wirkung über die Bindung von spezifischen Rezeptoren auf den Zielzellen und aktivieren intrazelluläre Signalwege [2]. Zytokine spielen eine essenzielle Rolle in einer Vielzahl pathologischer Prozesse und befinden sich dabei auf einer Gratwanderung zwischen kontrollierten gesundheitsfördernden als auch pathogenen Mechanismen wie bei autoimmunen Erkrankungen aus dem rheumatoiden Formkreis [3]. Dies macht die Zytokinbiologie zu einem bedeutenden Forschungsfeld.

## 1.1.2 Klassifikation der Zytokinrezeptoren

Die Einteilung von Zytokinen ist eine Herausforderung. Da deren pleiotrope Effekte schwer zu kathegorisieren sind, kann man sie anhand von strukturellen Eigenschaften ihrer korrespondierenden Rezeptoren in sieben Familien einteilen. Neben der Familie der Rezeptortyrosinkinasen, zu deren Liganden vor allem Wachstumsfaktoren wie epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF) zählen, unterteilt man weiter in die TNF-Rezeptorsuperfamilie, denen unter anderem TNF und Fas-L zugeordnet sind. Die IL-1/Toll-like-Rezeptorfamilie schließt die Zytokine IL-1 und IL-18 ein, während die IL-17-Rezeptorfamilie durch die Zytokine IL-17A bis IL-17F aktiviert wird. Auch die Familie der Serin/Threonin-Kinasen mit zugehörigen Liganden TNF<sup>β1</sup> bis TNF-<sup>β3</sup> und die G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren lassen sich in die Unterteilung einbeziehen. Die Klasse I und Klasse II Zytokinrezeptoren besitzen keine intrinsische Kinaseaktivität und sind somit auf assoziierte Januskinasen angewiesen. Während Klasse I und II Rezeptoren Ihre Wirkung hauptsächlich über den Januskinase (JAK) -signal transducer and activator of transcription (STAT) -Signalweg entfalten, beruht die Einteilung in zwei verschiedene Familien auf struktureller Ebene. Dabei fehlt den Klasse II Rezeptoren das innerhalb der Klasse I konservierte WSXWS-Sequenzmotiv [4]. Innerhalb der Klasse II Zytokinrezeptoren wird nochmals in zwei Subfamilien unterschieden, Interferone und IL-10-artige Zytokine [2]. So divers deren Effekte jedoch sein mögen, wenn man bedenkt, dass IL-10 vor allem antiinflammatorisch wirksam ist und daher eher der Wirkung der INFs entgegensteht, sind beide Zytokinfamilien verwandt. Während die Sequenzen wenig homolog erscheinen, sind es vor allem dreidimensionale, strukturelle Gemeinsamkeiten, welche von den gemeinsamen Ursprüngen zeugen. Insbesondere handelt es sich dabei um die bestimmte Anordnung von sechs α-Helices [5].

#### 1.1.3 Signaltransduktion der Interferonrezeptorkomplexe

Innerhalb der Subfamilie der Interferone existieren drei verschiedene Rezeptorkomplexe, die für die Signalweiterleitung von Typ I, Typ II sowie Typ III Interferonen verantwortlich sind. Dabei zeigen sich Unterschiede in der Signaltransduktion und den vermittelten Effekten (vgl. Abb. 1) [6].

Humane Typ I IFNs sind eine multi-Genfamilie bestehend aus 17 bekannten, strukturell homologen Vertretern. Darunter fallen IFNa mit seinen 13 Subtypen, IFNB, IFNE, IFNK und IFNω [7, 8]. Mäuse besitzen allerdings 14 IFNα Subtypen, IFNβ, IFNε und IFNκ [9]. Alle Typ I IFNs binden an einen heterodimeren Rezeptor, bestehend aus den Untereinheiten Interferon-a/β-Rezeptor (IFNAR) 1 und IFNAR2, die jeweils mit einer Tyrosinkinase (TYK) assoziiert sind, TYK2 oder JAK1 [7]. In dieser Arbeit wurde der murine IFNAR (mIFNAR) zu analytischen Zwecken verwendet. Alle Typ I IFNs, mit Ausnahme von IFNa1 und IFNe, binden mit höherer Affinität zuerst den IFNAR2 [10]. Durch die Ligandenbindung folgt die Aktivierung des JAK-STAT-Weges, dem Hauptsignalweg der Typ I IFN-vermittelten Signalweiterleitung [7, 11]. Es kommt zur gegenseitigen Phosphorylierung der beiden Kinasen und konsekutiv zu der von Tyrosinresten der jeweiligen Rezeptormonomere. An diese phosphorylierten Tyrosinreste können nun STAT1- und STAT2-Moleküle binden. Diese werden ebenfalls phosphoryliert, um als Heterodimer den entscheidenden IRF9 (interferon regulatory factor) binden und so den Komplex ISGF3 (interferon stimulated gene factor) bilden zu können [7, 12, 13]. Dieser transloziert in den Nukleus, wo IRF9 an ISREs (interferon stimulated response element) in der Promotorregion von ISGs (interferon stimulated gene) bindet und so die Genexpression steuert [14]. Aktiviertes STAT1 (pSTAT1) bildet auch Homodimere, um so in den Signalweg von Typ II IFNs einzugreifen, indem GAS-Elemente (interferon y activated sequence) anvisiert werden [7, 15].



Abb. 1: Schematische Darstellung der IFN-Rezeptorkomplexe und Signalwege.

Neben den humanen Vertretern der Typ I, II und III IFNs sind die zugehörigen Rezeptorkomplexe schematisch visualisiert. Typ I IFNs rekrutieren die beiden Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2. sodass diese einen heterodimeren Rezeptorkomplex bilden. Nach Transphosphorylierung der beiden assoziierten Kinasen (TYK2, JAK1) und der konsekutiven Phosphorylierung von Tyrosinen der intrazellulären Domäne, können sich STAT-Moleküle an eben diese anlagern und phosphoryliert werden. STAT1 und -2 bilden Heterodimere und formen zusammen mit interferon regulatory factor 9 (IRF9) den ternären interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3) -Komplex, der wiederrum in den Nukleus transloziert, dort an interferon stimulated response elements (ISREs) in der Promotorregion von interferon stimulated genes (ISGs) bindet und so die Transkription einleiten kann. Über die Formation von STAT1-Homodimeren kann ebenfalls in den Typ II IFN-Signalweg eingegriffen werden. Neben dem hier beschriebenen JAK-STAT-Weg spielen noch weitere Signalwege eine Rolle in der Regulation der Transkription von ISGs, beispielsweise der RAC1/p38 und der PI3K-Signalweg. IFNy leitet die Bildung eines Rezeptorkomplexes aus jeweils zwei Untereinheiten ein, Interferon γ-Rezeptor (IFNGR) 1 und IFNGR2. Diese binden ebenfalls assoziierte Tyrosinkinasen aus der Familie der Januskinasen, JAK1 und JAK2. Wie beschrieben, bilden sich STAT1-Homodimere, die als gamma-interferon activation factor (GAF) im Nukleus an interferon y activated sequence (GAS) -DNA-Motive binden und die Transkription einleiten. In sehr geringem Maße führen Typ II IFNs auch zur Bildung des ISGF3-Komplexes. Typ III IFNs mit ihren vier humanen Vertretern führen zur Dimerisierung der beiden Rezeptoruntereinheiten Interferon  $\lambda$ -Rezeptor (IFNLR) 1 (= IL-28R) und IL-10R $\beta$ . Der nachgeschaltete Signalweg entspricht dem der Typ I IFNs. Modifiziert nach Negishi et al. [6]. Erstellt mit BioRender.com.

Typ II IFNs unterscheiden sich strukturell von Typ I und Typ III. Sie binden einen heterodimeren, ebenfalls mit assoziierten Tyrosinkinasen ausgestatteten Rezeptor, bestehend aus IFNGR (*interferon gamma receptor*) 1 (JAK1) und IFNGR2 (JAK2). Dabei kommt es, wie bei den Typ I IFNs, zur Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT1-Molekülen, die hier Homodimere bilden. Diese werden auch als *gamma-interferon activation factor* (GAF) bezeichnet, binden an GAS-*desoxyribonucleic acid* (DNA) -Motive und leiten so die Transkription ein [6, 7]. Es ist beschrieben, dass IFNγ ebenfalls zur Bildung des ISGF3-Komplexes führt, wenn auch in sehr geringem Umfang [16].

Die Typ III IFNs ähneln strukturell den Typ I IFNs und der IL-10 Familie. Sie sind einem heterodimeren Rezeptorkomplex zugeordnet, der sich zusammensetzt aus dem Interferon- $\lambda$ -Rezeptor (IFNLR) 1, ebenfalls als IL-28-Rezeptor (IL-28R) bezeichnet, als auch dem IL-10-Rezeptor- $\beta$  (IL-10R $\beta$ ), der auch in der IL-10 Familie von Bedeutung ist. Der Signalweg entspricht dem von Typ I IFNs. So kommt es zur Bildung des ISGF3-Komplexes, der im Nukleus an DNA-Sequenzen bindet [8, 17, 18].

#### 1.1.4 Weitere Signalwege der Typ I IFN-abhängigen Immunantwort

Die Typ I Interferon-Antwort ist komplex. STAT1 und -2 Moleküle repräsentieren zwar den wichtigsten und am besten untersuchten Signalweg, doch spielen daneben auch weitere Transkriptionsfaktoren eine Rolle. So können Typ I IFNs bekannterweise zur Phosphorylierung (Aktivierung) von STAT3 bis -6 führen [7, 19]. Interessant ist, dass den unterschiedlichen STAT-Molekülen bestimmte Effekte zugewiesen werden können. So supprimiert pSTAT3 die Typ I IFN-Antwort [20]. PSTAT4 hingegen nimmt eine essenzielle Rolle im Hinblick auf die Produktion von IFNγ bei der murinen Virusabwehr ein, während pSTAT1 einen hemmenden Einfluss auf eben diesen Prozess zu besitzen scheint [21]. Es lässt sich folglich konstatieren, dass der JAK-STAT-Signalweg bei der Typ I Interferon-Antwort zwar grob auf STAT1 und STAT2 runtergebrochen werden kann, doch dieses System von einer darüber hinausgehenden enormen Komplexität und Pleiotropie gekennzeichnet ist [19].

Neben dem JAK-STAT-Weg sind noch weitere Signalkaskaden im Zusammenhang mit der Typ I-abhängigen Signaltransduktion beschrieben. Darunter kommt es zur Aktivierung der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) -Kaskade. MAPKs sind Serin-/Threoninkinasen, die wichtige Signale im Bereich von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zelltod vermitteln. Zu den drei Gruppen gehören die *extracellular-signal-regulated kinases* (ERKs), die *c-Jun amino-terminal kinases* (JNKs) und die p38-Familie [7, 22].

Die GTPase *ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (RAC1) ist in der Lage, über die MAPK p38 viele weitere Signalwege zu aktivieren. So konnte gezeigt werden, dass p38 bedeutsam für die ISGF3- und GAS-abhängige Transkription von ISGs im Rahmen der Typ I IFN-Antwort ist, jedoch interessanterweise keinen Einfluss auf die Formation des ISGF3-Komplexes nimmt. Dies verdeutlicht, dass die RAC1/p38 Signalkaskade unabhängig des JAK-STAT-Weges agiert und trotzdem von nicht unerheblicher Bedeutung für die konsekutive Transkription ist [7, 23, 24].

Es sind noch mehr Signalwege an der IFN-Antwort beteiligt [7]. So stellt der durch Tyrosinkinasen aktivierte Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) -aktivierte Proteinkinase B (AKT) *-mammalian target of rapamycin* (mTOR) -Signalweg eine weitere erwähnenswerte Kaskade dar, die vermutlich an der Expression apoptoseregulierender Gene beteiligt ist [25].

### 1.1.5 Regulationsmechanismen der Typ I IFN-Antwort

Typ I IFN-Rezeptoren finden sich ubiquitär auf allen kernhaltigen Zellen des Menschen [26]. Obwohl alle Polypeptide dieser strukturell homologen Gruppe an denselben Rezeptorkomplex binden, sind deren Effekte doch höchst unterschiedlich. Diese Erkenntnis führt zu der Fragestellung, an welchen Stellgliedern die IFN-Antwort reguliert und modifiziert werden kann.

Die Zellantwort auf die Stimulation mit Typ I IFNs ist unter anderem abhängig vom Zelltyp und den jeweiligen immunologischen-, sowie Pathogen-assoziierten Umgebungsfaktoren [13]. Die drei Ebenen, über die verschiedenste Mechanismen einen regulierenden Effekt ausüben können, sind die Signalproteine, die Transkription und die Translation [13, 27].

Auf Ebene der Signalproteine spielt die Modifikation der Expression von STAT-Molekülen eine Rolle. Zellen sind in der Lage, die Aktivierungsmuster von STAT-Molekülen und damit auch die Transkription von bestimmten Zielgenen über die relative Expressionsstärke ebendieser Transkriptionsfaktoren zu steuern [13]. So kann über vermehrte Bereitstellung von STAT1 eine verstärkte Bildung von STAT1-Homodimeren und damit eine einhergehende Typ I IFN-vermittelte Transkription von IFNγ-assoziierten ISGs mit GAS-Elementen eingeleitet werden [13, 28]. Andererseits können über eine erhöhte Expression von STAT3, welches der STAT1-vermittelten Antwort entgegenwirkt, anti-inflammatorische Effekte gefördert werden [29]. Auch immunologisch und Pathogen-vermittelte Signale beeinflussen die IFN-Antwort. So wird die Formation von STAT1-Homodimeren mittels spezifischer Phosphorylierung durch *inhibitor of NF-\kappaB kinase-\varepsilon* (IKK $\varepsilon$ ) gehemmt. Dadurch werden weniger Homodimere (GAF-Komplexe) und mehr Heterodimere (ISGF3-Komplexe) gebildet, was in der vermehrten Transkription von Typ I IFN-assoziierten Genen resultiert [30].

Neben der Veränderung des Aktivierungsmusters von Signalproteinen kann auch die Signalstärke moduliert werden. Inhibitorische Mechanismen sind Teil einer negativen Feedbackschleife, welche vor allem auf proinflammatorische Zytokine zurückzuführen ist. Toxische Effekte auf den Wirt werden so reduziert, doch liefert dies auch Erregern Angriffspunkte und ermöglicht chronische Infektionen [13]. In der Progression von Tumoren spielen diese Abläufe ebenfalls eine Rolle [31]. So wird das IFN-vermittelte Signal beispielsweise mittels Endozytose von IFNARs abgeschwächt [31]. Zusätzlich regulieren Proteine wie *suppressor of cytokine signalling* (SOCS) die Stärke der Signaltransduktion, indem sie kompetitiv zu den STATs an die IFNARs binden und die JAK-Aktivität hemmen [32-34]. Ein anderes Protein, *ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 18* (USP18) trennt hingegen die Kinase JAK1 von dem IFNAR2 [35]. Stimulatorische Mechanismen sind in den frühen Phasen einer Infektion von Nutzen, wenn nur geringe Konzentrationen an IFN vorliegen. Dazu zählen unter anderem die Expressionssteigerung von STAT1 und IRF9 oder posttranslationale Modifikationen der STATs, die zu einer verstärkten Transkriptionsaktivität führen [13].

Eine Feinabstimmung der IFN-abhängig aktivierten Gene erfolgt ebenso auf Ebene der Transkription und Translation. Wichtig sind besonders IRF-Transkriptionsfaktoren, die mit STAT-Molekülen interagieren. Diese üben einen erheblichen Einfluss auf die Regulation der Transkription von ISGs aus [6, 13]. Translationale Kontrolle im Zusammenhang mit der IFN-Antwort wird beispielsweise durch Proteine wie *protein kinase RNA-activated* (PKR) ausgeübt, welche die gesamte Translation in der Zelle hemmt [36]. Von Bedeutung sind aber auch solche Proteine wie 2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein 1 (OASL1), das spezifisch die Translation von IRF7 hemmt [37].

Anhand der hier aufgeführten Regulationsmechanismen mit beispielhaftem Charakter, soll verdeutlicht werden, welch Komplexität *downstream* des aktivierten IFNAR herrscht. Es finden Veränderungen und Modifikationen des Signals auf verschiedenen Ebenen statt. So kann ein Signal unzählige verschiedene Formen annehmen und situationsgemäß angepasst werden.

# 1.2 Typ I IFNs in Krankheit und Therapie

### 1.2.1 Einteilung der Typ I IFN-abhängigen Effekte

Typ I IFNs werden von verschiedensten Zelltypen sezerniert. Dies sind im Falle von IFNα vor allem Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DC), während IFNβ eher durch Fibroblasten und virusinfizierte Zellen produziert wird [13]. Während Typ I IFNs denselben Rezeptorkomplex bilden, fallen die Effekte sehr unterschiedlich aus. Dies liegt, wie in Punkt 1.1.5 beschrieben, vielen Regulationsmechanismen zugrunde.

Neben diesen Stellgliedern spielen jedoch auch die Zellart, die Oberflächenexpression der IFNARs und die Affinität des jeweiligen IFN an den Rezeptor eine Rolle [6]. Somit kann eine Vielzahl an verschiedenen Effekten erzeugt werden, die sich in robust (robust) und einstellbar (tunable) einteilen lassen [38]. Robuste Eigenschaften, zu denen sicherlich die antivirale Wirksamkeit gehört, können schon durch geringe Mengen an Zytokin aktiviert werden und sind in allen Zellen auslösbar. Sie sind unabhängig von der Oberflächenexpression der IFNARs und der Affinität des jeweiligen IFN. Es wurde beschrieben, dass besonders die damit assoziierten Gene ISREs in ihrer Promotorregion aufweisen [19, 38]. Dies erlaubt den Rückschluss, dass die Aktivierung erwähnter Gene vor allem durch den Hauptsignalweg der Typ I IFNs vermittelt wird. Im Gegensatz dazu, sind einstellbare Gene, die beispielsweise antiproliferative oder immunmodulatorische Effekte vermitteln, zelltypspezifisch. So müssen diese Zellen eine starke Oberflächenexpression an IFNARs aufweisen. Zusätzlich muss eine hohe Konzentration an IFN vorliegen, sowie dessen Affinität entsprechend hoch sein. Gene, die für diese Effekte verantwortlich sind, weisen kaum ISREs auf und sind wohl entsprechend weniger abhängig vom Hauptsignalweg geschaltet [19, 38].

### 1.2.2 Antiviraler Zustand und Einfluss auf das Immunsystem

Die sicherlich bekannteste Hauptfunktion der Typ I IFNs ist die Abwehr viraler Erreger. Dafür erzeugen sie, durch Transkription von ISGs, einen antiviralen Zustand der betroffenen Zelle und ihrer Umgebung. Ein wichtiger Mechanismus ist die erhöhte Expression von *major histocompatibility complex* (MHC) 1-Molekülen auf der Zelloberfläche. Dies erleichtert die Erkennung durch zytotoxische *cluster of differentiation* (CD) 8<sup>+</sup> T-Zellen [39]. Auch wird die Transkription antiviral wirksamer Proteine eingeleitet. So wird neben erhöhtem Abbau an *ribonucleic acid* (RNA) auch die Translation der Zelle gehemmt, um die Replikation des Virus zu verhindern. Dies geschieht unter anderem durch PKR-vermittelte Inhibition des für die Translation essenziellen *eukaryotic translation initiation factor* (eIF) 2A [13, 36].

Neben ISG-vermittelten antiviralen Einflüssen auf die Zelle selbst, wirken Typ I IFNs auch auf das angeborene und adaptive Immunsystem in nicht unerheblichem Maße ein. So übernehmen sie eine wichtige Rolle in der Differenzierung, Reifung und Migrationsfähigkeit von Zellen des angeborenen Immunsystems, wie beispielsweise bei DCs [40]. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass nicht nur der Differenzierungs- und Reifungsprozess dieser Zellen an sich IFN-abhängig ist, sondern auch die Fähigkeit zur Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen über eine erhöhte Oberflächenexpression von MHC1 und -2 gesteigert wird [41, 42]. Ebenso wird die Chemotaxis von DCs über IFN-abhängige Rezeptorexpression gesteigert und somit eine schnellere Rekrutierung dieser Zellen an den Ort der Entzündung gewährleistet [43]. Neben Differenzierung und Funktion von Makrophagen, beeinflussen Typ I IFNs vor allem auch natürliche Killerzellen (NK) [44, 45]. Diese werden sowohl in ihrer Zytotoxizität und Fähigkeit zur IFNγ-Produktion gestärkt als auch in deren Proliferationsverhalten reguliert [46, 47]. Zusätzlich wird die Produktion weiterer Chemokine und Zytokine durch Makrophagen und NK-Zellen, und damit der Verlauf des weiteren Infektionsgeschehens, maßgeblich über IFNs beeinflusst [44, 46].

Neben diesen Komponenten des angeborenen Immunsystems, wirken IFNα und -β auch auf das adaptive Immunsystem ein. Sie stimulieren die Antikörper (AK) -Produktion von B-Zellen und unterstützen diese im Isotypwechsel [48, 49]. Ebenso unterstützen sie CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in deren Differenzierung und Effektorfunktionen als auch bei der Bildung des immunologischen Gedächtnisses. Dementsprechend erleichtern Typ I IFNs unter anderem die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu TH1-Zellen [50]. Des Weiteren ermöglichen sie die klonale Expansion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, deren Differenzierung zu Gedächtniszellen und verstärken deren Zytotoxizität [51, 52]. Typ I IFNs beeinflussen das erworbene Immunsystem noch über viele weitere Mechanismen und nehmen eine wichtige Rolle darin ein.

Zusätzlich zu deren antimikrobiellen Effekten und der Wirkung auf das angeborene und erworbene Immunsystem, sind Typ I IFNs besonders im Rahmen einer anti-Tumoraktivität ins Interesse der Forschung nach Therapieansätzen gegen neoplastische Erkrankungen gelangt [39]. Dabei fußt diese Aktivität wohl auf einer Kombination aus Zellzyklusarrest und Einleitung von Seneszenz und Zelltod [53, 54].

### 1.2.3 Typ II und Typ III IFNs

Typ II IFNs, mit dem einzigen Vertreter IFNγ, werden hauptsächlich von NK-Zellen und CD4<sup>+</sup> TH1-Zellen produziert und nehmen eine zentrale Rolle in der generellen Entzündungsreaktion ein. IFNγ aktiviert antigenpräsentierende Makrophagen, die IL-12 sezernieren. IL-12 und IFNγ sind wiederum wichtig für die Differenzierung von TH1 Zellen. Dieser Rückkopplungskreis führt zu der IL-2 abhängigen Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen durch TH1-Zellen. Somit dient diese TH1-Antwort der Abwehr intrazellulärer Pathogene wie Virusinfektionen, Pilzen, atypischen Bakterien, aber auch Tumoren. Im Gegensatz dazu, steht die durch IFNγ inhibierte TH2-Antwort, die zur Differenzierung von Plasmazellen führt und somit der Abwehr von extrazellulären Bakterien und Parasiten dient. Die TH2-Zellen inhibieren mit IL-4 wiederum die TH1-Differenzierung [55].

Die Typ III IFNs, zu deren Vertretern IFNλ1 bis -4 gehören, sind vor allem in epithelialen Geweben von Bedeutung. Auch hier stehen antivirale Effekte, vermittelt durch ISGs, im Vordergrund. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass diese IFN-Klasse auch in anderen Geweben antiviral aktiv ist [8].

# 1.2.4 Die Rolle von Typ I IFNs bei Krebserkrankungen und chronischen Virusinfektionen

In den vergangenen Jahren wurde von Typ I IFNs aufgrund ihrer bekannten antiviralen, antiproliferativen und immunmodulatorischen Eigenschaften ein vielversprechender therapeutischer Nutzen erhofft. Die Ergebnisse waren jedoch ernüchternd, da die Nebenwirkungen einer systemischen Applikation für viele Patienten enorm schwer zu ertragen waren und der Nutzen in der Therapie sowohl chronisch viraler Infektionen als auch neoplastischer Erkrankungen limitiert war [56, 57].

So wurde die ehemalige *first-line* Therapie der chronischen Infektion mit dem Hepatitis C Virus (HCV) mit IFNa und dem Virostatikum Ribavirin durch neuere Virostatika, sogenannte *direct antiviral agents* (DAAs), abgelöst. Sie kommt nur noch in Ausnahmefällen zur Anwendung, da das Nebenwirkungsprofil und die Effektivität der Interferon-basierten Therapie nicht ausreichend waren [58]. Auch die Rolle der Applikation von IFNs in der Therapie von Krebs nimmt stetig ab [39], was wohl an der nicht konsistenten Effektivität liegen mag. Bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) zeigte sich, obwohl die Therapie heutzutage auf Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) beruht, ein erhöhtes Gesamt-überleben bei Nutzung von Typ I IFNs in einer Kombinationstherapie [59]. Ähnlich zeigten sich einige positive Effekte auf das Überleben von Patienten mit multiplem Myelom, doch auch diese Therapie wurde inzwischen abgelöst [60, 61]. Bei soliden Tumoren präsentieren sich variable Auswirkungen. Demnach indizierten Typ I IFNs bei der Therapie des malignen Melanoms positive Effekte [62], während sie bei Brust- und Ovarial-krebs ein geringes Ansprechen bei hoher Toxizität zur Anschauung trugen [63].

Diese kontroversen Therapieeffekte weisen darauf hin, dass Interferone nicht nur positive, die Krankheit eindämmende Eigenschaften besitzen. Viel mehr zeigt sich, dass chronisch niedrige Level von Typ I IFNs zu einer dysregulierten Immunantwort führen. So könnten negative Feedback-Mechanismen der chronischen IFN I-Antwort eine Schlüsselrolle in der Persistenz chronischer Infektionen, aber auch in der Immunevasion von Tumorzellen einnehmen [64]. Diese gegenregulatorischen Maßnahmen sind evolutionär wohl in der Vermeidung immunpathologischer Prozesse nach Eradikation eines Pathogens begründet.

Immunsuppressive Mechanismen der IFN I-Antwort sind beispielsweise die Expression von *programmed cell death-ligand 1* (PD-L1), IL-10 und Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) durch Immun- und Krebszellen [65, 66]. Dabei fördern Typ I IFNs die Entstehung spezieller, immunregulatorischer DCs und Makrophagen, die die inhibitorischen Faktoren IL-10, PD-L1 und IDO exprimieren und eine antivirale T-Zellantwort supprimieren [65, 67]. Gleichzeitig wird die Gesamtmenge an DCs verringert [65]. Der Einfluss auf chronische Infektionen stellt sich an einem *chronic lymphocytic choriomeningitis virus* (LCMV) -Modell dar. Nach Inhibition des Typ I IFN-Signals wurde eine signifikante Abnahme an IL-10 und PD-L1-Expression von DCs und Makrophagen beobachtet und die Infektion konnte besser unter Kontrolle gebracht werden [64, 68, 69]. Bei Krebszellen scheinen diese Mechanismen eine Abschwächung der Wirkung von neuen Therapeutika wie *checkpoint*-Inhibitoren zu bewirken [64, 70, 71].

Viren und Tumorzellen scheinen also die negativen Feedbackmechanismen der Typ I IFNs für sich nutzen zu können. Bei chronischen Virusinfektionen als auch bei Krebszellen lässt sich eine gewisse Toleranz gegenüber IFNs beobachten, die wohl auf die chronische Exposition und die damit einhergehende veränderte Signalantwort im Hinblick auf Rückkopplungsmechanismen und andere Faktoren zurückzuführen ist. Eine simple Gabe von IFN scheint hier nicht produktiv zu sein.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass Typ I IFNs neben ihren klassischen proinflammatorischen Signalen, die essenziell für eine effektive Immunantwort sind, auch zahlreiche direkte und indirekte Rückkopplungs- und Toleranzmechanismen in Gang setzen, die eine chronische Erkrankung aufrechterhalten können. Diese ambivalente Rolle des Zytokins macht eine einfache Blockade oder medikamentöse Gabe schwierig und erfordert wohl eine komplexere, spezifische Modulation. Um die Entstehung einer dysregulierten Immunantwort zu umgehen, muss genauer erforscht werden, wie sich diese Mechanismen etablieren und wie sie beeinflusst werden können.

#### 1.2.5 Typ I IFNs und Autoimmunerkrankungen

Typ I IFN greifen in vielfältiger Weise in die Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort ein. Dabei sind ihre immunstimulatorischen Effekte normalerweise streng reguliert und zahlreiche gegenregulatorische Rückkopplungsmechanismen verhindern eine über das Ziel hinausschießende Entzündung, die in eine autoimmune Reaktion münden könnte. Viele Entdeckungen im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen weisen auf eine zentrale Bedeutung der Typ I IFNs hin [72]. So ist die IFN I-Therapie mit einem verstärkten Auftreten von Autoantikörpern und Autoimmunerkrankungen verknüpft, während Patienten mit bestehender autoimmuner Erkrankung unter IFN I-Gabe eine Exazerbation erfuhren [73, 74]. Neben der Entdeckung, dass viele Menschen mit Autoimmunerkrankungen erhöhte Serumspiegel an IFNa aufweisen, konnte in betroffenen Geweben eine erhöhte IFN-Signatur, beschreibend für die Expression bestimmter Muster von ISGs, demonstriert werden [72]. Diese Hinweise wurden unter anderem bei Erkrankungen wie der Psoriasis, dem Sjögren-Syndrom, der Systemischen Sklerose und der Dermatomyositis beschrieben [75-78]. Rönnblom et al. [72] visualisieren an einem Erklärungsmuster des systemischen Lupus erythematodes (SLE), welches stellvertretend für viele andere Autoimmunerkrankungen steht, die Kettenreaktion einer IFN I-vermittelten chronischen Entzündung. Ausgelöst durch einen ursprünglichen Infekt, kommt es zur B-Zell-vermittelten Bildung von Autoantikörpern gegen freigesetzte intrazelluläre Bestandteile apoptotischer und nekrotischer Zellen. So formen sich Immunkomplexe (ICs), bestehend aus AK und Autoantigenen, welche die IFN I-Synthese durch plasmazytoide DCs (pDCs) triggern. Dies führt zu der Aktivierung von B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen, die zusammen mit verminderter apoptotischer clearance, die sich typischerweise bei SLE nachweisen lässt, die Generierung weiterer ICs fördern und so zu einer dauerhaften IFN I-Produktion führen [79].

So nennt die Arbeitsgruppe drei mögliche Kausalitäten für die erhöhte IFN I-Produktion und konsekutive Signatur. Zum einen kommt es, wie das Pathogenesemodell des SLE zur Anschauung bringt, zu einer IC-vermittelten Aktivierung von pDCs, den Hauptproduzenten von IFN I, indem in den ICs enthaltene Nukleinsäuren die *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) der pDCs aktivieren und somit die IFN-Synthese fördern [80]. Zum anderen wird eine Prädisposition gegenüber der IFN I-Produktion und -Antwort beschrieben [81]. Zuletzt wurde eine mangelhafte Suppression der IFN I-Antwort genannt, wie sie beispielsweise bei Patienten mit SLE zu finden ist [82].

Diese Erkenntnisse führten zu den Versuchen, die einzelnen Agenzien zielgerichtet auszuschalten. Dementsprechend trugen in klinischen Studien untersuchte monoklonale AK gegen IFNa zu einer Verringerung der Krankheitsaktivität bei und eine gegen den IFNAR gerichtete Therapie zeigte ebenso erfolgreiche Ergebnisse [83-85]. Allerdings führte die Hemmung dieses Schlüsselspielers in der antiviralen Immunantwort zu einer signifikant erhöhten Infektanfälligkeit. Ebenso ist die Therapieeffektivität abhängig von der Patientensubgruppe, was suggeriert, dass viele weitere Faktoren, die noch näher erforscht werden müssen, die Krankheit mitmodulieren [85]. Weitere Ziele der zielgerichteten Therapie waren die TLRs, pDCs, sowie Moleküle der Signalübertragung zwischen pDCs und B-, beziehungsweise NK-Zellen [86-89].

Ziel der Therapieentwicklung gegen Autoimmunerkrankungen dieses Typs sollte es also sein, eine Modulation der Interferonantwort zu erreichen, sodass die chronische Entzündung unterdrückt werden kann, ohne die antiviralen Schutzmechanismen außer Kraft zu setzen. Gleichzeitig müssen die unterschiedlichen Subgruppen der Erkrankungen näher analysiert und unterschiedlich therapiert werden, da das genaue Zusammenspiel bei der Aufrechterhaltung der Pathologien zu variieren scheint [72].

# 1.3 Synthetische biochemische Systeme

### 1.3.1 Synthetische Zytokinbiologie

Die synthetische Biologie beruht auf der Annahme, dass einzelne zelluläre Bestandteile getrennt und wieder nach einem bestimmten Konzept rekonstruiert werden können [90]. So können synthetische Systeme erzeugt werden, die unterschiedlichsten wissenschaftlichen und medizinischen Nutzen erweisen, der hier noch thematisiert werden soll.

# 1.3.2 *Nanobodies* und fluoreszierende Proteine als Teile eines synthetischen biochemischen Systems

Bei den in dieser Arbeit generierten synthetischen Rezeptoren wurde die extrazelluläre Domäne der unveränderten Rezeptoren vom Wildtyp (wt) durch einen extrazellulären *nanobody* ersetzt. Dieser war gegen die fluoreszierenden Proteine GFP (*green fluorescent Protein*) oder mCherry gerichtet (vgl. Abb. 7).

Menschliche AK sind heterotetramäre Proteine, bestehend aus zwei leichten und zwei schweren Ketten (vgl. Abb. 2). Im Falle des Immunglobulins G (IgG) weisen schwere und leichte Kette jeweils eine variable Region (VH) auf, während die schwere Kette aus drei konstanten Domänen (CH1-3) und die leichte Kette aus nur einer besteht. Die variablen Regionen, bestehend aus je drei *complementary determining regions* (CDR) von schwerer und leichter Kette, bilden je zwei identische Antigenbindungsstellen, sogenannte Paratope [91]. Kamele und Knorpelfische weisen hingegen auch AK auf, die nur aus zwei schweren Ketten bestehen, sogenannte *heavy-chain only antibodies* oder auch schwere-Ketten-Antikörper. Eine einzelne variable Domäne dieser speziellen AK wird als Einzeldomänen-AK oder auch *nanobody* bezeichnet. Bei Kamelen spricht man dabei

von einer variable domain of heavy-chain only antibody (VHH) und bei Haien von einer variable domain of new antigen receptor (VNAR) (vgl. Abb. 2). Nanobodies haben dank ihrer besonderen Eigenschaften in den letzten Jahren an enormer Relevanz in Forschung und Medizin gewonnen [91]. Im Vergleich zu konventionellen AK weisen sie aufgrund einer erhöhten Anzahl an polaren und geladenen AS eine höhere Löslichkeit auf [92], sind stabiler und aufgrund ihrer geringen Molekularmasse besser zur Gewebepenetration befähigt [93]. Ihre extra lange CDR3-Region ermöglicht die Bindung weitaus komplexerer und größerer Epitope wie katalytische Zentren von Enzymen [94-97]. Trotz der bestehenden Homologie zwischen der VHH des Kamels und der humanen VH, existieren inzwischen verschiedene Humanisierungsansätze, die Immunreaktionen minimieren sollen [98-100]. So könnten fremde Epitope der VHHs eine Immunantwort des Körpers bei Applikation auslösen, beispielsweise im Rahmen eines therapeutischen Gebrauches. Beschrieben ist die Bildung von sogenannten antidrug antibodies, welche dem Patienten durch übermäßige Immunreaktionen schaden könnten, nicht nur durch das Ausschalten der therapeutischen Antikörper, aber auch mögliche autoimmune Kreuzreaktionen [101].



#### Abb. 2: Schematische Darstellung von humanem IgG und heavy-chain only antibodies.

Humaner IgG-Antikörper (links, lila) im Vergleich zum *heavy-chain only antibody* der Haie (Mitte, blau) und der Camelidae (rechts, grün). Der humane IgG-Antikörper besteht aus zwei leichten Ketten mit je einer konstanten (CL) und einer variablen (VL) Domäne, die über Disulfidbrücken (grauer Strich) mit zwei schweren Ketten verbunden sind. Die schweren Ketten bestehen aus je drei konstanten Domänen (CH1-3) und einer variablen (VH). In der Mitte des Antikörpers befindet sich eine Gelenkregion aus Disulfidbrücken (graue Striche). Der *heavy-chain only antibody* der Camelidae und Haie besteht nur aus zwei schweren Ketten, wobei der Antikörper der Camelidae zwei (CH1-2) und der der Haie fünf (CNAR1-5) konstante Domänen aufweist. Beide besitzen nur eine variable Domäne, die *variable domain of heavy-chain only antibody* (VHH, Camelidae) und die *variable domain of new antigen receptor* (VNAR, Hai). Diese variable Domäne wird separat auch als *nanobody* bezeichnet und ist am Beispiel des VHH aufgeführt (rechts, grün). Modifiziert nach Wesolowski et al. [94]. Erstellt mit BioRender.com.

Mehrere fluoreszierende Proteine sind heute von großer wissenschaftlicher Bedeutung und erlauben es, beispielsweise als Biosensoren viele Aspekte komplexer biochemischer Vorgänge in Zellen zu beobachten und kontrollieren [102]. Extrahiert aus der Qualle *Aequorea victoria* [103], ist das hier verwendete GFP der wohl bekannteste Vertreter der fluoreszierenden Proteine. Neben anderen modifizierten Formen, ist das *enhanced* GFP (EGFP) [104], welches auch in dieser Arbeit zum Einsatz kam, weitest-gehend Standard im wissenschaftlichen Gebrauch geworden [105]. Dieses fluoresziert stärker als der Wildtyp und eignet sich daher besser zur Detektion [106]. Ein Mitglied der *mFruits family of monomeric red fluorescent proteins*, mCherry, entstammt ursprünglich Scheibenanemonen der Gattung *Discosoma* [107].

# 1.3.3 Bedeutung und Ausblick synthetischer biochemischer Systeme in Forschung und Therapie

Durch methodische Fortschritte in der Forschung und neue Erkenntnisse pathophysiologischer Prozesse, gewann die synthetische Zytokinbiologie in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Verschiedenste Ansätze auf diesem Feld fokussieren sich auf die vielseitigen Modifikationsmöglichkeiten von Liganden natürlicher Rezeptoren als auch auf die Erstellung synthetischer Zytokin/Zytokinrezeptorsysteme [108].

Synthekine (vgl. Abb. 3C) bestehen aus mutierten Varianten natürlicher Zytokine, sogenannten dominant negativen Zytokinen, die jeweils nur eine ihrer beiden Rezeptoruntereinheiten binden können. Die gezielte Fusion zweier solcher Mutanten zu einem Synthekin erlaubt die Rekrutierung beliebiger Rezeptoruntereinheiten und damit auch die Erstellung neuartiger, nicht physiologischer Rezeptorkombinationen [109].

In anderen Ansätzen wurden Immunzytokine generiert, indem Zytokine an Antikörper oder *nanobodies* gekoppelt wurden, die tumorspezifische Antigene erkennen, um durch zielgerichteten Transport systemische Nebenwirkungen zu vermeiden (vgl. Abb. 3A) [110]. So konnte IL-2, gebunden an einen AK für eine tumorspezifische Fibronektin-Isoform, gezielt in die Tumormikroumgebung gelangen, um dort das Wachstum zu verlangsamen [111].

Neben Modifikation von Liganden, können auch Rezeptoren verändert werden. In der Natur vorkommende, konstitutiv aktive Zytokinrezeptoren sind für viele Zytokine beschrieben [2]. Sie sind Grundlage pathogenetischer Konzepte, wie der Entstehung von Krebs bei der EGFR-Familie [112]. Synthetische, konstitutiv aktive Rezeptoren können dabei als Werkzeuge für die Erforschung der molekularen Mechanismen hinter diesen Phänomenen dienen und somit zu der Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte beitragen [2]. Andererseits gab es auch schon Ansätze diese Rezeptoren selbst in einem therapeutischen Rahmen zu nutzen. Dabei wurde ein konstitutiv aktiver IL-7R in

*chimeric antigen receptor* (CAR) -T-Zellen (vgl. S. 16) eingebracht, sodass eine erhöhte Proliferations- und Überlebensrate als auch anti-Tumoraktivität beobachtet wurde [113]. Nichtsdestotrotz sind diese Zytokinrezeptoren nicht steuerbar, sondern eben dauerhaft aktiv und nur schwer spezifisch zu beeinflussen, da die unveränderten Rezeptoren in einem Organismus bei medikamentöser Applikation von Inhibitoren mitbetroffen sind [2]. Extra- und intrazelluläre Domänen von Zytokinrezeptoren können untereinander kombiniert werden. So wurden bereits 1993 synthetische Rezeptoren bestehend aus der *extracellular domain* (ECD) des Erythropoietin (EPO) -Rezeptors (EPOR) und der ICD (*intracellular domain*) des Glykoprotein 130 Rezeptors (gp130) generiert (vgl. Abb. 3B). Hierbei muss allerdings die Kreuzreaktion des physiologischen Liganden EPO an seine natürlichen Bindungsstellen berücksichtigt werden, was bei einer medikamentösen Applikation, beispielsweise durch Erhöhung des Hämatokrits, durchaus Potenzial für kariovaskuläre Nebenwirkungen besitzt [114, 115]. Darüber hinaus war die Rezeptorzusammensetzung in diesem Modell auf die Bildung von Homodimeren limitiert [116, 117].



#### Abb. 3: Forschungsansätze der synthetischen Zytokinbiologie.

Die Abbildung stellt verschiedene Ansätze der synthetischen Zytokinbiologie dar. A Immunzytokine sind Zytokine (blau), die an einen Antikoner (rot) gekoppelt werden. Das Immunzytokin kann so die Rezeptoren (lila), die an einen Antikoner (rot) gekoppelt werden. Das Immunzytokin kann so die Rezeptoren (lila), die an einen Antikoner (rot) gekoppelt werden. Das Immunzytokin kann Antikörper bindes (Zurzze, e., rot). B Dargestellt sind der Erythropoietin-Rezeptor (EPOR) (rot, mittig), als auch (Curzze, e., rot). B Dargestellt sind der Erythropoietin-Rezeptor (EPOR) (rot, mittig), als auch (Curzze, e., rot). B Dargestellt sind der Erythropoietin-Rezeptor (EPOR) (rot, mittig), als auch (Curzze, e., rot). B Dargestellt sind der Erythropoietin-Rezeptor (EPOR) (rot, mittig), als auch (Curzze, e., rot). B Dargestellt sind der Erythropoietin-Rezeptor (EPOR) (rot, mittig), als auch (Curzze, e., rot). B Dargestellt sind der Erythropoietin-Rezeptor (EPOR) (rot, mittig), als auch (Curzze, e., rot). B Dargestellt sind der Erythropoietin-Rezeptor (EPOR) (rot, mittig), als auch (Curzze, e., rot). B Dargestellt sind der Erythropoietin-Rezeptor (EPOR) (rot, mittig), als auch (Curzze, e., rot). Dieser erkannte EPO als Liganden, doch leitete die Signaltransduktion des gp130 ein. C Ein Synthekin (blau/orange, mittig) besteht aus zwei mutierten Zytokinen A (blau, links) und B (orange, rechts), sogenannten dominant negativen Varianten. Bei diesen Varianten wurde eine der zwei Bindungsstellen (1 und 2) durch Mutation eliminiert. Zu einem Synthekin zusammengefügt können so unterschiedliche Rezeptorkombinationen exploriert werden. Erstellt mit BioRender.com. Ein Durchbruch in der synthetischen Biologie war die Zulassung der CAR-T-Zelltherapie durch die U.S. Food and Drug Administration (FDA) im Jahr 2017 [108, 118]. Innerhalb eines Jahres wurden zwei Therapien, Tisagenlecleucel und Axicabtagen Ciloleucel, für die Behandlung der akuten B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) und des diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), jeweils im rezidivierten oder refraktären Stadium, zugelassen [119-121]. Hierbei werden dem Patienten T-Zellen per Plasmapherese entnommen und ex vivo, anhand retroviraler Transduktion, die cDNA für den CAR eingebracht. Dieser weist extrazellulär das single chain variable fragment (scFv) eines monoklonalen AK auf, welches gegen das B-Zell-spezifische Antigen CD19 gerichtet ist. Die transmembranäre Domäne verbindet dieses AK-Fragment mit einer intrazellulären T-Zell-Rezeptor Signaldomäne, die typischerweise aus CD3 und weiteren kostimulatorischen Molekülen wie CD27, CD28 oder 4-1BB besteht. Die Zellen werden ex vivo expandiert und nach erfolgter lymphodepletierender Chemotherapie wieder in den Patienten infundiert. Nun können die T-Zellen, dank des synthetischen Rezeptors, die Tumorzellen in vivo binden und eliminieren [108, 122, 123]. Trotz der bisherigen Erfolge ist die CAR-T-Zelltherapie mit schweren Nebenwirkungen wie starker Neurotoxizität oder dem cytokine release syndrome (CRS) verbunden [122, 124, 125]. Darüber hinaus ist die Ansprechrate bei soliden Tumoren nur begrenzt [126]. Die Therapie wird dabei, neben Mechanismen wie dem Tumorantigen-escape, vor allem von der immunsuppressiven Mikroumgebung des Tumors negativ beeinflusst. In diesem Rahmen spielen, wie bereits erläutert, auch IFNs eine entscheidende Rolle. Neue Therapieansätze zielen darauf ab, armoured CARs zu generieren, die diese Immundysfunktion umgehen können [119]. Ein Beispiel dafür sind CAR-T-Zellen, die IL-18 sekretieren oder CD40L exprimieren [127, 128]. Trotz der bisher einschränkenden negativen Aspekte der CAR-T-Zelltherapie, wie etwa Nebenwirkungen, geringe Anwendungsbreite oder hohe Kosten, stellt sie ein Erfolgskonzept der synthetischen Biologie mit enormem Potential dar. In den nächsten Jahren wird diese Therapie wohl im Hinblick auf Effektivität und Anwendungsmöglichkeiten erweitert werden, wie neben verschiedenen Modifikationsansätzen auch vielversprechende Versuche bei anderen Krankheitsentitäten, wie dem multiplen Myelom, zeigen [119, 129].

# 1.4 Ziele der Arbeit

Neben einer Fülle an verschiedenen Ansätzen in der synthetischen Zytokinbiologie ist besonders die Generierung vollkommen synthetischer Zytokin/Zytokinrezeptorsysteme hervorzuheben. Die Arbeitsgruppe Scheller konstruierte SyCyRs (*synthetic cytokine*  *receptor*) der IL-6 und IL-12 Rezeptorfamilie (vgl. Abb. 4). Deren ECD wurde, entsprechend dem Vorgehen in dieser Arbeit, gegen einen GFP-, beziehungsweise mCherrybindenden *nanobody* ausgetauscht. Somit konnten GFP-mCherry-Fusionsproteine (GC) die Rezeptoren rekrutieren und die natürliche Signaltransduktion weitestgehend imitieren. Dieses System erwies sich zudem als exzellent schaltbar, indem Fusionsproteine aus gegen die Liganden gerichteten *nanobodies* mit den Rezeptoren um die Liganden konkurrierten und somit eine kompetitive Inhibition der Aktivität erreicht wurde [130].



Abb. 4: Der synthetische gp130-Rezeptor.

Bei gp130 wurde die extrazelluläre Domäne gegen einen *nanobody* (G<sub>VHH</sub>, grün) ausgetauscht, welcher GFP erkannte. Die intrazelluläre und transmembranäre Domäne blieb unverändert (gp130, schwarzer Strich und lila Box). Somit konnte ein Fusionsprotein aus zwei GFP (grün, rund) eine Rezeptordimerisierung und konsekutive Signaltransduktion über den JAK-STAT-Weg einleiten [130]. Erstellt mit Biorender.com.

Auf diese Weise können Einschränkungen überwunden werden. Zu nennen wäre die mangelnde Steuerbarkeit der Rezeptorzusammensetzung und die Schaltbarkeit bei den konstitutiv aktiven Rezeptoren oder die Kreuzreaktivität des EPO bei den synthetischen EPO-gp130-Fusionsproteinen. Das SyCyR-System lässt sich spezifisch aktivieren und ausschalten. Es erlaubt, je nach Konstruktion der Liganden, eine gezielte Rekrutierung der Rezeptoruntereinheiten und damit die Konstruktion völlig neuer Rezeptorkombinationen. Der Ligand ist dabei hintergrundfrei und nicht-physiologisch, sodass keine ungewollten Signalwege aktiviert werden. So würde eine medikamentöse Applikation der fluoreszierenden Proteine ebenfalls ohne Nebenwirkungen auskommen. Damit haben diese exzellent steuerbaren Systeme das Potential ein wertvolles Werkzeug zu sein, im Hinblick auf die Erforschung von Zytokin/Zytokinrezeptorinteraktion, von der Signaltransduktion über Rezeptoraktivität bis hin zur zellulären Antwort. Darüber hinaus könnten sie eine wichtige Rolle in der Optimierung von Immuntherapien, wie der CAR-T-Zelltherapie, einnehmen. Engelowski *et al.* [130] stellten fest, dass zwischen SyCyRs

und deren korrespondierenden unveränderten Rezeptoren der IL-6/IL-12-Rezeptorfamilie ein hoher Grad an Übereinstimmung herrscht. Jedoch muss die Auswirkung der Modifikation natürlicher Rezeptoren und deren Stimulation mit synthetischen Liganden für jedes Zytokin/Zytokinrezeptorsystem gesondert überprüft und evaluiert werden. Es handelt sich schließlich um komplexeste molekularbiologische Mechanismen, die nur schwer vorausschaubar sind und viele Unsicherheiten mit sich bringen.

Eben deshalb ist es das Ziel dieser Arbeit, die synthetische Zytokinbiologie in ihrer Auswirkung auf die Signaltransduktion der Interferon-α/β-Rezeptoren als Subgruppe der Klasse II Zytokinrezeptoren hin zu analysieren und damit zur Ausweitung der Anwendungsmöglichkeiten dieser vielversprechenden Technologie beizutragen.

Dafür soll die cDNA für den synthetischen und den natürlichen Rezeptor in verschiedene Expressionsvektoren kloniert und anschließend in verschiedene Zelllinien eingebracht werden. Mittels Western Blot sollen die Signalproteine untersucht und anhand von *realtime* PCR und *microarray* die Genexpression verglichen werden. Neben der Analyse des Proliferationsverhaltens mittels Proliferationsassay, werden Mutations und Deletionsvarianten erstellt, welche zur Untersuchung der einzelnen STAT-Bindungsstellen dienen. Auch unkonventionelle Rezeptorkombinationen werden getestet, indem verschiedene multimere, synthetische Liganden zur Anwendung kommen.

Die wissenschaftlichen und therapeutischen Möglichkeiten, die aus einer freien Steuerbarkeit der Interferonantwort resultieren würden, sind enorm. Besonders die Gruppe der Interferone stellt mit ihren ambivalenten Effekten eine wichtige Entität zur personalisierten Modifikation von Tumormikroumgebungen, chronischen Infektionen und autoimmunen Prozessen dar, welche sich nach heutigem Stand der Medizin, oft der therapeutischen Kontrolle entziehen.

# 2 Material und Methoden

# 2.1 Material

## 2.1.1 Chemikalien, Lösungen, Puffer und Medien

In den Tabellen 1, 2 und 3 sind die im Rahmen dieser Doktorarbeit zur Anwendung gekommenen Chemikalien, Lösungen, Puffer und Medien sowie Angaben zu deren Zusammensetzung aufgeführt. Für die Herstellungen der Lösungen und Puffer wurde destilliertes Wasser (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) verwendet. Autoklaviert wurde bei 120°C und 2 bar für 20 min.

Chemikalie	Hersteller
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Bromphenolblau (BPB)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Complete <sup>™</sup> Protease Inhibitor Cocktail Tab- lets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
dNTP Mix (25 mM)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Fetal calf serum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Glukose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
HD-Green	INTAS, Göttingen, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumacetat (CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> K)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCI)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland

### Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Loading-Dye Solution (6x)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Magermilchpulver (blotting grade)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
NP-40	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Orange G	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Rotiphorese®-Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris	Bethesda Research laboratories, New Jer- sey, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypan Blue Dye 0,4%	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
TurboFect <sup>™</sup> Transfektionsreagenz	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

#### Tabelle 2: Zusammensetzung der erstellten Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
5 x Lämmli-Puffer	50% Glycerol
	10% SDS
	5% β-Mercaptoethanol
	125 mM Tris-HCl
	1 Spatelspitze Bromphenolblau
BSA-Lösung	5% BSA in TBS-T
FACS-Puffer	1% BSA in PBS
Ladepuffer (Orange-G)	30% Glycerin
	50 mM EDTA
	0,25% Orange G

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Laufpuffer	25 mM Tris-HCL (pH 8,3) 0,1% SDS 192 mM Glycin
Lysepuffer pJAK2	1 complete® Proteaseinhibitor Tablette auf 50 ml 150 mM NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 0,5 mM EDTA 10 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 0,5% NP-40
Lyse-Puffer pSTAT3	1 complete® Proteaseinhibitor Tablette auf 50 ml 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1 mM NaF 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 1% NP-40 1% Triton X-100
Milchlösung (Western Blot)	5% Milchpulver in TBS-T
Phosphate-buffered-saline (PBS)	1,5 mM KH₂PO₄ 8,1 mM Na₂HPO₄ 2,7 mM KCl 137 mM NaCl, (pH 7,4)
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, (pH 6,8) 0,4% SDS
Solution 1 (S1)	25 mM Tris-HCl, (pH 8,0) 10 mM EDTA, (pH 8,0) 1:1000 RNase
Solution 2 (S2)	0,2 M NaOH 1% SDS
Solution 3 (S3)	5 M Kaliumacetat (CH₃CO₂K) 11,5 ml Essigsäure (CH₃COOH)
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 0,1% β-Mercaptoethanol 2% SDS
TBS-T	200 mM Tris-HCI (pH 7,5) 5 M NaCl 0,05% Tween20
Transferpuffer	250 mM Tris-HCI, (pH 8,0) 0,01% SDS 2 M Glycerin 5% Methanol

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4% SDS
Tris-buffered-saline (TBS)	200 mM Tris-HCl pH 7,5 5 M NaCl
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	0,4 M Tris-HCl pH 8,8 0,01 M EDTA 0,2 M Essigsäure (CH₃COOH)
Trypsin/EDTA-Lösung	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Deutschland

#### Tabelle 3: Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
Dulbecco's Modified Ea- gle Medium (DMEM <sup>-/-</sup> )	high Glucose (4,5 g/L) with stable Glutamine	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMEM <sup>+/+</sup>	60 mg/l Penicillin 100 mg/l Streptomycin 10% FCS	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>Lysogeny-broth-</i> Medium (LB-Medium)	1% NaCl 0,5% Hefeextrakt Trypton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar	1% NaCl 0,5% Hefeextrakt Trypton 1,5% Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.2 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sowie zugehörige Puffer wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH (St. Leon-Roth, Deutschland) bezogen.

### 2.1.3 Kits, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Im Folgenden sind genutzte Kits, Verbrauchsmaterialien und Geräte dargestellt (Tabellen 4, 5 und 6).

Kit	Hersteller
BCA Protein-Assay-Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	CellTiter-Blue Cell Viability Assay
GeneJET Plasmid-Miniprep-Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Immobilon® Western HRP Substrat	Merck Millipore, Burlington, USA
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

Tabelle 4: Liste der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
RNeasy purification Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland

#### Tabelle 5: Auflistung der genutzten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Einwegpipetten	Corning incorporated, New York, USA
Einwegpipettenspitzen	StarLab, Hamburg, Deutschland
Whatman-Paper	Bio-Rad, Hercules, USA
Falcon Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Nitrilhandschuhe	Ansell, München, Deutschland
Pasteurpipette (Glas)	Sarstedt, Inc., Nümbrecht, Deutschland
PCR-Caps	StarLab, Hamburg, Deutschland
PCR-Tubes	StarLab, Hamburg, Deutschland
Petrischale 10 cm für adhärente Zellen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Petrischale 10 cm für Bakterien, nicht-ad- härente Zellen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
PVDF-Membran	VWR International BVBA, Darmstadt, Deutsch- land
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
TC10 <sup>™</sup> System Dual-Chamber Counting Slides	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutsch- land
Zellkulturschale 12-well-Platte	StarLab, Hamburg, Deutschland
Zellkulturschale 6-well-Platte	StarLab, Hamburg, Deutschland
Zellkulturschale 6- <i>well</i> -Platte für adhä- rente eukaryotische Zellen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale 96-well-Platte	StarLab, Hamburg, Deutschland
Zellkulturschale 96- <i>well</i> -Platte für adhä- rente Zellen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

Gerät	Herkunft
Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Sys- tems	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Analysewaage Percisia 100M-300c	Precisia, Hartenstein, Deutschland
Autoklav Laboklav 25	SHP Steriltechnik AG, Detzel- Schloss/Satuelle, Deutschland
BD FACSCanto <sup>™</sup> II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

#### Tabelle 6: Geräteliste
Gerät	Herkunft
Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ChemoCam Imager	INTAS, Göttingen, Deutschland
CO2-Inkubator HERAcell® 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gefrierschrank Forma® 900	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Geldokumentationssystem Gel iX Imager	INTAS, Göttingen, Deutschland
Gelkammer für Agarosegele	Bio-Rad, München, Deutschland
Hitzebad Julabo sw21	julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
IKA Minishaker MS2	IKA, Staufen, Deutschland
Infinite® M200 Pro Multimode Microplate Reader	Tecan, Männedorf, Deutschland
Inkubator Hera Cell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Rostock, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Köln, Deutschland
Mikropipetten Research®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle Optiquick	Moulinex, Offenbach, Deutschland
MiniProtean® TetraCell	Bio-Rad, München, Deutschland
Minizentrifuge D-6015	neoLab, Heidelberg, Deutschland
NanoDrop <sup>™</sup> 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Oberschalenwaage EW 2400 2NM	Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
PeqStar 2X Gradient Thermocycler	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlan- gen, Deutschland
pH-Messgerät	Sartorius, Ratingen, Deutschland
Pipetus®-Akku	HIRSCHMANN, Eberstadt, Deutschland
PowerPac <sup>™</sup> HC	Bio-Rad, München, Deutschland
Rollenmischer SRT 9D	Bibby Scientific, Staffordshire, England
Schüttelinkubator Infors HT Multitron®	Biotron, Hilden, Deutschland
Spannungsquelle PowerPac Basic™	Bio-Rad, München, Deutschland
Sterilbank ScanLaf MARS Class II	Weiss Labortechnik, Heroldsberg, Deutschland
Sterilbankabsaugpumpe	HLC BioTech, Bovenden, Deutschland
TC10 <sup>™</sup> Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Thermomixer® Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™	Bio-Rad, München, Deutschland
Vortex Mixer 7-2020	neoLab, Heidelberg, Deutschland

#### 2.1.4 Antibiotika, Stimulanzien und Antikörper

Eine Übersicht über die verwendeten Antibiotika, Stimulanzien und Antikörper bieten die Tabellen 7, 8 und 9. Die zur Stimulation eukaryotischer Zellen genutzten Zytokine und rekombinanten Proteine wurden in bestimmten Arbeitskonzentrationen verwendet. Die Zelllinie für die Synthese der Überstände war bereits im Institut vorhanden. Die Antikörper wurden entsprechend der Herstellerangaben in BSA-Lösung (5% BSA in TBS-T) oder Milchlösung (5% Magermilchpulver in TBS-T) in einem bestimmten Verhältnis verdünnt (Tabelle 9) und zur Detektion im Rahmen des Western Blottings oder des FACS angewandt.

Antibiotikum	Stammkon- zentration	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg/ml	Agarplatten: 200 μg/ml LB-Medium: 100 μg/ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Geniticin (G-418)	50 mg/ml	U4C-, γ2A-Kultur: 8 μl/ml (0,4 mg/ml)	Genaxxon biosci- ence GmbH, Ulm, Germany
Hygromycin B	100 mg/ml	U1A-Kultur: 5 µl/ml (0,5 mg/ml) Ba/F3-gp130-Kultur: 20 µl/ml (2 mg/ml)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin	10000 U/ml	60 mg/L	Genaxxon biosci- ence GmbH, Ulm, Germany
Puromycin	1 mg/ml	Ba/F3-gp130-Kultur: 1,5 μl/ml (1,5 μg/ml)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin	10 mg/ml	100 mg/L	Genaxxon biosci- ence GmbH, Ulm, Germany

#### Tabelle 7: Übersicht der Antibiotika und Konzentrationen

Sterilisiertes LB-Festmedium wurde in der Mikrowelle erhitzt und damit verflüssigt. Nachdem dieses auf 60°C abgekühlt war, wurde das gewünschte Selektionsantibiotikum beigefügt und das Gemisch in Petrischalen gegossen, um dann bei Raumtemperatur (RT) zu erhärten und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert zu werden.

Zytokin/Protein	Arbeitskonzentration	Herkunft
Hyper-IL-6	20 ng/ml	Konditionierter CHO-K1- Zellüberstand [130]
IFNa4	200 U/ml (0,02%, 0,2 μl/ml)	PBL Assay Science <sup>™</sup>

Zytokin/Protein	Arbeitskonzentration	Herkunft
GFP-mCherry (GC)	Ba/F3-gp130: 100 ng/ml HEK293, U1A, U4C, γ2A: 10 ng/ml	Konditionierter CHO-K1- Zellüberstand [130]
2xGFP (GG)	Ba/F3-gp130: 100 ng/ml HEK293, U1A, U4C, γ2A: 10 ng/ml	Konditionierter CHO-K1- Zellüberstand[130]
2xmCherry (CC)	Ba/F3-gp130: 100 ng/ml HEK293, U1A, U4C, γ2A: 10 ng/ml	Konditionierter CHO-K1- Zellüberstand [130]
GFP-mCherry-Fc (GC-Fc)	qPCR: 100 ng/ml	[131]
2xGFP-Fc (G-Fc)	qPCR: 100 ng/ml	[131]

Tahelle	9. Zur	Δnwenduna	aekommene	Antikörner	und Vei	rdünnunas	arad
I abelle	<b>9. Z</b> ui 1	Anwendung	geronniene	Antikorper	unu vei	uunnungs	yrau

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
Myc-Tag (71D10) Rabbit mAb (#2278)	1:1000 in BSA-Lösung 1:100 in 100 μl FACS-Puf- fer	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
HA-Tag (C29F4) Rabbit mAb (#3724)	1:5000 in BSA-Lösung 1:1000 in 100 µl FACS-Puf- fer	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
STAT1 Antibody (#9172)	1:1000 in Milchlösung	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Phospho-Stat1 (Tyr701) (58D6) Rabbit mAb (#9167)	1:1000 in BSA-Lösung	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Stat2 (D9J7L) Rabbit mAb (#72604)	1:1000 in BSA-Lösung	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Phospho-STAT2 (Tyr690) (D3P2P) Rabbit mAb (#88410)	1:1000 in BSA-Lösung	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Stat3 (124H6) Mouse mAb (#9139)	1:1000 in BSA-Lösung	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Phospho-Stat3 (Tyr705) (D3A7) XP® Rabbit mAb (#9145)	1:1000 in BSA-Lösung	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Stat5 (D2O6Y) Rabbit mAb (#94205)	1:1000 in BSA-Lösung	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Phospho-Stat5 (Tyr694) (C11C5) Rabbit mAb (#9359)	1:1000 Milchlösung	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody (#9102)	1:1000 Milchlösung	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP® Rabbit mAb (#4370)	1:1000 in BSA-Lösung	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Jak1 (6G4) Rabbit mAb (#3344)	1:1000 in BSA-Lösung	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Jak2 (D2E12) XP® Rabbit mAb (#3230)	1:1000 in BSA-Lösung	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
Tyk2 Antibody (#9312)	1:1000 in BSA-Lösung	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Phospho-Tyk2 (Tyr1054/1055) Antibody (#9321)	1:1000 in BSA-Lösung	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	1:2000 in Milchlösung	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP	1:2000 in Milchlösung	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

# 2.1.5 Plasmide und Oligonukleotide

In Tabelle 10 und 11 ist eine Auflistung der erworbenen Plasmide und der als *primer* zur Anwendung gekommenen Oligonukleotide ersichtlich.

Plasmid	Resistenz	Herkunft
pcDNA3.1 FLAG-HmIL23 6xHis	Ampicillin	[132]
pMOWS-puro-GFP	Ampicillin, Puromycin	[133]
pMOWS-hygro-GFP	Ampicillin, Hygromycin	[134]
pBlueScript II SK (+)-SyCyR-2A-mIFNAR	Ampicillin	BioCat, Heidel- berg, Deutschland
pBlueScript II SK (+)-2A-mIFNAR	Ampicillin	BioCat, Heidel- berg, Deutschland
pEGFP	Ampicillin	Clontech Laborato- ries Inc., California, USA
pCR-script	Ampicillin	AG Scheller

#### Tabelle 10: Plasmide

#### Tabelle 11: Oligonukleotide

Oligonukleotid Nummer	Oligonukleotid Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
DF7	Oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTTT	cDNA-Synthese
DF16	pcDNA3.1 fwd	AAATTAATACGACTCA- CTATAGG	Sequenzierung pcDNA3.1-Plasmide
DF17	pcDNA3.1 rev	AGGCACAGTCGAGGCTG	Sequenzierung pcDNA3.1-Plasmide
DF38	pCR-Script fwd1	TGCTGCAAGGCGATTAAG	Sequenzierung pCR- Script-Vektoren
DF39	pCR-Script rev1	ATGCTTCCGGCTCGTATG	Sequenzierung pCR- Script-Vektoren
DF85	5' pMOWS	AGCCCTTTGTACAC- CCTAAGC	<i>primer</i> für pMOWS- Vector

Oligonukleotid Nummer	Oligonukleotid Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
DF86	3' pMOWS	AGCAATAGCAT- GATACAAAGG	<i>primer</i> für pMOWS- Vector
DF468	3'mCherry	GACGCGGCCGCCTACTTG- TACAGCTCGTCCATG	Austausch der Re- sistenzkassette im HDR-Plasmid
DF604	mIFNAR2-RP	CGATAGCGCTCTCG- GACAGGC	<i>primer</i> für <i>colony</i> PCR mIFNAR
DF605	mIFNAR2-FP	CAGCCTGGCCAG- GAGAGCG	<i>primer</i> für <i>colony</i> PCR mIFNAR
DF606	mIFNAR1-FP	GCACAATCTGGATCATCAC- CGGC	primer für colony PCR mIFNAR
DF644	MX1-FP	GACCATAGGGGTCTTGAC- CAA	<i>real-time</i> qPCR
DF645	MX1-RP	AGACTTGCTCTTTCT- GAAAAGCC	<i>real-time</i> qPCR
DF646	OASL1-FP	CAGGAGCTGTACGGCTTCC	<i>real-time</i> qPCR
DF647	OASL1-RP	CCTACCTTGAGTACCTT- GAGCAC	<i>real-time</i> qPCR
DF648	rnaseL-FP	TAGGCGAACACATCAAT- GAGGA	<i>real-time</i> qPCR
DF649	rnaseL-RP	CTGCCTCTGGAACGCTGAG	<i>real-time</i> qPCR
DF650	IFNAR1-Y455F-A	GTGGCACAGGAACTT- CCACACGCTTCTCAG	Mutation mIFNAR1
DF651	IFNAR1-Y455F-B	GTGGCACAGGAACTT- CCACACGCTTCTCAG	Mutation mIFNAR1
DF652	IFNAR1-Y518F-A	GTCTGGGAGGAGAACTTT- CTGAGGTCCTCC	Mutation mIFNAR1
DF653	IFNAR1-Y518F-B	GTCTGGGAGGAGAACTTT- CTGAGGTCCTCC	Mutation mIFNAR1
DF654	Mutation mIFNAR1	CCTCCTCGTTGCTGAAGTT- GCCGGAATCC	Mutation mIFNAR1
DF655	IFNAR1-Y529F-B	GGATTCCGGCAACTTCA- GCAACGAGGAGG	Mutation mIFNAR1
DF656	IFNAR1-IIE-AAA-A	GGCCACGGTATCGGTGTT- CGCGGCGGCGAAGCATCT CTCGGTGTGC	Mutation mIFNAR1
DF657	IFNAR1-IIE-AAA-B	GCACACCGAGAGATGCTT- CGCCGCCGCGAACAC- CGATACCGTGGCC	Mutation mIFNAR1
DF658	IFNAR2-Y335F-A	CTCCGTGACAGGCTTCA- CAATGCACGGCC	Mutation mIFNAR1
DF659	IFNAR2-Y335F-B	GGCCGTGCATTGT- GAAGCCTGTCACGGAG	Mutation mIFNAR1

Oligonukleotid Nummer	Oligonukleotid Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
DF660	IFNAR2-Y510F-A	TAAGCTTTCTCATGAT- GAAGCCATCGCCCACATC	Mutation mIFNAR1
DF661	IFNAR2-Y510F-B	GATGTGGGCGATGGCTT- CATCATGAGAAAGCTTA	Mutation mIFNAR1
DF664	IRF7-F	GAGACTGGCTATTGGGG- GAG	<i>real-time</i> qPCR
DF665	IRF7-R	GACCGAAATGCTTCCAGGG	<i>real-time</i> qPCR
DF668	IFNAR1-delta16aa- FP1	GAC- CTCGAGTCCGAGAAGCTGT GTGAGAAGACCAG	Deletion mIFNAR1
DF669	IFNAR1-delta16aa- RP1	TCTCCTCCTCTCT- GAGGTCCTCCTCGGGGGC GT	Deletion mIFNAR1
DF670	IFNAR1-delta16aa- FP2	GGACCTCAGAGAGGAG- GAGAGCGTGGGCAC	Deletion mIFNAR1
DF671	IFNAR1-delta16aa- RP2	GACGCGGCCGCTCA- ACACAGCAGAGCTGGCTC	Deletion mIFNAR1

## 2.1.6 Zelllinien

Tabelle 12 zeigt die in dieser Arbeit genutzten eukaryotischen Zelllinien und eine kurze Skizzierung deren Eigenschaften.

Tabelle	12:	eukaryotische	Zelllinien
---------	-----	---------------	------------

Zelllinie	Ursprung	Kultivierung	Hersteller
Ba/F3-gp130	embryonale Nierenzel- len, human	Suspensionszellen	Immunex, Seattle, USA [135]
U1A	Fibrosarkomzellen, human	adhärent wachsend	[136]
U4C	Fibrosarkomzellen, human	adhärent wachsend	[136]
γ2A	Fibrosarkomzellen, human	adhärent wachsend	[136]
HEK293	embryonale Nierenzel- len, human	adhärent wachsend	DSMZ ACC305, Braunschweig, Deutschland
HEK293T	embryonale Nierenzel- len, human Ausprägung des gro- ßen T-Antigens	schwach adhärent wachsend	DSMZ ACC635, Braunschweig, Deutschland
Phoenix-Eco	embryonale Nierenzel- len, human	schwach adhärent wachsend	DKFZ, Ursula Klingmüller, Heidelberg, Deutschland

# 2.1.7 Bakterien

Die im Rahmen der Klonierungen zum Einsatz gekommenen Wirtszellen waren *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien des Stammes XL1-*blue* (endA1 gyrA96(naIR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F<sup>+</sup> [: TN10 proAB+ laclqΔ (lacZ) M15] hsdR17(rk-mK+)) der Firma Agilent Technologies in Waldbronn, Deutschland.

# 2.2 Molekularbiologische Methoden

# 2.2.1 Transformation chemisch kompetenter E. coli Bakterien

Um Plasmid-DNA zu vermehren, wurde diese im Rahmen der Klonierungen in Bakterien eingebracht. Dazu wurden chemisch kompetente *E. coli XL-1 blue* Zellen verwendet, die in Mikroreaktionsgefäßen zu 30 µl aliquotiert bei -80°C gelagert wurden. Die Zellen wurden auf Eis inkubiert, bis sie aufgetaut waren. Anschließend wurden entweder 1 µl Plasmid-DNA, 10 µl Ligationsansatz oder 5 µl des PCR-Produktes der *site directed mu-tagenesis* (SDM) beigefügt und durchmischt. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 5 min auf Eis, wurde die Permeabilität der Bakterienmembran durch einen Hitzeschock erhöht, um so die Transformation zu ermöglichen. Dabei wird das Mikroreaktionsgefäß 1 min bei 42°C erhitzt, um anschließend erneut 5 min auf Eis abzukühlen. Nach der erfolgten Transformation wurden 500 µl LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz inkubierte für eine weitere Stunde bei 37°C unter Schütteln. Zuletzt wurden 150 µl des Ansatzes auf LB-Agarplatten, die mit dem gewünschten Selektionsantibiotikum versehen wurden, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

## 2.2.2 Präparation der Plasmid-DNA

Um die Plasmid-DNA zu isolieren, wurde von zwei verschiedenen Verfahren Gebrauch gemacht. Zum einen wurden geringere Mengen an DNA mittels Mini-Präparation bereitgestellt, um mehrere vermeintliche *E. coli* Klone auf die korrekte Transformation des Plasmids zu untersuchen. Zum anderen wurde die Midi-Präparation angewendet, um größere DNA-Mengen zu isolieren. In beiden Verfahren wurde die Plasmid-DNA mittels Endonukleasebehandlung überprüft.

Für die **Mini-Präparation** wurden Reaktionsgefäße mit 2 ml LB-Medium befüllt und einer Bakterienkolonie beimpft. Um Bakterien und damit DNA zu vervielfachen, wurden diese über Nacht bei 37°C und 1400 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen bei 5000 rpm und RT für 10 min zentrifugiert und das Medium dekantiert. Das entstandene Pellet wurde in 100 µl S1-Puffer resuspendiert und die zu analysierende Plasmid-

DNA durch die im Puffer enthaltene RNase von Verunreinigung durch RNA befreit. Daraufhin wurden die Zellen durch Zufügen von 200  $\mu$ l S2-Puffer lysiert. Nach 5-minütiger Inkubationszeit wurde die Lyse durch Zugabe von 150  $\mu$ l des neutralisierenden S3-Puffers abgebrochen. Nun wurde erneut für 10 min auf Eis inkubiert und daraufhin zentrifugiert (13.000 rpm, 4°C, 10 min). So wurden die Zellbestandteile von der im Überstand gelösten DNA getrennt, sodass diese in ein neues Reaktionsgefäß mit 900  $\mu$ l reinem Ethanol (100%) überführt werden konnte. Anschließen wurde erneut zentrifugiert (13.000 rpm, 4°C, 15 min) und die DNA damit isoliert. Nach Entfernung des Überstandes wurde mit 500  $\mu$ l Ethanol (70%) gewaschen (13.000 rpm, 4°C, 5 min). Zuletzt wurde der Überstand dekantiert und das gewonnene DNA-haltige *pellet* nach 10 min Lufttrocknung in 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gelöst.

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren, wurde die **Midi-Präparation** angewendet. Die daraus gewonnene DNA war Grundlage für weitere Analyseschritte im Rahmen von Klonierung und zellbiologischen Methoden. Nach erfolgter Untersuchung der *E. coli* Klone mittels Mini-Präparation und nachfolgender Überprüfung anhand Restriktionsendonukleasebehandlung und Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.2.5), wurden 100 ml LB-Medium mit dem gewünschten Klon beimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anhand des NucleoBond® Xtra Midi/Maxi Kits wurde die DNA aus den Bakterien isoliert, gereinigt und in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gelöst.

## 2.2.3 Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA

Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA mittels NanoDrop<sup>TM</sup>. Dabei wurden zwei Quotienten gebildet, die aus dem gemessenen Signal entsprechend der Wellenlänge reiner Nukleinsäuren (260 nm) und der Wellenlänge von Protein und Phenol (280 nm), als auch der von Kohlenhydraten (230 nm) resultierten. Der Quotient 260/280 besagt, dass DNA unter einem Wert von 1,8 rein ist (RNA < 2), während der Quotient 260/230 Reinheit von DNA und RNA bei einem Wert von > 2 verspricht.

## 2.2.4 Restriktionsspaltung der Plasmid-DNA

Die erfolgreich isolierte Plasmid-DNA wurde, bevor weitere Schritte damit unternommen wurden, mittels Restriktionsendonuklease-vermittelter Spaltung auf Korrektheit überprüft. Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die DNA an spezifischen palindromischen Sequenzen schneiden. Dabei entstehen Enden ohne Überhang (*blunt ends*) oder Enden mit Überhang (*sticky ends*). Neben Plasmid-DNA, wurden Enzyme als auch Puffer der Firma Thermo Fisher Scientific hinzugegeben und mit  $H_2O_{dd}$  auf 20 µl aufgefüllt. Sorgfältig durchmischt und kurz zentrifugiert verblieben die Reaktionsgefäße 2 h bei 37°C im Inkubator. Schließlich wurden die Enzyme durch Beigabe von 6x DNA-Ladepuffer inaktiviert. Im Anschluss konnten die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert werden.

# 2.2.5 Agarosegelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden Agarosegele mit 1% Agarose verwendet. Die Agarose wurde mit der entsprechenden Menge TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt und in einen Agarosegelschlitten gegossen. Dazu wurde je nach Schlittengröße eine bestimmte Menge an HD-Green hinzugegeben und der Kamm eingesetzt, sodass das Gel bei RT aushärten konnte. Die gespaltene Plasmid-DNA und die Marker GeneRuler<sup>™</sup> 1kb DNA Ladder und GeneRuler<sup>™</sup> Express DNA Ladder der Firma Thermo Fisher Scientific wurden in die Taschen pipettiert. Die Kammer wurde an die Stromquelle bei 100 V angeschlossen und die DNA samt Marker wanderte entlang des elektrischen Feldes durch das Gel. Die Fragmente wurden anhand der Länge separiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des UV-Transilluminators.

#### 2.2.6 Gelextraktion

Um bestimmte DNA-Fragmente für eine Ligation zu gewinnen, konnte das gewünschte Fragment nach der elektrophoretischen Separation aus dem Gel extrahiert werden. Mit Hilfe eines UV-Tisches wurden die DNA-Banden für einen kurzen Moment sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Mittels NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit wurden die extrahierten Fragmente nach Herstellerangaben aufbereitet und damit für weitere Arbeitsschritte nutzbar gemacht.

## 2.2.7 Ligation

Um ein spezifisches DNA-Fragment (*insert*) in einen gewünschten Vektor zu überführen, mussten beide miteinander ligiert werden. Dabei verbinden sie sich unter ATP-Hydrolyse und Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zu einem neuen DNA-Plasmid. Neben einer bestimmten Menge an *insert*, die mittels der folgenden Formel errechnet werden konnte, wurden 100 ng Vektor, 2  $\mu$ l des Katalysators T4 DNA-Ligase, als auch 2  $\mu$ l T4 Ligase-Puffer und 2  $\mu$ l PEG4000 (nur bei *blunt-end* Ligation) in ein 1,6 ml Reaktionsgefäß gegeben. H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> wurde bis zu einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l hinzugefügt. Inkubiert wurde 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Anschließend konnte mit 10  $\mu$ l des Ligationsansatzes das frisch ligierte DNA-Plasmid in *E. coli* Bakterien transformiert werden.

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

#### Dephosphorylierung

Wenn ein mittels Gelextraktion extrahierter Vektor durch ein einziges Restriktionsenzym geschnitten wird und *blunt ends* aufweist, wird die Rezirkulisation des Vektors verhindert. Dies geschieht, indem die freien Phosphatenden dephosphoryliert werden. Dazu wurde ein Ansatz mit der alkalischen Phosphatase FastAP<sup>™</sup> und entsprechendem Puffer erstellt, der bei 37°C für 2 h inkubierte.

## 2.2.8 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur exponentiellen Amplifikation bestimmter Sequenzen innerhalb einer Ausgangs-DNA. Dabei werden neben dem zu amplifizierenden DNA-Fragment (*template*) eine hitzestabile DNA-Polymerase, sequenzspezifische Oligonukleotide (*primer*), Desoxyribonukleotide (dNTPs), MgCl<sub>2</sub> und Puffer benötigt. Die Reaktionsschritte lassen sich wie folgt aufteilen. Zuerst kommt es bei 95°C zu der thermischen Denaturierung der DNA und damit zu der Trennung in Einzelstränge. Im Rahmen des *annealings* binden die *primer* bei 60°C an Ihre spezifische DNA-Sequenz. Die Elongation beschreibt die daraufhin erfolgende Verlängerung der *primer* durch die Polymerase bei 72°C für 30 oder mehr Zyklen. Im Anschluss kann die amplifizierte Sequenz mittels Restriktionsanalyse und Gelelektrophorese kontrolliert werden.

#### Colony-PCR

Die *colony*-PCR wurde angewandt, um *E. coli* Klone nach der Transformation auf die Aufnahme des korrekten DNA-Plasmids zu untersuchen und somit zu selektieren. Dazu wurden PCR-Reaktionsgefäße beschriftet und mit jeweils 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> befüllt. Ebenfalls wurden beschriftete 2 ml Reaktionsgefäße mit 2 ml LB-Medium befüllt. Daraufhin wurden einzelne Bakterienkolonien mit der Pipettenspitze angepickt und in das jeweilige PCR-Reaktionsgefäß überführt, um die Pipettenspitze daraufhin in die 2 ml Reaktionsgefäße abzuwerfen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 95°C, wurden 30 µl eines Ansatzes, der in der folgenden Tabelle 13 aufgeführt ist, in jedes *tube* gegeben. Anschließend konnten diese in den Thermocycler gestellt werden und das PCR-Programm wurde gestartet (Tabelle 14). Letztendlich konnten die vervielfachten DNA-Fragmente

durch Zugabe von 10 µl Ladepuffer pro Reaktionsgefäß mittels Agarosegelelektrophorese analysiert werden.

Dream Taq Puffer	5 μΙ
Dream Taq Polymerase	0,2 µl
MgCl <sub>2</sub>	4 μΙ
dNTPs	1 µl
Forward primer (10 pmol/µl)	2,5 µl
<i>Reverse primer</i> (10 pmol/µl)	2,5 µl
H <sub>2</sub> O	19,3 µl

#### Tabelle 13: Ansatz für colony-PCR

#### Tabelle 14: Colony-PCR-Programm

Initiale Denaturierung	5 min, 95°C	
Denaturierung	1 min, 95°C	
Annealing	1 min, 60°C	30 Zyklen
Elongation	1 min/kb	
Finale Elongation	5 min, 72°C	

#### Site directed mutagenesis

Bei der *site directed mutagenesis* handelt es sich um ein Verfahren zur Veränderung spezifischer Sequenzen einer *template* DNA. Durch Mutationen kann anschließend die Auswirkung auf die Aktivität des Effektorproteins untersucht und damit Rückschluss auf die jeweiligen DNA-Abschnitte gezogen werden. Dafür wurden *primer* verwendet, die nicht vollständig komplementär zur *template*-DNA waren. Somit kam es zur Veränderung der Nukleinsäureabfolge auf DNA-Ebene und konsekutiv zu veränderten Aminosäuren auf Proteinebene. Abbildung 5 zeigt den schematischen Ablauf der SDM. Pro Mutationsansatz wurden zwei PCR-Reaktionsgefäße jeweils mit der in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> verdünnten Plasmid-DNA (1:100) und einem Ansatz (vgl. Tabelle 15) befüllt.

Ansatz A		Ansatz B	
Template DNA	1 µl	Template DNA	1 µl
GC-Puffer oder HF-Puffer	10 µl	GC-Puffer oder HF-Puffer	10 µl
Forward primer (100 pmol)	0,4 µl	Reverse primer (100 pmol)	0,4 µl
dNTPs	1 µl	dNTPs	1 µl
Phusion Polymerase	1 µl	Phusion Polymerase	1 µl
$H_2O_{dd}$	36,6 µl	$H_2O_{dd}$	36,6 µl

#### Tabelle 15: Ansätze für die SDM

Dabei wurde einem Ansatz ein *primer* von 3'-5' (*forward primer*) und dem anderen einer von 5'-3' (*reverse primer*) beigefügt. Damit beide *primer* nicht aggregierten, durchliefen die zwei Ansätze zunächst getrennt ein PCR-Programm (vgl. Tabelle 16).

Tabelle 16:	PCR-Programm	für die	SDM
-------------	--------------	---------	-----

Initiale Denaturierung	4 min, 98°C	
Denaturierung	1 min, 98°C	
Annealing	1 min, 55°C	15 Zyklen
Elongation	15-30 s/kb (kilobase), 72°C	
Finale Elongation	12 min, 72°C	L
Store	4°C	
	$\bigcirc$	
	2. PCR Dpnl-Spaltung	Transformation
В		

#### Abb. 5: Schematische Darstellung der site directed mutagenesis.

Ein Ausgangsplasmid durchlief in zwei Ansätzen (A und B) mit entweder *forward* oder *reverse primer* ein erstes PCR-Programm. So wurde jeweils einer der DNA-Stränge linear amplifiziert. Die Punktmutation ist durch den roten Punkt und der Einzelstrangbruch durch den schwarzen Strich dargestellt. Die Ansätze wurden zusammengefügt, sodass beide *primer* vorhanden waren und somit die vollständige Synthese des Plasmides in der zweiten PCR ermöglicht wurde. Die anschließende restriktionsenzymatische Spaltung durch DpnI schnitt die nicht mutierten DNA-Stränge, sodass schließlich die Transformation der neu synthetisierten Plasmide in *E. coli* XL1-*blue* Zellen erfolgen konnte. Modifiziert nach Edelheit *et al.* [137].

Die in jedem der beiden PCR-Reaktionsgefäße (je 50 µl) linear amplifizierten mutierten Matrizen wurden daraufhin in ein gemeinsames überführt (100 µl), durchmischt und erneut auf zwei verschiedene (50 µl) aufgeteilt. Durch Zugabe von je 1 µl Phusion Polymerase pro 50 µl Ansatz, wurde bei Wiederholung des PCR-Programmes (Tabelle 16) die vollständige Synthese der DNA-Stränge gewährleistet. Folgend wurden die Ansätze anhand des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up nach Herstellerangaben aufbereitet, damit anschließend die Spaltung durch das Enzym Dpnl vollzogen werden konnte. Dpnl schneidet nur methylierte Ausgangs-DNA und verschont die Plasmidstränge mit der Mutation. Nach 2 h Inkubationszeit bei 37°C wurde die Reaktion, durch Inaktivierung von Dpnl bei 80°C für 20 min, abgebrochen. Die Reaktion wurde auf Eis gestellt und im nächsten Schritt eine Transformation des PCR-Produktes in *E. coli* XL1-*blue* Zellen durchgeführt (vgl. 2.2.1). In der weiteren Analyse wurden *E. coli* Klone mittels Mini-Präparation (vgl. 2.2.2) und Restriktionsspaltung (vgl. 2.2.4) auf den korrekten Einbau des veränderten Plasmids untersucht. Dabei wurde das GeneJET Plasmid-Miniprep-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Im Anschluss an eine DNA-Sequenzierung (vgl. 2.2.2) und wiederrum anhand Restriktionsspaltung überprüft.

#### Splicing by overlap extension PCR (SOE-PCR)

Die SOE-PCR (vgl. Abb. 6) wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, eine Deletion in einem DNA-Abschnitt zu erzeugen. Zwei DNA-Abschnitte, A und B, wurden mittels PCR (vgl. Tabelle 18) aus einer Ursprungs-DNA generiert. Dabei wurde jeweils eine Reaktion (50  $\mu$ l) für eine PCR1 und PCR2 angesetzt. Zu dem Ansatz (vgl. Tabelle 17) wurde 1  $\mu$ l (1:100) der entsprechenden DNA gegeben. Die gewünschten Abschnitte wurden so vervielfältigt und anhand Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt.



#### Abb. 6: Schematische Darstellung der SOE-PCR.

Dargestellt ist der Ablauf der SOE-PCR mit dem Ziel der Deletion eines gezielten DNA-Abschnittes. Zunächst werden mittels spezieller *primer* DNA-Abschnitte von einer Ursprungs-DNA amplifiziert, bei denen die zu deletierende Stelle nicht mit abgelesen wird. Die beiden Abschnitte A und B werden im nächsten Schritt, nach Agarosegelelektrophorese, Gelextraktion und Reinigung, zusammengefügt und während der eigentlichen SOE-PCR fusioniert und amplifiziert. Das entstandene Produkt ist die deletierte Ursprungs-DNA.

Die dafür genutzten *primer* sparten dabei den zu deletierenden Bereich aus, sodass dieser nicht amplifiziert wurde. Zusätzlich besaßen sie Abschnitte, die komplementär zu dem jeweils anderen DNA-Fragment waren, sodass komplementäre Überhänge generiert wurden. Eine Gelextraktion wurde durchgeführt und die PCR-Produkte wurden

gereinigt. Anschließend wurden 3 µl (1:100) der Fragmente A und B als *template* mit dem Ansatz (vgl. Tabelle 17) zusammengeführt und die Fusions-PCR erfolgte (vgl. Tabelle 18). Das aus dieser Fusion entstandene DNA-Fragment wies die Deletion auf und wurde amplifiziert. Daraufhin wurde das Produkt mit T4 Polynukleotidkinase (PNK) der Firma Thermo Fisher Scientific phosphoryliert (30 min, 37°C). Die Inaktivierung der Kinase erfolgte für 5 min bei 75°C. Nach Reinigung des PCR-Produktes erfolgte die Ligation in den Vektor pCR-Script mittels T4-DNA-Ligase .

HF-Puffer	10 µl
Forward primer (1:10)	2,5 µl
Reverse primer (1:10)	2,5 µl
dNTPs	1 µl
Phusion-Polymerase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	32,5 µl

#### Tabelle 17: Ansatz für PCR 1/2 und SOE PCR

#### Tabelle 18: Programm PCR 1/2 und SOE PCR

Initiale Denaturierung	30 s, 98°C	
Denaturierung	10 s, 98°C	
Annealing	15 s, 60°C	30 Zyklen
Elongation	15-30 s/kb, 72°C	
Finale Elongation	5 min, 72°C	<b></b>

#### Real-time quantitative PCR

Die quantifizierende *real-time* PCR (qPCR) ist eine Methode zur DNA-Vervielfältigung bei gleichzeitiger quantitativer Messung der synthetisierten DNA nach jedem PCR-Zyklus. Somit erlaubt diese Methode eine Veranschaulichung der Amplifikation in Echtzeit und die Erstellung einer Zeitdynamik. Da das PCR-Produkt abhängig ist von der eingesetzten Matritzenmenge, kann so auf die Expressionsstärke eines bestimmten Gens geschlossen werden. Um die DNA-Quantität zu bestimmen, wurde ein in die DNA interkalierender Farbstoff, SYBR-Green, verwendet, der erst durch die Bindung an DNA fluoresziert und damit messbar wird.

Weiterhin sollten Messungenauigkeiten durch unspezifische doppelsträngige DNA (dsDNA) aufgrund von Verunreinigung und *primer*-Dimere verhindert werden. In diesem Sinne wurde bei jedem erstmals untersuchten Gen auch eine Schmelzkurvenanalyse der *primer* durchgeführt.

Es wurden 2 µl der 1:10 verdünnten cDNA mit 18 µl eines Ansatzes (vgl. Tabelle 19) zusammen auf eine 96-*well* Platte gegeben. Als Kontrolle diente das *housekeeping gene* Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welches demselben Vorgehen entsprechend untersucht wurde. Dabei wurden für die jeweiligen Gene spezifische *primer* verwendet.

Tabelle 19: Ansatz für die real-time qPCR

PowerUp <sup>™</sup> SYBR <sup>™</sup> Green Master Mix	10 µl
Forward primer (1:10)	0,5 µl
Reverse primer (1:10)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	7 μΙ

Anschließend wurde die Platte abgedeckt und die PCR konnte im Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System durchgeführt werden. Das hierfür verwendete Programm ist in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: PCR-Programm für die real-time qPCR

Initiale Denaturierung	4 min, 95°C	
Denaturierung	1 min, 98°C	
Annealing	1 min, 55°C	15 Zyklen
Elongation	15-30 s/kb, 72°C	
Finale Elongation	12 min, 72°C	
Store	4°C	

Die gemessene Fluoreszenz wurde als  $C_T$ -Wert bestimmt auf dessen Basis die relative Expressionsstärke des Gens errechnet werden konnte. Als *housekeeping gene* ist die Expression von GAPDH als konstant und unabhängig von anderen Einflüssen anzusehen. Der  $C_T$ -Wert von GAPDH wurde vom  $C_T$ -Wert des untersuchten Gens subtrahiert, um somit Schwankungen zu minimieren und einen besseren Vergleich zwischen verschiedenen Zellen und Bedingungen zu ermöglichen.

## 2.2.9 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die RNA, die im Anschluss mittels *microarray* analysiert werden sollte, wurde nach Herstellerangaben anhand des RNeasy purification Kits von QIAGEN (Hilden, Deutschland) isoliert. Jene RNA, die im weiteren Verlauf durch die qPCR untersucht wurde, wurde mit dem NucleoSpin® RNA II Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) aufbereitet.

Nach Konzentrationsmessung anhand des NanoDrop® (vgl. 2.2.3) wurde die RNA mit oligo dT*-primer* und RNase-freiem H<sub>2</sub>O 5 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gelegt. Danach wurden Reverse Transkriptase samt Puffer und dNTPs dazugegeben und der Ansatz inkubierte weiter für 1 h bei 42°C und für 10 min bei 72°C. Die Reverse Transkriptase erzeugte so eine komplementäre DNA zu der ursprünglich isolierten RNA.

## 2.2.10 DNA-microarray

Der DNA-*microarray* erlaubt es, Rückschluss auf die Genexpression in Zellen zu ziehen. Dafür wurde die mRNA isoliert und in cDNA umgewandelt, die dann quantifiziert und spezifiziert werden konnte. Der Array erfolgte in Kooperation mit dem deutschen Diabetes-Zentrum (DDZ) und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Al-Hasani. Die Daten wurden mittels Transcriptome Analysis Console (TAC) Software von Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA) ermittelt.

# 2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden durch das Unternehmen Microsynth Seqlab durchgeführt. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung von Clustal omega <u>https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</u>.

# 2.3 Zellbiologische Methoden

# 2.3.1 Subkultivierung von Zellkulturen

Da eine Überwucherung der Kultur durch Mangel an Platz und Nährstoffen unweigerlich zu einem Absterben der Zellen führt, wurden diese nach Erreichen einer gewissen Zelldichte passagiert. Dabei wurden die in Tabelle 12 aufgeführten Zellen aus ihrem Zellverband gelöst, verdünnt und auf neue Zellkulturschalen verteilt. Sie wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) verwendet. Es erfolgte die Versetzung des Mediums mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), sowie den Antibiotika Penicillin (60 mg/l) und Streptomycin (100 mg/l). Die Mischung wurde als DMEM<sup>+/+</sup> gekennzeichnet.

HEK293-Zellen, die humanen embryonalen Nierenzellen entstammen, sowie die Zelllinien U1A, U4C und γ2A (Tabelle 12) wachsen adhärent. Das alte Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen in *phosphate-buffered-saline* (PBS) gewaschen. Anschließend wurde dieses ebenfalls abgesaugt und die Zellen mittels Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (Trypsin-EDTA) von der Petrischale gelöst. Zu der Suspension wurde DMEM<sup>+/+</sup> gegeben. Daraus erfolgte die Verteilung der Zellen auf eine neue Zellkulturschale mit 10 ml DMEM<sup>+/+</sup>. Dabei wurden die verwendeten U1A-Zellen mit dem Selektionsantibiotikum Hygromycin B (50 μl) und die der U4C- sowie γ2A-Zellen mit 80 μl Geneticin (G- 418) versetzt [136]. HEK293T-Zellen unterscheiden sich von HEK293-Zellen durch die Ausprägung des großen T-Antigens, eines onkogenen, immortalisierenden Proteins viralen Ursprungs. Sie wachsen schwach adhärent. Demnach erfolgte gleich die Ablösung mit PBS. Die Passagierung erfolgte ansonsten gleich. Phoenix-Eco-Zellen basieren auf HEK293T-Zellen und sind entsprechend schwach adhärent.

Ba/F3-gp130-Zellen sind murine pro-B-Zellen, in die die cDNA des gp130 eingebracht wurde, der Rezeptoruntereinheit des IL-6-Rezeptors. Dadurch war es der Zelllinie möglich, durch Hyper-Interleukin-6 (HIL-6) zu proliferieren, anstatt alleinig durch IL-3. Hyper-IL-6 ist ein synthetisches Fusionszytokin, bestehend aus IL-6 und dem löslichen IL-6-Rezeptor (IL-6R). Es bindet an gp130 und löst dessen entsprechende Signaltransduktion aus. Die Subkultivierung dieser Zellen erfolgte einmal die Woche durch Zugabe von 1  $\mu$ I der vorherigen Kultur auf eine neue 10 cm Schale für nicht adhärente Zellen. Hinzugegeben wurden 20  $\mu$ I HIL-6 (konditionierter Zellüberstand), sowie das jeweils passende Selektionsantibiotikum Hygromycin B (200  $\mu$ I) oder Puromycin (15  $\mu$ I). Als Kontrolle wurden Ba/F3-gp130-Zellen ohne Zugabe von HIL-6 passagiert.

#### 2.3.2 Bestimmung der Zellzahl und -viabilität

Die Messung der Zellzahl und des Anteils an lebendigen Zellen erfolgte mit dem TC10<sup>™</sup> Automated Cell Counter (Bio-Rad Laboratories GmbH). Zunächst wurden 10 µl der Zell-Suspension und 10 µl Trypanblau in ein Reaktionsgefäß gegeben. Trypanblau wird nur von Zellen mit perforierter Membran aufgenommen und bindet an Proteine. Daher eignet es sich sehr gut zur Demaskierung toter Zellen, doch muss die Auswertung aufgrund der Zytotoxizität innerhalb weniger Minuten erfolgen. Aus dem Reaktionsgefäß wurden 10 µl in TC10<sup>™</sup> System Dual-Chamber Counting Slides pipettiert und die Auszählung durch das Gerät konnte erfolgen.

#### 2.3.3 Transiente Transfektion

Die Transfektion ist eine Methode zur Einbringung fremder DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. Dabei ist eine vorübergehende (transiente) von einer dauerhaften (stabilen) Transfektion zu unterscheiden. Zunächst wurden Zellen passagiert, um am folgenden Tag die gewünschte Zelldichte zu erreichen. Dabei wurden 2 x 10<sup>6</sup> Zellen je 10 cm Schale, beziehungsweise 600.000/*well* einer 6-*well*-Platte bei Phoenix-Eco Zellen, ausgesät. Nun wurde 1 ml DMEM<sup>-/-</sup> mit 5 µg DNA und 10 µl Turbo Fect<sup>™</sup> für 20 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend tropfenweise auf die am Tag zuvor ausgesäten Zellen gegeben und durch Schwenken der 10 cm Schale verteilt. Die Zellen inkubierten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 24-48 h. Nach 6 h erfolgte ein Mediumswechsel mit DMEM<sup>+/+</sup>. Phoenix-Zellen wurden entsprechend transfiziert, mit dem Unterschied, dass 200 µl DMEM<sup>-/-</sup>, 1 µg DNA und 2 µl Turbo Fect<sup>™</sup> verwendet wurden. Der Mediumswechsel erfolgte hierbei mit 2 ml DMEM<sup>+/+</sup>, welches 30% FCS enthielt.

#### 2.3.4 Retrovirale Transduktion

In dieser Arbeit wurde die cDNA der Interferonrezeptoren mittels retroviraler Transduktion in Ba/F3-gp130-Zellen eingebracht. Zunächst erfolgte die Transfektion von Phoenix-Zellen (vgl. 2.3.3), die am Vortag auf einer 6-well Platte ausgesät wurden. Anschließend wurden ausgesäte Ba/F3-gp130-Zellen in PBS gewaschen und auf 2 x 10<sup>6</sup> Zellen konzentriert. Dazu wurden die Ba/F3-gp130-Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in DMEM<sup>+/+</sup> resuspendiert und die Zellzahl mittels TC10<sup>™</sup> Automated Cell Counter bestimmt. Der Überstand der transfizierten Phoenixzellen wurde durch Zentrifugation von Zelltrümmern getrennt. Von diesem Überstand wurden 250 µl mit 50 µl der Ba/F3-gp130-Zellen (2 x 10<sup>6</sup>/ml) in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben. 3 µl Polybrene (Sigma, Aldrich, 800 µg/ml) wurden hinzugefügt und bei 1800 rpm für 2 h zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in 5 ml DMEM<sup>+/+</sup> pro well auf einer 6-well Platte resuspendiert. Nach Zugabe von 40 ng/ml HIL-6 inkubierten die Zellen für 48 h. Neben der cDNA der synthetischen Interferonrezeptoren und der vom Wildtyp, wurden ebenfalls die Positivkontrollen mit einer Antibiotikaresistenz für entweder Hygromycin oder Puromycin ausgestattet. Dazu wurden Ba/F3-gp130-Zellen zum einen mit dem Plasmid pMOWS-puro-GFP und zum anderen mit pMOWS-hygro-GFP transduziert. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne Zugabe von Plasmid-DNA transduziert. Folgend wurden je well 100 µl (100 mg/ml) Hygromycin-B und 7,5 µl (1 mg/ml) Puromycin auf die mit der passenden Resistenz ausgestatteten Ba/F3-gp130-Zellen gegeben. Die Zugabe der Selektionsantibiotika erfolgte über mindestens zwei Wochen.

#### 2.3.5 Stimulationsassay der Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Signaltransduktion synthetischer Interferonrezeptoren und derer vom Wildtyp in verschiedenen Zelllinien mittels Stimulation durch Zytokine und synthetische Liganden untersucht.

Adhärente Zellen wurden entsprechend Punkt 2.3.3 transient transfiziert und inkubiert. Anschließend wurden den Kulturen durch sogenanntes *starving* die Nährstoffe entzogen. Dies geschah, indem das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen wurden, damit sie schließlich nach Zugabe von 5 ml DMEM<sup>-/-</sup> bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubieren konnten. Ba/F3-gp130-Zellen wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (1500 rpm, 5 min, RT) vom Überstand getrennt. Dieser wurde abgesaugt und die Zellen in PBS resuspendiert, um daraufhin erneut zentrifugiert zu werden (1500 rpm, 5 min, RT). Das Waschen erfolgte drei Mal, bevor die Zellen in DMEM<sup>-/-</sup> resuspendiert wurden. Ba/F3-gp130-Zellen wurden 4 h in serumfreiem Medium inkubiert, im Anschluss auf einer 12-*well*-Platte zu je 1 ml pro *well* appliziert und stimuliert. Nach der Inkubationszeit (30 min) wurden die Zellen in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, RT). Der Überstand wurde entfernt und die Zellen bis zur weiteren Analyse in Flüssigstickstoff eingefroren. Gelagert wurden sie bei -80°C.

## 2.3.6 Zellproliferationsassay

Für die Untersuchung der ligandenabhängigen Zellproliferation von Ba/F3-gp130-Zellen mit inserierter cDNA wurden zuvor ausgesäte Zellen von einer 10 cm Schale in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, RT). Der Überstand wurde dekantiert, das so erzeugte pellet in 10 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT). Entsprechend dieser Vorgehensweise wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (vgl. 2.3.2). Entsprechend der erhaltenen Konzentration wurden 100 µl mit 5000 Zellen pro well einer 96-well Platte gegeben. Um Ungenauigkeiten zu minimieren, wurden pro Probe drei wells befüllt. Anschließend wurden die 96-well Platten für 48-72 h bei 37°C und 5% CO2 inkubiert. Anschließend konnte anhand des CellTiter-Blue® Cell viability Assays (Promega) das Proliferationsverhalten untersucht werden. Dazu wurden in jedes well 20 µl CellTiter-Blue®-Reagens pipettiert. Mittels Messung der Fluoreszenzstärke durch den Infitite M200Pro, Tecan, konnte Rückschluss auf die Zahl lebendiger Zellen gezogen werden. Dabei erfolgte über einen Zeitraum von 2 h alle 20 min eine Messung. Währenddessen inkubierte die abgedeckte 96-well Platte bei 37°C. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde der Ausgangswert bei 0 min von dem Wert nach 120 min subtrahiert.

#### 2.3.7 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie fußt auf der Messung von optischen Signalen von Zellen nach Durchwanderung eines Laserstrahls. Dabei werden Zellen durch einen engen Kanal geleitet, um somit einzeln vom Laserstrahl erfasst zu werden. Dies erlaubt eine genaue Zuordnung des gemessenen Signals. In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie verwendet, um die Oberflächenexpression der durch die eingebrachte cDNA codierten Interferonrezeptoren nachzuweisen. Hierfür wurden die Rezeptoren mittels Antikörper, die mit einem Fluorophor gekoppelt waren, markiert. Zunächst wurden 5 x 10<sup>5</sup> Zellen zentrifugiert (2500 rpm, 4°C, 5 min) und deren Überstand verworfen. Es erfolgte die Resuspension in 1 ml FACS-Puffer (PBS, 1% BSA). Nach erneuter Zentrifugation (2500 rpm, 4°C, 5 min) wurden 100 µl FACS-Puffer mit dem entsprechenden primären AK hinzugegeben (vgl. Tabelle 9). Nach Inkubation für 2 h bei RT wurde 1 ml FACS-Puffer hinzugegeben und erneut zentrifugiert (2500 rpm, 4°C, 5 min). Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in 100 µl FACS-Puffer mitsamt des sekundären AK resuspendiert. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei RT wurde wieder 1 ml FACS-Puffer in das Reaktionsgefäß pipettiert, zentrifugiert (2500 rpm, 4°C, 5 min), der Überstand dekantiert und in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert. Nun konnten die Zellen im FACS Canto II analysiert werden. Die Auswertung erfolgte mittels FCS Express™ Software (DeNovo Software, Los Angeles, CA, USA).

# 2.4 Proteinbiochemische Methoden

# 2.4.1 Proteinlysate und Quantifizierung

Die Analyse intrazellulärer Proteine erlaubte den Rückschluss auf die Signaltransduktion der eingebrachten Interferonrezeptoren. Zunächst mussten dazu die Proteine mittels Lyse aus den Zellen isoliert werden. Das Medium in den Zellschalen wurde dekantiert und die Zellen in 1 ml PBS gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 15.000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Ba/F3-gp130-Zellen lagen bereits als Zellpellets in einem Reaktionsgefäß vor und mussten nur aufgetaut werden. Eine adäquate Menge Lysepuffer (150-200 µl) wurde auf die Zellpellets gegeben. Dabei wurde je nach Zelllinie JAK2- oder STAT3-Lysepuffer verwendet. Die Reaktionsgefäße wurden für 1 h bei 4°C unter ständigem Rollen inkubiert. So wurden die Zellen lysiert und die Proteine schonend freigesetzt. Die entstandenen Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (13.000 rpm, 4°C, 20 min) von den im Überstand gelösten Proteinen separiert. Dieser, nun als Proteinlysat bezeichnete Überstand wurde in neue 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Quantifizierung des Proteingehalts erfolgte mittels Bicichoninsäure (BCA)-Protein-Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben. Die Proteinkonzentration wurde anhand der

Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> sowie der Farbreaktion von BCA und einwertigem Kupfer bestimmt. Damit die Proteinlysate in den nächsten Schritten mittels *sodium dodecyl sulfate* (SDS) -PAGE und Western Blot nach Molekulargewicht voneinander getrennt werden konnten, erfolgte die Versetzung mit Lämmli-Puffer, sodass Disulfidbrücken gespalten und die Proteine linearisiert wurden. Dafür wurde das Gemisch bei 95°C für 10 min inkubiert. Der Ansatz wurde so dosiert, dass eine Konzentration von 2,5 µg/µl Protein auf 200 µl Lysat erreicht wurde.

#### 2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das Prinzip der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) beruht auf der unterschiedlich schnellen Wanderung von Proteinen entlang eines elektrischen Feldes (95 V). So wird eine Trennung abhängig vom Molekulargewicht erreicht, da leichtere Proteine schneller durch das Gel wandern können. Das SDS sorgt dabei für eine einheitliche Ladungsdichte, indem es sich an die Proteine anlagert. Das Polyacrylamidgel besteht aus zwei Anteilen (vgl. Tabelle 21), dem Sammengel mit Taschen für die Proben und dem Trenngel für die Wanderung der Proteine. Neben der Probe, wurde PageRuler<sup>™</sup> Prestained Protein Ladder der Firma Thermo Fisher Scientific als Größenstandard in die Taschen des Sammelgels pipettiert.

		Trenngel	
Sammelgel		(10% SDS)	
H <sub>2</sub> O	1,7 ml	H <sub>2</sub> O	4 ml
Rotiphorese®-Gel 30	500 µl	Rotiphorese®-Gel 30	3,3 ml
Sammelgelpuffer	750 µl	Trenngelpuffer	2,6 ml
10% APS	30 µl	10% APS	100 µl
TEMED	3 µl	TEMED	4 µl

Tabelle 21: Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel

#### 2.4.3 Western Blot

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden Proteine und Marker auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese wurde zunächst 2 min in Methanol aktiviert und daraufhin in Transferpuffer gewaschen. Mittels des Trans-Blot® Turbo<sup>™</sup> Transfer Systems erfolgte die Übertragung. Dazu wurden die folgenden Komponenten übereinander in das Gerät gelegt. Das Transferpaket bestand aus vier Mal Whatman® Papier, PVDF-Membran, Polyacrylamid-Gel und erneut vier Mal Whatman® Papier. Dabei wurde das Papier vorher in Transferpuffer eingeweicht. Der Übertragungsprozess fand anhand eines senkrecht angelegten elektrischen Feldes (1 A, 20 V, 60 min) statt. Im nächsten Schritt wurden freie unspezifische Bindestellen der Membran geblockt, indem sie 2 h bei RT unter Rollen mit 10 ml einer 5% Milchpulverlösung in TBS-T in Kontakt gebracht wurde. Nach drei Waschgängen in TBS-T für je 10 min wurde der primäre AK appliziert und es folgte die Inkubation über Nacht bei 4°C. Nach erneuter dreimaliger Waschung in TBS-T konnte der sekundäre AK appliziert und für 2 h bei RT inkubiert werden. Die AK wurden nach Herstellerangaben jeweils in 5% BSA, oder in 5% Milchpulverlösung in TBS-T gelöst. Schließlich wurde noch zweimal mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen und die Membran konnte ausgewertet werden. Durch Applikation des Immobilon® Western HRP Substrats konnten die Proteinbanden samt gebundener AK im ChemoCam Imager (INTAS) visualisiert werden. Der Immundetektion liegt dabei folgendes Prinzip zugrunde: Der primäre AK erkennt das gewünschte Zielprotein und ein sekundärer AK mit gekoppelter Peroxidase bindet wiederrum an den primären. Die nach Substratapplikation durch die Peroxidaseaktivität entstehenden Lichtemissionen können im ChemoCam Imager (INTAS) detektiert werden. Es wurden je 200 µl der Reagenzien gemischt und auf die Membran gegeben.

#### Stripping

Die AK auf der PVDF-Membran können im Rahmen des *strippings* gelöst werden, sodass im Anschluss andere Proteine detektiert werden können, ohne dass eine neue SDS-PAGE mit Western Blot erfolgen muss. Dafür wurde ein 50 ml *falcon* mit darin befindlicher Membran mit *stripping*-Puffer aufgefüllt und 50 µl β-Mercaptoethanol hinzugegeben. Nach Inkubation im Wasserbad (60°C, 30 min) wurde der Inhalt dekantiert. Die Membran wurde dreimalig mit TBS-T gewaschen, 1 h in Milchlösung inkubiert und wieder dreimalig in TBS-T gewaschen. Nun konnte eine weitere Immundetektion erfolgen.

# 3 Ergebnisse

# 3.1 Konstruktion synthetischer Zytokinrezeptoren

#### 3.1.1 Grundlagen

Der in dieser Arbeit angesetzten Analyse der Signaltransduktion von murinen IFNARs (vgl. Abb. 7A) wurde die Konstruktion eines synthetischen Äquivalents vorausgesetzt. Somit sollte ein künstliches biochemisches System erzeugt werden, das sowohl synthetische Rezeptoren als auch deren Liganden miteinbezog. Engelowski *et al.* konstruierten ein solches System für die IL-6/IL-12-Rezeptorfamilie [130]. Dafür wurde die extrazelluläre Domäne der Rezeptoren durch einen *nanobody* (VHH) ersetzt, sodass die transmembranäre und intrazelluläre Domäne unverändert blieben. Durch diesen Ansatz konnte erreicht werden, dass eigens konstruierte Liganden den Rezeptor rekrutieren und das Signal nachahmen konnten. Dafür wurden die fluoreszierenden Proteine GFP und mCherry verwendet. Entsprechend diesem Vorgehen wurde in dieser Arbeit der IFNAR1 mit einem extrazellulären *nanobody* für GFP (G<sub>VHH</sub>) und der IFNAR2 für mCherry (C<sub>VHH</sub>) ausgestattet (vgl. Abb. 7B).



# Abb. 7: Schematische Darstellung der heterodimeren Rezeptorkomplexe der natürlichen IFNARs (A) und SyCyRs (B).

**A** Typ I Interferone, in dieser Arbeit repräsentiert durch IFNα4, binden IFNAR1 und IFNAR2, woraufhin diese dimerisieren und eine Signaltransduktion ermöglichen. **B** Die IFNARs wurden durch Austausch der extrazellulären Domäne gegen GFP und mCherry bindende *nanobodies* (VHH) modifiziert, sodass diese rekombinanten Proteine zur Ligandenbindung und damit Rekrutierung der SyCyRs befähigt wurden. Durch Erhalt der transmembranären und intrazellulären Domäne sollte dieses System die Typ I IFN-abhängige Signaltransduktion imitieren. Erstellt mit BioRender.com. Würde nun das rekombinante Fusionsprotein GFP-mCherry durch Bindung an den jeweiligen synthetischen Zytokinrezeptor (*synthetic cytokine receptor*, SyCyR) eine Heterodimerisierung auslösen, könnte das physiologische Signal *downstream* imitiert werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit zur Rekrutierung völlig neuer Rezeptorkombinationen durch Stimulation mit anderen Kombinationen beider synthetischer Liganden. Den DNA-Sequenzen der jeweils an G<sub>VHH</sub> und C<sub>VHH</sub> gekoppelten SyCyRs wurde zusätzlich ein myc-*tag* (IFNAR1) und ein HA-*tag* (IFNAR2) angefügt, um die Immundetektion zu ermöglichen. Die Ergebnisse sollten jedoch nicht durch unterschiedliche Expressionsstärke der Rezeptoren verfälscht werden, weshalb beide DNA-Sequenzen in einem offenen Leseraster (OLR) vereinigt wurden (vgl. Abb. 8A und B). Eine zwischen den Rezeptoren gelegene Furin-Spaltstelle unterstützte die Wirkung des proteolytischen 2A-Peptides, sodass eine cotranslationale Spaltung erfolgen konnte. Ein Signalpeptid downstream des 2A-Peptides ist essentiell für die Oberflächenexpression des nachfolgenden Proteins. Dieses Prinzip wurde auch auf die murinen IFNARs des Wildtyps übertagen.



# Abb. 8: Schematische Darstellung des 2A-Konstruktes von SyCyR-2A-mIFNAR (A) und 2A-mIFNAR (B).

A Mehrere DNA-Abschnitte wurden in einem Leserahmen zusammengefügt, um eine gleichmäßige Expression beider Rezeptorketten zu gewährleisten. Diese Expressionskassette enthielt die cDNA für den synthetischen murinen IFNAR1 (lila) mitsamt green fluorescent protein-nanobody (GVHH, grün), myc-tag (hellgrün) und Signalpeptid (SP), als auch den synthetischen murinen IF-NAR2 (blau) mit mCherry-nanobody (C<sub>VHH</sub>, rot), HA-tag (hellrot) und Signalpeptid. Die Signalpeptide wurden während der Synthese des Proteins in das endoplasmatische Retikulum abgespalten. Beide Komplexe wurden durch das 2A-Peptid (orange) und die Furin-Spaltstelle (gelb) getrennt, sodass an dieser Stelle eine cotranslationale Spaltung erfolgen konnte. Durch das 2A-Peptid blieben 23 Aminosäuren (AS) am Carboxy-Terminus des upstream Proteins und 1 AS am N-Terminus des downstream Proteins erhalten. Die Furin-Spaltstelle sorgte dafür, dass der 23 AS-lange Überhang mit abgespalten wurde. **B** Die ungekürzten murinen IFNARs vom Wildtyp wurden entsprechend des Vorgehens bei den synthetischen Zytokinrezeptoren (SyCyRs) in einen gemeinsamen Leserahmen gebracht und ebenfalls mit myc-tag (INFAR1, dunkelgrau) und HA-tag (IFNAR2, hellgrau) versehen. Da die extrazelluläre Domäne hier nicht entfernt wurde, wurden auch keine nanobodies verwendet. Die Spaltung durch Furin-Schnittstelle und 2A-Peptid erfolgte wie auch bei SyCyR-2A-mIFNAR (vgl. Abb. 8A). Modifiziert nach Engelowski et al. und Fang et al. [138] sowie Yan et al. [139].

Um dimäre Fusionsproteine unterschiedlicher Kombinationen von GFP und mCherry zu generieren (vgl. Abb. 9), wurden die cDNAs der Proteine durch Engelowski *et al.* [130] und Moßner *et al.* [131] in CHO-K1-Zellen eingebracht, sodass diese Zellen jene Proteine in ihrem Zellüberstand exprimierten.

Diese Zellüberstände wurden filtriert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Entsprechend dieses Vorgehens wurden die Fusionsproteine GFP-mCherry, 2xGFP und 2xmCherry generiert und in dieser Arbeit verwendet. Eine andere Vorgehensweise wurde in der Arbeitsgruppe Scheller später etabliert. Dafür wurden die cDNAs der fluoreszierenden Proteine zusammen mit der cDNA für die Fc-Domäne des IgG-AK in einen gemeinsamen Leserahmen gebracht. Mit diesen cDNAs wurden CHO-K1-Zellen stabil transfiziert und exprimierten die gewünschten Proteine in den Zellkulturüberstand [131]. Der Fc-Teil von AK ist in der Forschung ein etabliertes Mittel um zwei Proteine miteinander zu dimerisieren, aber auch um exprimierte Proteine vereinfacht zu reinigen [140]. In dieser Arbeit wurden die so generierten Proteine GFP-mCherry-Fc und 2xGFP-Fc verwendet, die in Abbildung 9 dargestellt sind.



#### Abb. 9: Schematische Darstellung der synthetischen Liganden.

Homo- und heterodimere Fusionsproteine, welche als Liganden für den synthetischen IFNAR (SyCyR) dienten. Oben im Bild stellen sich die aus dem Fc-Teil des IgG (blaue Rechtecke) und den fluoreszierenden Proteinen GFP (grüner Kreis) und mCherry (roter Kreis) bestehenden Proteine GFP-Fc (G-Fc) und GFP-mCherry-Fc (GC-Fc) dar. Über das Fc-Fragment ist die Dimerisierung zweier Proteine möglich. Mit einem roten Strich sind verbindende Disulfidbrücken dargestellt. Darunter sind die Fusionsproteine GFP-mCherry (GC), 2xGFP (GG) und 2xmCherry (CC) abgebildet. Die cDNA aller Proteine wurde durch stabile Transfektion in CHO-K1 Zellen eingebracht, sodass diese Zellen die Proteine in den Zellkulturüberstand sezernierten. Dieser Überstand wurde bei den Fc-Proteinen anhand Protein A Affinitätschromatographie gereinigt und aliquotiert. Die CHO-K1-Zellen, welche die dimeren Fusionsproteine GG, GC und CC sezernierten, wurden anhand Geneticin-Resistenz selektiert. Unten im Bild zeigen sich die theoretisch möglichen Rezeptorkombinationen. Während G-Fc und GG IFNAR1-Homodimere (intrazelluläre Domäne (ICD) Iila, extrazelluläre Domäne (ECD) grün) und CC IFNAR2-Homodimere (ICD blau, ECD rot) rekrutieren könnten, wären bei GC-Fc alle drei dimeren Rezeptorkombinationen möglich. Modifiziert nach Mosner *et al.* [131] und Engelowski *et al.* [130]. Erstellt mit BioRender.com.

# 3.1.2 Klonierung der pcDNA3.1 Expressionsvektoren für die Transfektion eukaryotischer Zellen

Um die transiente Transfektion der cDNA von SyCyRs und wt-IFNARs in eukaryotische Zellen zu ermöglichen (vgl. 2.3.3), wurde diese mittels restriktionsenzymatischer Spaltung (EcoRV) aus dem Vektor pBluescript II SK (+) ausgeschnitten, der von der Firma BioCat synthetisiert wurde (vgl. Abb. 10A). Die weiterhin als insert dienenden Fragmente (SyCyR: 2494 bp, wt-IFNAR 3860 bp) wurden mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.2.5) identifiziert und anhand Gelextraktion entfernt und gereinigt (vgl. 2.2.6). Nachfolgend konnte die so isolierte cDNA von SyCyR und wt-IFNAR in den Expressionsvektor pcDNA3.1 (5340 bp) ligiert werden (vgl. 2.2.7), um die Plasmide pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR und pcDNA3.1-2A-mIFNAR zu generieren. Dieser Vektor musste zuerst mittels Restriktionsspaltung (EcoRV) aus dem Plasmid pcDNA3.1-Flag-HmIL23-His, welches dem Institut bereits vorlag, extrahiert werden. Die so generierten Plasmide wurden in chemisch-kompetente E. coli Zellen transformiert (vgl. 2.2.1). Putative Klone wurden anhand Mini-Präparation (vgl. 2.2.2) und einer analytischen Restriktionsspaltung durch Spel selektiert (vgl. Abb. 10B und C). Die hierdurch resultierenden Fragmentlängen betrugen 2811 bp und 6389 bp (pcDNA3.1-2A-mIFNAR) sowie 2259 bp und 5576 bp (pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR). Um größere Mengen Plasmid-DNA zu generieren, wurde eine Midi-Präparation (vgl. 2.2.2) der selektierten Klone durchgeführt und das Produkt ebenfalls anhand einer Restriktionsspaltung analysiert (vgl. Abb. 12C). Dabei spaltete Spel die Plasmid-DNA von pcDNA3.1-2A-mIFNAR (2811 bp, 6389 bp) und von pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR (2259 bp, 5576 bp).



#### Abb. 10: Klonierungsschema für pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR und pcDNA3.1-2A-mIF-NAR.

A Die restriktionsenzymatische Spaltung durch EcoRV extrahierte die als insert dienende Expressionskassette SyCyR-2A-mIFNAR (vgl. Abb. 8), beziehungsweise 2A-mIFNAR, aus seinem vorherigen Vektor pBlueScript II SK (+). Entsprechend wurde auch der Vektor pcDNA3.1 aus dem Plasmid pcDNA3.1-Flag-HmIL23-His entfernt, sodass dieser im nächsten Schritt mit dem insert ligiert werden konnte und das Plasmid pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR, beziehungsweise pcDNA3.1-2A-mIFNAR, generiert wurde. B Agarosegelelektrophorese der mittels Mini-Präparation extrahierten DNA von putativen Klonen, die mit pcDNA3.1-2A-mIFNAR transformiert wurden. Die Plasmide wurden durch das Enzym Spel gespalten und anhand Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt. Die resultierenden Fragmente sollten 2811 bp und 6389 bp lang sein. Verwendet wurde der Marker GeneRuler<sup>™</sup> Express DNA Ladder (5000-100 bp) (E) der Firma Thermo Fisher Scientific. Abgebildet sind jeweils 12 Klone von separat transformierten Bakterienstämmen 1 (oben) und 2 (unten). Ausgewählt wurden die Klone 1.9 und 2.7.C Agarosegelelektrophorese der mittels Mini-Präparation extrahierten DNA von 12 putativen Klonen, die mit pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR transformiert wurden. Die Plasmide wurden durch das Enzym Spel gespalten und anhand Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt. Die zu erwartende Fragmentlänge betrug 2259 bp und 5576 bp. Abgebildet sind jeweils 12 Klone von separat transformierten Bakterienstämmen 7 (oben) und 8 (unten). Ausgewählt wurden die Klone 7.4 und 8.8.

# 3.1.2.1 Nachweis der Expression des natürlichen IFNARs und des SyCyRs in HEK293T-Zellen

Zur Überprüfung der korrekten Expression der Interferonrezeptoren, wurden pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR und pcDNA3.1-2A-mIFNAR mittels transienter Transfektion (vgl. 2.3.3) in HEK293T-Zellen eingebracht.



Abb. 11: Expression des natürlichen IFNARs und des SyCyRs in HEK293T-Zellen.

Expression des natürlichen (wt-IFNAR, 2A-mIFNAR) und des synthetischen murinen IFNARs (SyCyR-2A-mIFNAR) in transient transfizierten HEK293T-Zellen. Nach 48 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen lysiert. Gleiche Mengen an Protein (50 µg) wurden anschließend mittels SDS-Page und Western Blot analysiert. Für die Detektion der Rezeptoren wurden Antikörper verwendet, die den myc-*tag* (IFNAR1) und den HA-*tag* (IFNAR2) banden. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. **A** Das Molekulargewicht der wt-IFNARs beträgt 65 kDa (IF-NAR1) und 69 kDa (IFNAR2). **B** Das Molekulargewicht der SyCyRs beträgt 33,7 kDa (IFNAR1) und 48,1 kDa (IFNAR2).

Als Kontrolle wurden HEK293T-Zellen mit pEGFP transfiziert, sodass diese nach erfolgter Transfektion unter dem Lichtmikroskop durch die endogene Synthese von GFP grün fluoreszierten. Anschließend wurden Proteinlysate erstellt (vgl. 2.4.1). Anhand SDS-PAGE (vgl. 2.4.2) und Western Blot (vgl. 2.4.3) konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren auch exprimiert wurden (vgl. Abb. 11). Wichtig ist anzumerken, dass sich im Western Blot höhere Molekulargewichte, gemessen in Kilodalton (kDa) abbilden. Dies lässt sich durch eine posttranslationale Glykosylierung der Proteine erklären.

# 3.1.3 Generierung von Ba/F3-gp130-Zellinien mit den synthetischen Rezeptoren für Typ I Interferone

Ba/F3-gp130-Zellen, welche dem Institut bereits vorlagen, wurden mit der cDNA der SyCyRs und wt-IFNARs retroviral transduziert (vgl. 2.3.4). Zuvor musste diese cDNA in pMOWS-Vektoren kloniert werden (vgl. Abb. 12A). Die Vektoren pMOWS-puro-GFP und pMOWS-hygro-GFP wurden im Vorfeld der Arbeit bereits mittels BamHI und EcoNI linearisiert. Dabei wurde der für GFP codierende Teil entfernt (vgl. Abb. 12A). Die Enden wurden mittels Klenow-Fragement zu glatten Enden aufgefüllt und anschließend dephosphoryliert (vgl. 2.2.7). Dies war nötig, da die cDNA der IFN-Rezeptoren als *insert* glatte Enden aufwies. So wurden verschiedene Zelllinien generiert, die im Rahmen der Analyse der an der Signaltransduktion beteiligten Proteine zur Anwendung kommen sollten. Durch das Restriktionsenzym EcoRV wurde die 2A-Expressionskassette (SyCyR: 2494 bp, wt-IFNAR 3860 bp) aus dem Plasmid pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR beziehungsweise pcDNA3.1-2A-mIFNAR isoliert. Die Größentrennung der Fragmente erfolgte via Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.2.5). Anschließend wurde die gewünschte cDNA durch Gelextraktion (vgl. 2.2.6) aus dem Gel entfernt, gereinigt und in die Vektoren pMOWS-hygro (6088 bp) und pMOWS-puro (5721 bp) ligiert (vgl. 2.2.7). Diese lagen bereits in geschnittener und dephosphorylierter Form vor und konnten direkt verwendet werden. Im Anschluss an die Transformation in chemisch kompetente E. coli Bakterien (vgl. 2.2.1) wurde eine colony-PCR (vgl. 2.2.8) unter Verwendung der primer DF86 und DF606 (2A-mIFNAR) sowie DF85 und DF604 (SyCyR-2A-mIFNAR) durchgeführt (vgl. Abb. 12B). Es sollten Klone selektiert werden. Bei einer korrekten Aufnahme des Plasmides während der Transformation, wurde ein Fragment mit einer Länge von 626 bp (2A-mIFNAR) oder 707 bp (SyCyR-2A-mIFNAR) amplifiziert. Mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.5) konnten die entsprechenden putativen Klone identifiziert werden. Anschließend wurden diese nach Mini-Präparation einer weiteren restriktionsenzymatischen Spaltung durch Hindlll unterzogen. Nach der folgenden Midi-Präparation erfolgte die abschließende analytische Restriktionsspaltung (vgl. Abb. 12 C). Dabei schnitt das Enzym Spel die Plasmide pMOWS-puro-SyCyR-2A-mIFNAR (2345 bp, 5872 bp), pMOWS-hygro-SyCyR-2A-mIFNAR (2345 bp, 6293 bp), pMOWS-puro-2A-mIFNAR (2894 bp, 6682 bp) und pMOWS-hygro-2A-mIFNAR (2894 bp, 7049 bp). Mit den pMOWS-Expressionsvektoren wurden Ba/F3-gp130-Zellen retroviral transduziert (vgl. 2.3.4). Im Rahmen der Arbeit wurden zwei Zelllinien generiert, die die SyCyRs bildeten und zwei, die natürliche murine Interferonrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche zeigten. Jeweils eine davon war mit einer Puromycin-, die andere mit einer Hygromycin-Resistenz ausgestattet (vgl. Abb. 13). Anhand dieser Antibiotika erfolgte die Selektion der transduzierten Zellen. Entsprechend waren die Zellen nun in der Lage, entweder den synthetischen- oder den natürlichen IFNa-Rezeptorkomplex auszubilden. Folgend war auch die Analyse einer Formation neuer Rezeptorkombinationen im Hinblick auf Homodimere in Ausblick gestellt.





A Mit Hilfe des Restriktionsenzyms EcoRV konnte der Leserahmen für SyCyR-2A-mIFNAR, beziehungsweise für 2A-mIFNAR, aus dem Verbund mit dem Vektor pBluescript II SK (+) isoliert werden. Anschließend wurden diese cDNAs als inserts neu ligiert. Dafür wurden die Vektoren pMOWS-hygro und pMOWS-puro verwendet, welche dem Labor schon in linearisierter (eröffnet mit BamHI und EcoNI), dephosphorylierter Form vorlagen. Mittels Klenow-Fragment wurden die sticky ends zuvor bereits zu blunt ends aufgefüllt. Die Plasmide pMOWS-puro-SyCyR-2A-mIF-NAR und pMOWS-puro-2A-mIFNAR vermittelten eine Resistenz gegenüber Puromycin während pMOWS-hygro-SyCyR-2A-mIFNAR und pMOWS-hygro-2A-mIFNAR eine Resistenz gegen Hygromycin B bewirkten, B Analyse putativer E.coli Klone (Nummerierung, selektierte markiert mit weißem Pfeil) mittels colony-PCR nach Transformation mit dem Plasmid pMOWS-puro-2A-ml-FNAR. Auftrennung nach Fragmentlänge mittels Agarosegelelektrophorese. Zu erwarten war eine Fragmentlänge von 626 bp (Basenpaare). Verwendet wurden die primer DF606 und DF86. Zur Kontrolle wurden H<sub>2</sub>O (H) und ein Bakterienklon (K) verwendet, welcher mit dem religierten Vektor transformiert wurde. Verwendet wurden die Marker GeneRuler<sup>™</sup> 1kb DNA Ladder (10000-250 bp) (1kb) und GeneRuler<sup>™</sup> Express DNA Ladder (5000-100 bp) (E) der Firma Thermo Fisher Scientific. C Agarosegelelektrophorese des Produktes der Midi-Präparationen. Das Restriktionsenzym Spel spaltete die DNA von SyCyR-2A-mIFNAR in den Vektoren pcDNA3.1 (2259 bp, 5576 bp), pMOWS-puro (pMOWS-P) (2345 bp, 5872 bp) und pMOWS-hygro (pMOWS-H) (2345 bp, 6293 bp). Ebenso wurde die DNA von 2A-mIFNAR in den Vektoren pcDNA3.1 (2811 bp, 6389 bp), pMOWS-puro (pMOWS-P) (2894 bp, 6682 bp) und pMOWS-hygro (pMOWS-H) (2894 bp, 7049 bp) gespalten. Als Kontrolle (K) diente das jeweilige Plasmid ohne Zugabe von Restriktionsenzymen. Die Zahlen über den Proben bezeichnen den jeweiligen Klon.



#### Abb. 13: Schematische Darstellung der generierten Ba/F3-gp130-Zelllinien.

In hellblauer Darstellung finden sich Ba/F3-gp130-Zellen, die humanes gp130 exprimieren. Aus dieser dem Institut vorliegenden Zelllinie (oben im Bild) wurden mittels retroviraler Transduktion die auf den Pfeilen abgebildeten Expressionsplasmide stabil in das Genom der Zelle eingebracht. Die Zellen waren dadurch jeweils mit einer Resistenz gegen die Selektionsantibiotika Hygromycin B (schwarzer Pfeil) oder Puromycin (gelber Pfeil) ausgestattet. Gleichermaßen erfolgte auch die Erstellung von Ba/F3-gp130-SyCyR-2A-mIFNAR-Zellen, ebenfalls mit entsprechenden Resistenzen. Schematisch visualisiert sind die jeweils ausgeprägten Rezeptoren. Dabei besitzt jede Zelllinie den in hellblau abgebildeten gp130. Die Ba/F3-gp130-2A-mIFNAR-Zellen prägen den Wildtyp-IFNAR1 (lila) und -IFNAR2 (dunkelblau) aus, während die von den Ba/F3-gp130-SyCyR-2A-mIFNAR-Zellen exprimierten SyCyRs in grün (IFNAR1-G<sub>VHH</sub>) und rot (IFNAR2-C<sub>VHH</sub>) zur Darstellung kommen. Erstellt mit BioRender.com.

Das Ausmaß der Oberflächenexpression der Interferonrezeptoren in den Ba/F3-gp130-Zelllinien wurde mittels Durchflusszytmetrie (vgl. 2.3.7) bestimmt. Ein primärer AK gegen den myc-*tag* und den HA-*tag* markierte die Rezeptoren. Durch anschließende Zugabe eines sekundären AK, der an einen Fluorophor gekoppelt war, wurde die Quantität der transgenen Expression anhand der resultierenden Fluoreszenz durch einen Laser gemessen. Zum Vergleich wurden untransfizierte Ba/F3-gp130-Zellen mit analysiert. Abbildung 14 zeigt diese Fluoreszenz auf der X-Achse sowie die analysierte Zellzahl auf der Y-Achse. Die Verschiebung der farblosen Histogramme gegenüber der grau hinterlegten Negativkontrollen ist beweisend für eine erfolgreiche Expression der SyCyRs und wt-IFNARs auf der Zelloberfläche.



#### Abb. 14: Analyse der Oberflächenexpression von wt-IFNAR (A) und SyCyR (B) auf Ba/F3gp130-Zelllinien mittels Durchflusszytometrie.

**A** Retroviral transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen (Ba/F3-gp130-hygro-2A-mIFNAR, Ba/F3-gp130-puro-2A-mIFNAR) wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie hinsichtlich der Oberflächenexpression von wt-IFNAR1 und wt-IFNAR2 untersucht. Die Zellen wurden mit einem primären Antikörper (α-myc, α-HA) inkubiert. Die Messung wurde durch einen sekundären Antikörper ermöglicht, der zur Fluoreszenz befähigt war und den primären Antikörper band. Diese Fluoreszenzintensität ist auf der X-Achse dargestellt, wobei unterhalb dieser die Zuordnung zu den jeweiligen Rezeptoren einzusehen ist. Der Y-Achse ist zu entnehmen, wie viele Zellen durchflusszytometrisch analysiert wurden. Das grau hinterlegte Histogramm stellt untransduzierte, als Kontrolle dienliche, Ba/F3-gp130-Zellen dar und das farblose Histogramm die jeweils untersuchte Zelllinie. **B** Die Darstellung gleicht A, doch handelt es sich um die Analyse der Zelllinien Ba/F3-gp130hygro-SyCyR-2A-mIFNAR und Ba/F3-gp130-puro-SyCyR-2A-mIFNAR. Hier wurde die Oberflächenexpression der SyCyRs untersucht, die ebenfalls anhand ihres myc-*tags* (IFNAR1) und HA*tags* (IFNAR2) erkannt wurden.

# 3.2 Analyse der interferonabhängigen Signaltransduktion

# 3.2.1 SyCyRs zeigen eine mit wt-IFNARs vergleichbare Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges in HEK293-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Signalweiterleitung der SyCyRs den natürlichen IFNARs entspricht, wurden die transient transfizierten HEK293-Zelllinien stimuliert (vgl. 2.3.5). Weiterhin wurde die Aktivierung der Signalproteine mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (vgl. 2.4.1-3). Die Heterodimerisierung von IFNAR1 und IFNAR2 sollte im Falle der HEK293-SyCyR-2A-mIFNAR-Zellen mit GFP-mCherry und bei den HEK293-2A-mI-FNAR-Zellen mit IFNa4 erfolgen. Als Positivkontrolle wurde das synthetische Zytokin HIL-6 verwendet, welches das natürlicherweise in HEK293-Zellen vorkommende gp130 aktiviert und somit eine Phosphorylierung von Signalproteinen initialisiert. Um die ligandenunabhängige Aktivierung der Rezeptorkomplexe auszuschließen, wurden unstimulierte Zellen der jeweiligen Zelllinien mit untersucht. HEK293-pEGFP-Zellen wurden ebenfalls nach diesem Schema in die Untersuchungen miteinbezogen. So konnte gezeigt werden, dass die ausgelöste Signaltransduktion auf den eingebrachten Interferonrezeptoren beruhte und nicht auf endogenen Prozessen. Es zeigte sich eine vergleichbare Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges des synthetischen und wt-Rezeptorkomplexes (vgl. Abb. 15). Bei beiden führte eine Heterodimerisierung zu einer Phosphorylierung von STAT1 und STAT2, während STAT3 inaktiv blieb. Bei den HEK293-pEGFP-Zellen blieb die Aktivierung der STAT-Moleküle erwartungsgemäß aus. Die Positivkontrolle mittels HIL-6 zeigte eine ebenfalls in allen Zelllinien äquivalente Aktivierung von pSTAT1 und pSTAT3. Nach der Rezeptorvermittelten Phosphorylierung der STAT-Moleküle kommt es zu deren Dimerisierung. Dabei spielen vor allem die Homodimerisierung von STAT1 als auch die Heterodimerisierung von STAT1 und -2 eine große Rolle. Jedoch sind andere STAT-Moleküle wie STAT3-6 ebenfalls an der Signaltransduktion beteiligt. Anschließend findet die Translokation in den Nukleus statt, wo diese als Transkriptionsfaktoren dienen.



Abb. 15: Aktivierung des JAK-STAT-Weges in transient transfizierten HEK293-Zellen.

Aktivierung von STAT-Molekülen in transient transfizierten HEK293-Zellen. Diese wurden entweder mit der cDNA der natürlichen (2A-mIFNAR) oder der synthetischen murinen IFNARs (SyCyR-2A-mIFNAR) transfiziert. Als Kontrolle dienten mit pEGFP transfizierte Zellen. Stimuliert wurden die Zellen mit 20 ng/ml HIL-6 für 20 min und 200 U/ml IFNa4 oder 10 ng/ml GFP-mCherry (GC) für jeweils 30 min. Weiterhin wurden unstimulierte Zellen in den Versuch mit einbezogen. Je 50 µg Protein wurden mittels spezifischer Antikörper analysiert. Zum einen erlaubten Antikörper gegen myc-*tag* und HA-*tag* eine Detektion der natürlichen und synthetischen Rezeptoren. Zum anderen wurden Antikörper genutzt, die STAT1, pSTAT1, STAT2, pSTAT2, STAT3 und pSTAT3 erkannten. Es handelt sich um die Western Blot Daten eines repräsentativen von insgesamt drei Versuchen.

#### 3.2.2 JAK1 und TYK2 sind essenziell für die IFNAR-Signaltransduktion

Um die Rolle der an IFNARs assoziierten Kinasen TYK2 (IFNAR1) und JAK1 (IFNAR2) zu untersuchen, wurden kinasedefiziente Zelllinien genutzt. Dabei handelte es sich um die Tyk2-defizienten U1A-Zellen, die JAK1-defizienten U4C-Zellen und die JAK2-defizienten γ2A-Zellen. Diese Zellen wurden transient transfiziert (vgl. 2.3.3), sodass sie entweder den wt-IFNAR (pcDNA3.1-2A-mIFNAR) oder die SyCyRs (pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR) auf ihrer Zelloberfläche exprimierten. Die Expression der natürlichen und synthetischen Rezeptoren konnte anhand gegen den myc-*tag* (IFNAR1) und den HA-*tag* (IFNAR2) gerichteter Antikörper nachgewiesen werden (vgl. Abb. 16 und 17). Die Defizienz der entsprechenden Kinasen konnte mittels Antikörper gegen JAK1, JAK2 und TYK2 nachgewiesen werden. Stimuliert wurden diese Zellen mit IFNα4 und GFP-mCherry (wtIFNAR) beziehungsweise mit GFP-mCherry, 2xGFP und 2xmCherry (SyCyR). Da alle diese Zelllinien gp130 ausprägten, wurden HIL-6 als Positiv- und unstimulierte Zellen als Negativkontrolle verwendet. Analog zum Stimulationsassay der

HEK293-Zellen wurden Zellen mit pEGFP-Transfektion als Kontrolle einbezogen und entsprechend den mit pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR transfizierten Zellen stimuliert.



# Abb. 16: Testexpression und Stimulation in kinasedefizienten Zellinien U1A (A), U4C (B) und $\gamma$ 2A (C), die den wt-IFNAR exprimierten.

STAT1-Aktivierung in U1A-, U4C- und  $\gamma$ 2A-Zellen, die mit der cDNA für den natürlichen murinen IFNAR (2A-mIFNAR) transient transfiziert wurden. Die Zellen wurden stimuliert mit 20 ng/ml HIL-6 für 20 min, 200 U/ml IFNa4 für 30 min und 10 ng/ml GFP-mCherry (GC) für 30 min. Gleiche Mengen an Protein wurden mittels Antikörpern analysiert, die gegen myc-*tag* und HA-*tag*, sowie STAT1, pSTAT1, JAK1, JAK2 und TYK2 gerichtet waren. Es handelt sich um die Western Blot Daten eines repräsentativen von insgesamt drei Versuchen. **A** Transient transfizierte TYK2-defiziente U1A-Zellen. **B** Transient transfizierte JAK1-defiziente U4C-Zellen. **C** Transient transfizierte JAK2-defiziente  $\gamma$ 2A-Zellen. Diese Daten wurden publiziert [141].


# Abb. 17: Testexpression und Stimulation in kinasedefizienten Zellinien U1A (A), U4C (B) und $\gamma$ 2A (C), die den SyCyR exprimierten.

STAT1-Aktivierung in mit der cDNA für den synthetischen IFNAR (SyCyR-2A-mIFNAR) transient transfizierten U1A-, U4C- und γ2A-Zellen. Neben der Kontrolle mittels unstimulierten Zellen, wurden auch mit pEGFP transfizierte Zellen in den Versuch miteinbezogen. Die Zellen wurden stimuliert mit 20 ng/ml HIL-6 für 20 min, 10 ng/ml GFP-mCherry (GC), 10 ng/ml 2xGFP (GG) und 10 ng/ml 2xmCherry (CC) für jeweils 30 min. Äquivalente Mengen an Protein (50µg) wurden mittels Antikörpern analysiert, die pSTAT1, STAT1, JAK 1, JAK2 und TYK2 erkannten. Antikörper die den myc-*tag* und den HA-*tag* banden, bestätigten die Expression der synthetischen Rezeptoren. Es handelt sich um Western Blot Daten eines repräsentativen von insgesamt drei Versuchen **A** Transient transfizierte TYK2-defiziente U1A-Zellen. **B** Transient transfizierte JAK1-defiziente U4C-Zellen. **C** Transient transfizierte JAK2-defiziente γ2A-Zellen. Diese Daten wurden publiziert [141].

Das Ergebnis der Immundetektion mittels Western Blot zeigte, dass weder eine Stimulation der wt-Rezeptoren mit IFNα4 noch die der SyCyRs mit GFP-mCherry eine Signaltransduktion in Form einer Phosphorylierung von STAT1 auslöste, wenn die Zelllinie TYK2 oder JAK1 defizient war. Lediglich bei den γ2A-Zellen konnte pSTAT1 nachgewiesen werden (Abb. 16 und 17).

Das Fehlen einer der beiden Kinasen führt demnach zu einer Unterbrechung der STAT1-Aktivierung und damit einem Hauptsignalweg der IFNARs. Dies erlaubt den Rückschluss, dass beide assoziierten Kinasen essenziell für die Signalweiterleitung sowohl der natürlichen als auch der synthetischen Rezeptoren sind. Ein Hinweis auf die Hintergrundfreiheit des synthetischen Liganden ist, dass unter Stimulation der natürlichen Rezeptoren mit GC keine STAT-Aktivierung stattfand (Abb. 16).

Da die Formation von IFNAR2-Homodimeren bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde, mag die fehlende Aktivierung von STAT-Molekülen in U1A-Zellen unter Stimulation der SyCyRs mit 2xmCherry an einer zu geringen Konzentration des konditionierten CHO-K1-Zellüberstandes liegen [141, 142].

## 3.2.3 Die Signaltransduktion von synthetischen IFNARs und den Wildtyprezeptoren ist vergleichbar

In Punkt 3.1.3 wurde die Erstellung verschiedener Ba/F3-gp130-Zelllinien beschrieben, die hinsichtlich der Aktivierung des JAK-STAT-Weges näher charakterisiert werden sollten. Dementsprechend wurden Ba/F3-gp130-SyCyR-2A-mIFNAR-Zellen, Ba/F3-gp130-2A-mIFNAR-Zellen und Ba/F3-gp130-Zellen mit IFNα4, GFP-mCherry, 2xGFP, 2xmCherry, sowie als Positivkontrolle mit HIL-6 stimuliert.

Die in Abbildung 18 dargestellten Ergebnisse schließen eine interferonunabhängige Aktivierung der Signalproteine aus, da es ohne Zugabe von Stimulantien zu keiner Reaktion kam. Analog zu den HEK293-Zellen konnte auch in den Ba/F3-gp130-Zellen unter Stimulation der wt-IFNARs mit IFNa4 und der SyCyRs mit GFP-mCherry eine Induktion von pSTAT1 und pSTAT2 nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich zusätzlich eine Phosphorylierung von STAT3 und STAT5, die bei den HEK293-Zellen nicht detektiert werden konnte. Zudem wurde sowohl bei den Ba/F3-gp130-SyCyR-2A-mIFNAR-Zellen als auch den Ba/F3-gp130-Zellen eine Aktivierung der Signalproteine unter Zugabe von IFNa4 beobachtet. Dies deutet auf das Vorhandensein von Interferonrezeptoren auf der Zelloberfläche von Ba/F3-gp130-Zellen hin, so wie es in der Literatur bereits beschrieben ist [143].



# Abb. 18: Analyse der intrazellulären Signalwege von SyCyR und wt-IFNAR in Ba/F3-gp130 Zellen.

STAT- und ERK-Aktivierung in retroviral transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen, welche den natürlichen wt-IFNAR (**A**) oder den SyCyR (**B**) ausprägten. Als Kontrolle dienten untransduzierte Zellen (**C**). Die Zellen wurden mit 200 U/ml IFNα4, 100 ng/ml GFP-mCherry (GC), 100 ng/ml 2xGFP (GG) und 100 ng/ml 2xmCherry (CC) für jeweils 30 min stimuliert. Neben den für 20 min mit 20 ng/ml HIL-6 stimulierten Zellen, wurden unstimulierte Zellen miteinbezogen. Anschließend erfolgte die Detektion von Signalproteinen mittels SDS-PAGE und Western Blot. Dabei wurden gleiche Mengen Protein mittels spezifischer Antikörper analysiert, die pSTAT1, STAT1, pSTAT2, STAT2, pSTAT3, STAT3, pSTAT5, STAT5, pERK1/2 und ERK1/2 erkannten. Dargestellt sind die Western Blot Daten eines repräsentativen von insgesamt drei Versuchen. Schlussfolgernd zeigen diese Western Blot Daten (Abb. 18), dass die SyCyRs auch in Ba/F3-gp-130-Zellen dazu in der Lage sind, den natürlichen IFNAR-Signalweg in Form einer Aktivierung von STAT1, STAT2, STAT3 und STAT5 zu phänokopieren. Der Erk-Signalweg konnte hier nur durch HIL-6 über gp130 ausgelöst werden. Interessant war ferner die leichte Detektion von pSTAT3 und pSTAT5 unter Stimulation der SyCyRs mit 2xGFP. Dies würde auf die Formation von IFNAR1 Homodimeren hindeuten. Allerdings sollte es sich in späteren Analysen anhand DNA-*microarray* als Artefakt herausstellen.

## 3.2.4 Ba/F3-gp130-Zellen mit SyCyRs oder wt-IFNARs zeigen keine IFNabhängige Proliferation

Anhand eines Proliferationsassays (vgl. 2.3.6) sollte das IFNAR-abhängige Proliferationsverhalten von Ba/F3-gp130-Zellen analysiert werden (vgl. Abb. 19). Dazu wurden untransduzierte Ba/F3-gp130-Zellen sowie jene, die den SyCyR oder den wt-IFNAR exprimierten, mit GFP-mCherry, IFNa4 und HIL-6 stimuliert. Von der gemessenen Fluoreszenz wurde auf die Proliferationsstärke der Zellen unter dem jeweiligen Stimulans geschlossen. HIL-6 löste dabei als Positivkontrolle in jedem Fall ein proliferatives Signal aus, vermittelt über gp130. Es zeigte sich im Folgenden jedoch keine ligandenabhängige Proliferation der untersuchten transduzierten Zelllinien, weder durch IFNa4 noch durch GFP-mCherry. Aus dem Stimulationsassay der Ba/F3-gp130-Zellen (vgl. Abb. 18) wurde ersichtlich, dass eine pSTAT3-Aktivierung jedoch durchaus vorlag.



#### Abb. 19: Proliferation der Ba/F3-gp130-Zelllinien nach Stimulation mit natürlichen und synthetischen Liganden.

Ba/F3-gp130-SyCyR-2A-mIFNAR-Zellen, die SyCyRs auf ihrer Zelloberfläche exprimierten sowie die den wt-IFNAR ausbildenden Ba/F3-gp130-2A-mIFNAR-Zellen, wurden mit einer Puromycin oder Hygromycin B Resistenz ausgestattet (vgl. Abb. 13). Die Zellen wurden jeweils mit 20 ng/ml HIL-6, 100 ng/ml GFP-mCherry und 200 U/ml IFNa4 stimuliert. Anschließend wurde die Proliferation entsprechend der gemessenen Fluoreszenzstärke, die der Ordinate entnommen werden kann, quantifiziert. Abgebildet sind die Standardabweichungen der Mittelwerte von Triplikaten. Es handelt sich um einen repräsentativen von drei Versuchen.

## 3.3 Analyse der Interferon-induzierten Genexpression

# 3.3.1 Die Dynamik der Genexpression von MX1 und OASL1 durch den SyCyR ist vergleichbar mit der des wt-Rezeptors

Neben der Analyse der interferonabhängigen Signaltransduktion über Detektion aktivierter Signalproteine, sollte zusätzlich die darüber eingeleitete finale Genexpression als Endpunkt genauer analysiert werden. Dazu wurden Ba/F3-gp130-2A-mIFNAR-Zellen, Ba/F3-gp130-SyCyR-2A-mIFNAR-Zellen als auch untransduzierte Ba/F3-gp130-Zellen im Rahmen eines Stimulationsassays über verschiedene Zeiträume samt Stimulans inkubiert (30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h). Die den wt-IFNAR exprimierenden Zellen wurden mit IFNa4 behandelt und die Ba/F3-gp130-SyCyR-2A-mIFNAR-Zellen hingegen mit GFPmCherry. Unstimulierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Stimulation



# Abb. 20: Analyse der Kinetik der Genexpression von MX1 in Ba/F3-gp130-Zellen mittels *real-time* qPCR.

Relative Genexpression von MX1 in Ba/F3-gp130-Zellen, die mit der cDNA für den wt-IFNAR (blau) oder den SyCyR (orange) retroviral transduziert wurden. Die Zellen wurden über verschiedene Zeiträume (30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h) mit 20 ng/ml HIL-6 und 200 U/ml IFNa4 (wt) oder 100 ng/ml GFP-mCherry (SyCyR) stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als zusätzliche Kontrolle. Nach Isolation der RNA und Umwandlung in cDNA erfolgte die Ermittlung der relativen Genexpression von MX1 mittels *real-time* qPCR. Die Standardabweichung ist in grau dargestellt. Es handelt sich um einen repräsentativen von drei Versuchen.

mit HIL-6 aktivierte gp130, doch war nicht dazu in der Lage, die Expression der untersuchten ISGs einzuleiten und verdeutlichte damit deren Spezifität im Hinblick auf die interferonabhängige Signaltransduktion. Anhand der mittels *real-time* qPCR (vgl. 2.2.8) analysierten Genexpression von MX1 und OASL1 (vgl. Abb. 20 und 21) konnte gezeigt werden, dass der SyCyR den wt-IFNAR nicht nur in der Aktivierung wichtiger Signalproteine (vgl. 3.2.3), sondern ebenfalls in der Expression interferonspezifischer Gene phänokopieren kann. Es war zu beobachten, dass der synthetische Rezeptor sogar das zeitliche Muster der Expressionsstärke imitiert (vgl. Abb. 20). Somit war eine Ausprägung der Gene stets erst nach 2 h Stimulationsszeit zu erwarten, während das Maximum nach 4 h eintrat, um nach 6 h wieder einen Abwärtstrend einzunehmen.



Abb. 21: Relative Genexpression von OASL1 in Ba/F3-gp130-Zellen mittels *real-time* qPCR. Relative Genexpression von OASL1 in Ba/F3-gp130-Zellen, die mit der cDNA für den wt-IFNAR (links) oder den SyCyR (rechts) retroviral transduziert wurden. Die Zellen wurden über 4 h mit 20 ng/ml HIL-6 und 200 U/ml IFNa4 oder 100 ng/ml GFP-mCherry stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als zusätzliche Kontrolle. Nach Isolation der RNA und Umwandlung in cDNA erfolgte die Ermittlung der relativen Genexpression von OALS1 mittels *real-time* qPCR. Die Standardabweichung ist in grau dargestellt. Es handelt sich um einen repräsentativen von drei Versuchen.

Auffallend ist jedoch die höhere relative Expressionsstärke der SyCyRs im Vergleich zu den Wildtyp-Rezeptoren, sowohl bei MX1 als auch bei OASL1. Dies könnte auf das Verhältnis der Menge von IFNa4 zu GFP-mCherry zurückzuführen sein. Während die WT-Rezeptoren mit wenigen Units an IFNa4 stimuliert wurden, wurde bei den SyCyRs 100 ng/ml GFP-mCherry verwendet. Dies führt zu der Vermutung, dass die Menge des synthetischen Liganden nicht proportional ist zu der des natürlichen. Entsprechend zeigt sich in Abb. 18B ein stärkeres Signal unter Stimulation mit GFP-mCherry als mit IFNa4.

## 3.3.2 Analyse der Genexpression von synthetischen IFNARs und Wildtyprezeptoren mittels *microarray*

Neben der Analyse spezifischer IFN-induzierter Gene sollte die Genexpression umfassender untersucht werden. Dafür wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Al-Hasani (DDZ) eine Analyse *via microarray* durch Dr. rer. nat. Knebel durchgeführt (vgl. 2.2.10). Retroviral transduzierte Ba/F3-gp130-SyCyR-2A-mIFNAR-Zellen (vgl. 3.1.3) exprimierten den SyCyR, jedoch besaßen sie auch endogene wt-IFNARs (vgl. 3.2.3). Daher konnten beide Rezeptorkomplexe mit einer Zelllinie untersucht werden. Zunächst wurden die Zellen über 4 h mit 200 Units (U)/ml IFNa4 oder 100 ng/ml GC-Fc stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Anschließend wurde die RNA der Zellen isoliert und diese in cDNA überführt (vgl. 2.2.8). Mit der gewonnenen cDNA konnte der *microarray* durchgeführt werden und somit Rückschluss auf die mRNA-Expression infolge der Stimulation der Rezeptorkomplexe gezogen werden. In dem Streudiagramm sind vermehrt exprimierte Gene rot und vermindert exprimierte Gene blau gekennzeichnet. Vergleicht man nun die mRNA-Expression der mit IFNa4 stimulierten Zellen mit der von Zellen, welche mit GC-Fc stimuliert wurden (vgl. Abb. 22A, oben), wird eine große Überschneidung der regulierten Gene ersichtlich. Dabei wurden im Vergleich zur Kontrolle der unstimulierten Zellen jeweils sehr viele Gene vermehrt transkribiert, als vermindert (vgl. Abb. 22A Mitte, unten). Daraus lässt sich schließen, dass Gene durch beide Stimulationen in einem ähnlichen Maß vermehrt transkribiert wurden. Eine Darstellung besonders stark exprimierter mRNAs findet sich in Tabelle 22. Dabei sind die relative Veränderung der Expression nach Stimulation im Vergleich zum unstimulierten Zustand als auch der p-Wert miteinbezogen. Es fällt auf, dass sich natürliche und synthetische Signaltransduktion auch im Verhältnis der mRNA-Expressionslevel dieser Gene sehr ähneln. So sind die sechs Gene, welche die höchste Steigerung der Expression erfuhren, sowohl bei den synthetischen als auch bei den Wildtyprezeptoren die gleichen. Im Hinblick auf die zuvor analysierten Gene MX1 und IRF7 fällt ebenfalls auf, wie ähnlich das Expressionsverhalten von SyCyR und WT-Rezeptor ist. Diese weisen bei den WT-Rezeptoren eine relative Expressionsstärke von 10,25 (IRF7) und 4,89 (MX1) auf während bei den SyCyRs 10,45 (IRF7) und 4,61 (MX1) gemessen wurde.





Zur Verifizierung der Daten des *microarray* wurden Ba/F3-gp130-SyCyR-2A-mIFNAR-Zellen der selben Charge zusätzlich zu der erwähnten Stimulation (4 h mit 200 U/ml IFNa4 oder 100 ng/ml GC-Fc) mit 100 ng/ml G-Fc stimuliert und mittels *real-time* qPCR (vgl. 2.2.8) auf die Expression des ISG IRF7 untersucht (vgl. Abb. 22 B). Hier zeigte die Aktivierung der wt-IFNARs erneut eine vergleichbare Reaktion wie die mittels GC-Fc eingeleitete Signaltransduktion der SyCyRs. INFAR1 Homodimere ließen sich nicht mittels G-Fc aktivieren.

	IFNa4 vs unstimuliert		GC-Fc vs unstimuliert		
Rang- folge	Relative Verän- derung	P-Wert	Relative Verän- derung	P-Wert	Gen
1	62,59	6,07 x 10 <sup>-15</sup>	66,95	5,76 x 10 <sup>-15</sup>	Ifit1 - Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
2	38,11	4,94 x 10 <sup>-17</sup>	39,82	4,37 x 10 <sup>-15</sup>	Usp18 - Ubiquitin-specific pep- tidase 18
3	27,1	7,27 x 10 <sup>-13</sup>	29,37	5,59 x 10 <sup>-13</sup>	Mx2 - MX dynamin like GTPase 2
4	21,27	9,13 x 10 <sup>-13</sup>	24,75	3,59 x 10 <sup>-12</sup>	Tgtp1 - T-cell-specific guanine nucleotide triphosphate-binding protein 1
5	20,34	6,25 x 10 <sup>-12</sup>	24,1	5,7 x 10 <sup>-13</sup>	Rtp4 - Receptor transporter protein 4
6	18,25	4,11 x 10 <sup>-11</sup>	22,04	5,7 x 10 <sup>-13</sup>	Tgtp2 - T-cell-specific guanine nucleotide triphosphate-binding protein 2
12/13	10,25	3,59 x 10⁻¹ <sup>6</sup>	10,45	3,43 x 10 <sup>-16</sup>	Irf7 - Interferon regulatory factor 7
57/66	4,89	3,00 x 10⁻ <sup>8</sup>	4,61	4,70 x 10 <sup>-8</sup>	MX1 - MX dynamin-like GTPase 1

Tabelle 22: Regulierte mRNAs nach Stimulation mit IFNa4 oder GFP-mCherry-Fc (GC-Fc) in Ba/F3gp130-Zellen, welche den SyCyR ausprägen. Diese Daten wurden publiziert [141].

# 3.4 Analyse der IFNAR-Signaltransduktion unter Verwendung von Rezeptormutanten und -deletionen

#### 3.4.1 Übersicht der erfolgten Mutationen und Deletionen

Es wurden Mutations- und Deletionsvarianten der SyCyRs mittels SDM oder SOE-PCR (2.2.8) generiert, die der Literatur entnommen wurden [144-147]. Ziel jener genetischen Veränderungen durch SDM waren ausgewählte Tyrosine der intrazellulären Domäne der Rezeptoren, welche in Abbildung 23 aufgeführt sind. Ebenso wurden die drei Aminosäuren Isoleucin, Isoleucin und Glutaminsäure gegen jeweils Alanin ausgetauscht (IIE/AAA). Auch aufgeführt ist eine Deletion von 16 Aminosäuren, die mittels SOE-PCR generiert wurde (ΔK517-E532). Es wurden synthetische Rezeptoren mit deren natürlichen Varianten verglichen. Mittels beschriebener Modifikationen der Aminosäureabfolge sollte Erkenntnis über die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren bei der Signaltransduktion gewonnen werden.



#### Abb. 23: Übersicht der Mutations- und Deletionsvarianten des SyCyR.

Der SyCyR besteht aus zwei Untereinheiten. IFNAR1, der als extrazelluläre Domäne (ECD) einen *nanobody* (VHH) gegen *green fluorescent protein* (GFP) (grün, G<sub>VHH</sub>) aufweist und IFNAR2, der als ECD einen *nanobody* gegen mCherrry aufweist (rot, C<sub>VHH</sub>). Die Rezeptordimerisierung kann durch heterodimeres GFP-mCherry (grün-rot) eingeleitet werden. Zu den mittels *site directed mutagenesis* (SDM) kontrolliert eingeführten Modifikationen zählte der Austausch der hier aufgelisteten Tyrosine (Y) gegen Phenylalanin (F) an IFNAR1 und -2, sowie der Austausch der Aminosäuren Isoleucin, Isoleucin und Glutaminsäure (IIE) jeweils gegen Alanin (AAA) (IIE/AAA). Zusätzlich erfolgte die Generierung einer Deletion von 16 Aminosäuren ( $\Delta$ K517-E532) am IFNAR1. Dargestellt sind diese Veränderungen an der intrazellulären Domäne des IFNAR1 (lila) und IFNAR2 (blau).

Tabelle 23 stellt die genannten Mutationen und Deletionen in Verbindung mit den jeweils in der Literatur beschriebenen Effekten dar. Die zugehörigen Quellen sind ebenfalls aufgeführt. So führte beispielsweise die Mutation von Tyrosinen an Stelle 335 und 510 zu Phenylalanin dazu, dass keine STAT3 Aktivierung mehr zu messen war [147]. Wichtig ist, dass die Experimente der in Tabelle 23 genannten Quellen mit humanen IFNARs (hIFNAR) durchgeführt wurden. So entspricht Y337 des hIFANRs dem Y335 des mIF-NARs [141]. Die im Rahmen dieser Arbeit kreierten Mutations und Deletionsvarianten wurden in der Arbeitsgruppe für weitere Analysen verwendet [141].

mIFNAR1	hIFNAR1	Effekt	Quelle
Y455F	Y466F	Keine STAT2 Aktivierung	[144]
Y518F	Y527F	MHC-Klasse I Expression vergleichbar mit wt-Rezeptor	[145]
Y529F	Y538F	MHC-Klasse I Expression vergleichbar mit wt-Rezeptor	[145]
IIE→AAA	IIE→AAA	Keine TYK2-Bindung	[144]
Y518F/Y529F	Y527F/Y538F	Erhöhte MHC-Klasse I Expression Erhöhte ISGF3 Formation	[145]
∆K517-E532	∆K526-E541	Erhöhte MHC-Klasse I Expression Erhöhte ISGF3 Formation Erhöhte Sensitivität gegenüber IFNa	[145]
mIFNAR2	hIFNAR2		
Y335F	Y337F	STAT1/2 Aktivierung	[146]
Y510F	Y512F	STAT1/2 Aktivierung	[146]
Y335F/Y510F	Y3357F/Y512F	Keine STAT3 Aktivierung	[147]

Tabelle 23: Mutationen und Deletionen von mIFNAR1 und -2

## 3.4.2 Klonierungsprozess der Rezeptormutanten von pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR

In dem Plasmid pBlueScript II SK (+)-2A-mIFNAR wurden mittels SDM (vgl. 2.2.8) Punktmutationen erzeugt. Im Anschluss an die Transformation in chemisch kompetente *E. coli* Zellen (vgl. 2.2.1) wurde die Plasmid-DNA putativer Klone anhand des GeneJET Plasmid-Miniprep-Kit isoliert und restriktionsenzymatisch durch Xhol geschnitten. Die Fragmente (1988 bp, 3469 bp) wurden *via* Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.2.5) analysiert.



#### Abb. 24: Klonierungsschema der Mutationsvarianten des SyCyR.

A Die jeweilige Mutationsvariante eines synthetischen IFNAR1 oder -2 wurde durch EcoRV und Bsal präparativ aus dem Vektor pBlueScript II SK (+) geschnitten (2495 bp, 1578 bp, 1384 bp). Diese diente als *insert* bei der Ligation in den Vektor pcDNA3.1, welcher durch das Restriktionsenzym EcoRV (5340 bp, 1626 bp) aus dem Plasmid pcDNA3.1-Flag-HmIL23-His isoliert wurde. So entstand das Plasmid pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR mit der jeweiligen Mutation. **B** Agarosegelelektrophorese der Produkte der Midi-Präparation von Mutationsvarianten des SyCyR nach restriktionsenzymatischer Spaltung. Verwendet wurden die Enzyme NotI und Ndel, welche die Plasmid-DNA in Fragmente mit einer Länge von 2913 bp und 4922 bp schnitten. Die Zahlen bezeichnen die jeweiligen Mutationen: (1) IFNAR1-Y518F, (2) IFNAR1-Y529F, (3) IFNAR1-Y455F, (4) IFNAR2-Y335F, (5) IFNAR1-IIE/AAA, (6) IFNAR2-Y510F, (7) IFNAR1-Y518, 529F, (8) IFNAR2-Y335, 510F. Verwendet wurde der Marker GeneRuler<sup>™</sup> Express DNA Ladder (5000-100 bp) (E) der Firma Thermo Fisher Scientific. Die selektierten Klone wurden daraufhin sequenziert, um die Mutationen nachzuweisen, (vgl. 2.2.11) und einer Midi-Präparation unterzogen (vgl. 2.2.2), deren Produkt letztlich ebenfalls mittels einer Restriktionsspaltung durch Xhol (1988 bp, 3469 bp) analysiert wurde.

Daraufhin wurden die Mutationsvarianten von pBlueScript II SK (+)-2A-mIFNAR präparativ durch EcoRV und Bsal geschnitten (2495 bp, 1578 bp, 1384 bp). Der Vektor pcDNA3.1 wurde durch das Restriktionsenzym EcoRV (5340 bp, 1626 bp) aus dem Plasmid pcDNA3.1-Flag-HmIL23-His isoliert. Die gewünschten Fragmente (2495 bp, 5340 bp) wurden nach der Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.2.5) durch Gelextraktion (vgl. 2.2.6) isoliert und gereinigt. Es folgte die Ligation (vgl. 2.2.7) der Mutanten von SyCyR-2A-mIFNAR in den Vektor pcDNA3.1 (vlg. Abb. 24A) und die Transformation des Plasmides in chemisch kompetente E. coli Zellen (vgl. 2.2.1). Mittels colony-PCR (vgl. 2.2.8) wurden unter Verwendung der primer DF17 und DF606 putative Klone selektiert. Im Falle einer korrekten Aufnahme des Plasmides wurde ein Fragment mit der Länge von 537 bp amplifiziert, das sich in der folgenden Agarosegelelektrophorese darstellte. Die Plasmid-DNA der entsprechenden Klone wurde anhand des GeneJET Plasmid-Miniprep-Kit isoliert und durch eine Restriktionsspaltung und Agarose-Gelelektophorese (vgl. 2.2.6) analysiert. Es folgten die Sequenzierung für den Nachweis der Mutationen (vgl. 2.2.11) und die Midi-Präparation (vgl. 2.2.2) mitsamt abschließender Restriktionsspaltung (vgl. Abb. 24B). Die Restriktionsspaltung der Produkte der Mini- und Midi-Präparation wurden beide anhand der Enzyme Notl und Ndel (2913 bp, 4922 bp) durchgeführt. Alle Klone wiesen die erwarteten Veränderungen auf.

## 3.4.3 Klonierungsprozess einer Deletionsvariante von pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR

In dem Plasmid pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR wurde mittels SOE-PCR (vgl. 2.2.8) eine Deletion von 16 Aminosäuren (ΔK517-E532) des synthetischen IFNAR1 vorgenommen (ΔIFNAR1) (vgl. Abb. 25).



#### Abb. 25: Klonierungsschema von ΔIFNAR1.

Mittels SOE-PCR (*splicing by overlap extension* PCR) (vgl. 2.2.8) wurde eine Deletion von 16 Aminosäuren ΔK517-E532 in dem mIFNAR1 vorgenommen (ΔIFNAR1). Dieses SOE-PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR-script ligiert (pCR-script-SyCyR-2A-mIFNARΔK517-E532). Dieser wurde vor Beginn dieser Arbeit mit HincII linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Mittels der Restriktionsenzyme NotI und XhoI wurde das SOE-PCR-Produkt wieder präparativ isoliert. Das Plasmid pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR wurde ebenfalls präparativ durch diese Enzyme geschnitten, sodass ein Rest der 2A-Expressionskassette mit der cDNA für IFNAR2 im Vektor erhalten blieb. Dieser wurde mit der cDNA für ΔIFNAR1 ligiert, sodass das Plasmid pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNARΔK517-E532 resultierte, welches die vollständige Expressionskassette für beide IFNARs enthielt und auch die Deletion aufwies.

Das mittels PNK phosphorylierte SOE-PCR-Produkt mit der gewünschten Deletion wurde in den Vektor pCR-script ligiert, welcher dem Labor bereits dephosphoryliert und linearisiert (HincII) vorlag (vgl. 2.2.7).

Nach erfolgter Transformation in *E. coli* Zellen (vgl. 2.2.1) erfolgte eine *colony*-PCR (vgl. 2.2.8), um putative Klone zu selektieren. Anschließend wurde eine Mini- und später Midi-Präparation durchgeführt, jeweils mit analytischer Restriktionsspaltung. Das Plasmid wurde sequenziert (vgl. 2.2.11) und daraufhin einer präparativen Restriktionsspaltung unterzogen. Dabei schnitten die Restriktionsenzyme Xhol und Notl die DNA in Fragmente mit der Länge von 490 bp und 2885 bp (pCR-script-SyCyR-2A-mIF-NARΔK517-E532) sowie 538 bp und 7297 bp (pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR). Nun

konnte die Ligation (vgl. 2.2.7) des *inserts* ΔIFNAR1 (490 bp) in den Vektor pcDNA3.1 (7297 bp) erfolgen, sodass das Plasmid pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNARΔK517-E532 entstand. Dabei wurde die Expressionskassette der beiden IFNARs komplettiert, da deren Rest mit noch mit dem Vektor pcDNA3.1 verbunden war.

Nach der Transformation in chemisch kompetente *E. coli* Zellen (vgl. 2.2.1) wurden Klone mittels Mini-Präparation selektiert (vgl. 2.2.2) um daraufhin erneut sequenziert (vgl. 2.2.11) zu werden und abschließend mittels Midi-Präparation (vgl. 2.2.2) größere Mengen der DNA zu gewinnen. Nach Mini- und Midi-Präparation erfolgte jeweils erneut eine Restriktionsspaltung. Mit dieser DNA wurden HEK293-Zellen transient transfiziert (vgl. 2.3.3) und später lysiert (vgl. 2.4.1). Nach SDS-PAGE (vgl. 2.4.2) wurden myc-*tag* (IFNAR1) und HA-*tag* (IFNAR2) der Rezeptoren mittels spezifischer Antikörper im Western Blot (vgl. 2.4.3) nachgewiesen und somit die Expression der SyCyRs, welche die Deletion aufwiesen, bestätigt (vgl. Abb. 26).



#### Abb. 26: Testexpression der SyCyRs mit ΔIFNAR1 in transient transfizierten HEK293-Zellen.

Testexpression der SyCyRs, welche die Deletion ΔIFNAR1 aufwiesen, in HEK293-Zellen, die mit dem Plasmid pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNARΔK517-E532 (ΔIFNAR) transient transfiziert wurden. Das Plasmid weist in der cDNA des IFNAR1 eine Deletion von 16 Aminosäuren auf. Gleiche Mengen Protein wurden mittels Antikörpern analysiert, die den myc-*tag* und den HA-*tag* banden und somit die Expression der synthetischen Rezeptoren bestätigten. Es handelt sich um Western Blot Daten eines repräsentativen von insgesamt drei Versuchen.

# 4 Diskussion

# 4.1 SyCyRs erlauben die Reproduktion der Typ I IFNabhängigen Signaltransduktion

#### 4.1.1 Hintergrund

Die synthetische Zytokinbiologie erfuhr in den letzten Jahren eine intensive Entwicklung und es wurden viele Ansätze in Bereichen von modifizierten Liganden und Rezeptoren kreiert. Die Konstruktion eines vollkommen synthetischen Zytokin/Zytokinrezeptorsystems wurde durch die Arbeitsgruppe Scheller bereits anhand des IL-22-, IL-23- und IL-6/IL-11-Rezeptorkomplexes sowie der Rezeptoren der *tumor necrosis factor superfamily* (TNFSF) untersucht [130, 148, 149].

Um den natürlichen IFNAR, in dieser Arbeit als wt-IFNAR bezeichnet, imitieren zu können, wurden bei den SyCyRs, entsprechend der Ausführungen in Punkt 3.1.1, die natürliche TMD und ICD beibehalten. Lediglich die ECDs wurden gegen *nanobodies* ( $G_{VHH}$ ,  $C_{VHH}$ ) ausgetauscht, die jene fluoreszierenden Proteine erkannten, welche als synthetische Liganden fungieren sollten.

Entsprechend dieses Vorgehens, konnten Engelowski und Mitarbeiter bereits erfolgreich zeigen, dass das Fusionsprotein GFP-mCherry die Rezeptoruntereinheiten IL-12R
ß1 und IL-23R rekrutieren und somit die IL-23 vermittelte Signaltransduktion einleiten kann [130]. Zuvor konnte schon durch andere Arbeitsgruppen ein mit GVHH ausgestatteter Notch-Rezeptor mittels Transmitter-Zellen, die GFP auf ihrer Oberfläche exprimierten, juxtakrin aktiviert werden [150]. Der Vorteil des SyCyR-Systems besteht allerdings in der Aktivierbarkeit durch frei zirkulierende Liganden. Diese fluoreszierenden Proteine, etablierte und vielseitig genutzte Biomarker, wurden aufgrund ihrer nicht-toxischen Eigenschaften als auch der fehlenden physiologischen Bindungsstellen in Säugetierorganismen, ausgewählt [151, 152]. Auch die verwendeten nanobodies provozieren keine komplementvermittelte Immunreaktion in Organismen, da sie kein freies Fc-Fragment besitzen [91, 153]. So sollte gewährleistet werden, dass zum einen die Untersuchung der Signaltransduktion nicht verfälscht und zum anderen die Applikation in vivo nicht von Nebenwirkungen begleitet werden würde. Im Rahmen dieser Arbeit sollte diese Vorgehensweise auf die Typ I IFNs, die über den IFNAR die Transkription von ISGs einleiten, angewendet werden.

# 4.1.2 Das Aktivierungsmuster der STAT-Moleküle von wt-IFNARs und SyCyRs ist äquivalent

Die cDNAs des wt-IFNARs und des SyCyRs wurden jeweils in ein 2A-Konstrukt überführt (vgl. 3.1.1), sodass eine gleichmäßige Oberflächenexpression gewährleistet werden konnte. In einem ersten Schritt wurden diese Expressionskassetten in den Vektor pcDNA3.1 eingebracht, um so die transiente Transfektion von HEK293-Zellen zu ermöglichen. Anhand dieser eukaryotischen embryonalen Nierenzellen wurde mittels Western Blot das Aktivierungsmuster des JAK-STAT-Weges, des Hauptsignalweges der Typ I IFN-Antwort, analysiert. So zeigten die SyCyRs nach einer Stimulation mit GFP-mCherry, wie auch die wt-IFNARs mit IFNa4, eine Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT1 und STAT2, jedoch nicht von STAT3. Damit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass GFP-mCherry die Untereinheiten des SyCyR rekrutiert. Es ist jedoch beschrieben, dass IFN I zusätzlich die Aktivierung von STAT3,-4, -5 und -6 initiieren kann [154, 155], wobei die Bildung von pSTAT4 und -6 eher in Endothel- und bestimmten Zellen lymphoiden Ursprungs nachzuweisen ist [156, 157]. Dass pSTAT3 hier nicht nachzuweisen war, mag durch die Variabilität der Aktivierung von STATs in Abhängigkeit vom Zelltyp zu erklären sein [19], da unterschiedlichste Regulationsmechanismen auf der Ebene der Signalproteine greifen [13, 29].

In einem weiteren Ansatz zur Detektion der an der Signaltransduktion beteiligten STAT-Moleküle wurden die cDNAs von wt-IFNAR und SyCyR jeweils in den retroviralen Vektor pMOWS überführt und mittels retroviraler Transduktion in Ba/F3-gp130-Zellen eingebracht. So wurden stabile Zelllinien generiert, die den wt-IFNAR (Ba/F3-gp130-2A-mI-FNAR) oder den SyCyR (Ba/F3-gp130-SyCyR-2A-mIFNAR) auf ihrer Oberfläche exprimierten. Das als synthetischer Ligand dienliche Fusionsprotein GFP-mCherry initialisierte dabei die Dimerisierung der synthetischen mIFNAR1 und -2 und führte zur Phosphorylierung von STAT1, -2, -3 und -5. Wieder zeigte sich das gleiche Muster an rekrutierten STAT-Molekülen auch bei Stimulation des wt-IFNAR mit IFNα4.

STAT-Moleküle sind als bedeutender Hauptsignalweg der Typ I IFN-abhängigen Signaltransduktion verantwortlich für eine Vielzahl der mit IFNs assoziierten Eigenschaften und damit im Hinblick auf einen analytischen Vergleich durchaus aussagekräftig [7]. Dabei lassen sich sogar Effekte bestimmter STATs differenzieren, da diese jeweils spezifische ISGs rekrutieren können [13]. So scheint beispielsweise STAT3 die IFN I-vermittelte antivirale Immunantwort abzuschwächen [20, 29].

Zum einen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die synthetischen Interferonrezeptoren funktional waren, da sie eine Signaltransduktion einleiteten und zum anderen, dass die SyCyRs die natürlichen wt-IFNARs in der Rekrutierung von STAT-Molekülen imitieren können. Dies weist aufgrund der STAT-spezifischen Aktivierung von ISGs auf eine ebenfalls ähnliche konsekutive Zellantwort hin, ist jedoch nicht beweisend und damit Ziel weiterer spezifischer Untersuchungen. Dennoch spricht damit bereits einiges für eine solche Übereinstimmung.

## 4.1.3 Die Analyse des wt-IFNAR- und SyCyR-vermittelten Proliferationsverhaltens entspricht bekannten antiproliferativen Effekten der Typ I IFNs

In einem Ansatz zur Analyse des Proliferationsverhaltens unter Einfluss des wt-IFNAR und SyCyR wurden Ba/F3-gp130-2A-mIFNAR-Zellen mit IFNa4 und Ba/F3-gp130-SyCyR-2A-mIFNAR-Zellen mit GFP-mCherry stimuliert. Die Ergebnisse in Abbildung 18 als auch vergangene Veröffentlichungen zeigen, dass Ba/F3-gp130-Zellen endogene IFNARs besitzen [158]. Daher bräuchte es die Ba/F3-gp130-2A-mIFNAR-Zellen nicht zwingend. Die mit der cDNA der SyCyRs transfizierten Zellen wiesen somit nämlich den synthetischen als auch natürlichen IFNAR1 und IFNAR2 auf. Dabei ließ sich jedoch keine signifikante ligandenabhängige Proliferation im Vergleich zu unstimulierten Zellen detektieren. Es ist nicht verwunderlich, dass die Zellen unter Gabe von Typ I IFN keine Proliferation zeigten. Antiproliferative Mechanismen zählen zu den sogenannten einstellbaren (tunable) IFN-induzierten Effekten. Diese sind im Gegensatz zu den robusten (robust) Aktivitäten abhängig vom Zelltyp sowie dem Bindungsverhalten und der Konzentration des jeweiligen Typ I IFN [38]. So konnte eine IFNα2-Mutante, die eine sehr geringe Affinität zum INFAR1 und eine erhöhte Affinität zum IFNAR2 aufwies [159], robuste Aktivitäten, wie beispielsweise antivirale Effekte, erzeugen. Jedoch zeigte diese Mutante keine einstellbaren Eigenschaften, wie die antiproliferative Zellantwort. Dieses Phänomen erlaubte Levin et al. [38] zwischen beiden Arten an IFN-Eigenschaften zu differenzieren. Im beschriebenen Versuchsaufbau zum Proliferationsverhalten könnte die IFN I-abhängige Aktivierung der PKR ursächlich für mangelnde Proliferation sein [143]. Die PKR phosphoryliert und inhibiert den eukaryotic initiation factor-2 (eIF2) was zu einer Suppression der Translation führt [13]. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass IFNa in Korrelation zu einer erhöhten Expression der PKR eine inhibitorische Wirkung auf die IL-3 vermittelte Proliferation von Ba/F3-Zellen besitzt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass es unter anderem zu einer Verzögerung der Zellzyklus-Progression durch verminderte Expression von Regulatoren des G1-S-Übergangs wie Cyclin-D und CDK4 kam [158]. Das Proliferationsverhalten der in der vorliegenden Arbeit

untersuchten Zellen bestätigt damit diese Erkenntnisse um die antiproliferative Wirkung von Typ I IFNs.

#### 4.1.4 SyCyRs imitieren die Dynamik der Genexpression von wt-IFNARs

Ba/F3-gp130-SyCyR-2A-mIFNAR- und Ba/F3-gp130-2A-mIFNAR-Zellen wurden über verschiedene Zeiträume mit IFNa4, HIL-6, GFP-mCherry, GFP-mCherry-Fc oder 2xGFP-Fc stimuliert. Die daraufhin exprimierte mRNA wurde isoliert und in cDNA über-führt um Aussage über die Stärke der Genexpression zunächst *via real-time* qPCR treffen zu können. Es zeigte sich ein kinetisch einheitliches Expressionsmuster des Interferon-induzierten Gens MX1 (vgl. Abb. 20). Auch bei OASL1 und IRF7 ließ sich eine vergleichbare Steigerung der Expression nachweisen (vgl. Abb. 21, 22B). *MX dynamin-like GTPase 1* (MX1) lässt sich bei den MX-Proteinen einordnen, einer Gruppe konservierter GTPasen, die sich in allen Wirbeltieren finden. Ihre antiviralen Eigenschaften wirken gegen ein breites Spektrum an Viren [160, 161]. Das Gen 2'-5'-oligoadenylate synthetase *like 1* (OASL1) ist neben seiner antiviralen Aktivität auch Teil einer negativen *feedback*-Schleife, die eine überschießende IFN-Antwort verhindern soll [37, 162]. Der Transkriptionsfaktor IRF7 ist von großer Bedeutung für die Typ I IFN-Antwort. Seine Expression wird streng reguliert [163].

Die Untersuchung der Signalproteine mittels Western Blot erlaubte zwar Rückschluss auf die aktivierten Signalwege, doch ließ die Frage nach einer Übereinstimmung der Signalstärke wie auch der konsekutiven Zellantwort offen. Die separate Analyse dieser ausgewählten Gene sprach dafür, dass auch die Kinetik und Stärke der Genexpression bei natürlichem und synthetischem Rezeptorkomplex vergleichbar waren. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde eine umfassendere Analyse der mRNA-Expressionslevel mittels *microarray* durchgeführt. Dabei zeigte sich nach Stimulation der Zellen mit natürlichem oder synthetischem Liganden eine Übereinstimmung der Genexpression von 99,91%. Die verstärkt transkribierten Gene sind typische ISGs, darunter auch MX1 und IRF7.

Leichte Unterschiede zwischen den Zelllinien könnten unter anderem auf untersuchungsbedingte Schwankungen und die separat voneinander stattgefundene Stimulation der Zellen zurückzuführen sein. Zudem ist die im Vergleich zum Wildtyp stärkere Genexpression der synthetischen Rezeptoren (vgl. Abb. 20, 21, 22B) am ehesten zurückzuführen auf die Menge an synthetischen Liganden. Diese scheint im Vergleich zu der Menge an IFNa4 überproportional. Dementsprechend wirkt auch das Signal unter Stimulation mit GFP-mCherry stärker als mit IFNa4 (Abb. 18B). Beide Analysen bestärken sich gegenseitig in der Vermutung, dass die Kinetik der Genexpression und die damit korrelierende Stärke der Signaltransduktion von synthetischen IFN-Rezeptoren der von wt-IFNARs entspricht. Es ist also annehmbar, dass die biologische Zellantwort ebenfalls vergleichbar ist.

### 4.2 Unkonventionelle Rezeptorkombinationen

#### 4.2.1 Bisherige Ansätze zur Generierung neuer Rezeptorkombinationen

Eine wichtige Errungenschaft der synthetischen Zytokinbiologie ist die Möglichkeit der Kontrolle über die exakte Rezeptorzusammensetzung. Diese Entwicklung stellt ein wichtiges Werkzeug der spezifischen Untersuchung bestimmter Rezeptorkomplexe dar. Interessant ist allerdings auch die Formation neuartiger, nicht physiologischer Rezeptorkomplexe, die zum einen ein tieferes Verständnis und neue Erkenntnisse über die einzelnen Rezeptoruntereinheiten liefern dürfte und zum anderen durch die Erschaffung unbekannter Signalwege therapeutische Optionen liefert, die sich sonst der Forschung entziehen würden.

Einen wichtigen Ansatz auf diesem Gebiet stellen Synthekine dar. Indem physiologische Zytokine einer Ihrer beiden Bindungsstellen für Rezeptoren beraubt werden, entstehen sogenannte dominant negative (DN) Zytokinvarianten. Durch Fusion zweier solcher Mutanten entstehen neuartige Liganden, sogenannte Synthekine, die eine Hetero- oder Homodimerisierung zweier beliebiger Rezeptoren ermöglichen (vgl. Abb. 3C). Die Arbeitsgruppe von Moraga et al. [109] erschuf unter anderem ein Synthekin aus IFN $\omega_{DN}$ und IL-4<sub>DN</sub>, sodass ein nicht natürlicher Rezeptorkomplex aus IFNAR2 und IL-4Ra entstand. So konnte in vitro eine von den korrespondierenden natürlichen Zytokinen abweichende Signaltransduktion im Rahmen unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren oder gar anderer aktivierter Signalwege nachgewiesen werden. Silva et al. [164] erschufen mittels Computer-basierter Technologie synthetische Proteine, die zwar die Bindungsstellen physiologischer Zytokine imitierten, jedoch eine abweichende Topologie und AS-Abfolge aufwiesen. Das entstandene Neoleukin 2/15 hatte eine erhöhte Affinität für den IL-2Rß und common y chain, jedoch keine Bindungsstelle für den IL-2Ra und den IL-15Ra. Das Neoleukin erwies sich im Vergleich zu natürlichem IL-2 als von großem therapeutischem Potential. In einem Maus-Modell des Multiplen Melanoms und von Darmkrebs zeigte sich eine signifikant niedrigere Toxizität und Immunogenität bei verstärkter Expansion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen [164]. Durch Fusion zweier funktioneller Agenzien, sogenannter Fusokine, lassen sich ebenfalls neuartige Signalwege erforschen

[165]. Penafuerte *et al.* [166] fusionierten die cDNA für *granulocyte macrophage colonystimulating factor* (GM-CSF) und IL-2, sodass diese für eine einzelne Polypeptidkette codierte. Das so entstandene Fusionsprotein konnte die Rezeptoren für GM-CSF und IL-2 rekrutieren und aktivieren. Dabei wurden aber neue Eigenschaften beobachtet, die unter Mono- oder Kombinationstherapie der beiden Zytokine nicht auftraten. So kam es zu einer Erhöhung der Sekretion von *chemokine (C-C motif) ligand 5* und IFNγ, sowie zu einer Förderung der Reifung von NK-Zellen [166].

#### 4.2.2 IFNAR2-Homodimere sind biologisch aktiv

Entsprechend den Ansätzen, die eine Modifikation von Liganden betrafen, konnten Engelowski *et al.* [130] zeigen, dass es möglich ist SyCyRs mit Hilfe speziell konstruierter synthetischer Liganden zur Formation von neuen Rezeptorkombinationen anzuregen. Dazu wurden SyCyRs, bestehend aus der ICD und TMD des IL-23R und einem G<sub>VHH</sub> als ECD, mittels 3xGFP und (2x)GPF-mCherry zur Formation von IL-23-Homodimeren angeregt. Eingehende Analyse der resultierenden Signaltransduktion ergab, dass der neuartige homodimere Rezeptorkomplex eine reduzierte IL-23-ähnliche Wirkung entfaltete, während der IL-12R $\beta$ 1 keine zur Signaltransduktion befähigten Homodimere bilden konnte [130].

Entsprechend dieser Erkenntnisse sollte das für diese Arbeit konstruierte SyCyR-System auf die Bildung von unphysiologischen Rezeptorkombinationen hin untersucht werden. Dazu wurden Ba/F3-gp130-SyCyR-2A-mIFNAR-Zellen mit 2xGFP- als auch 2xmCherry-Fusionsproteinen aus konditionierten CHO-K1-Zellüberständen stimuliert. Es ließ sich jedoch keine Aktivierung einer Signaltransduktion nachweisen. Dieses Ergebnis entsprach den in dieser Arbeit ebenfalls mit jenen Zellkulturüberständen stimulierten kinasedefizienten Zellen. Diese ließen nur eine Aktivierung der Signaltransduktion zu, wenn sowohl TYK2 als auch JAK1 exprimiert wurden (vgl. Abb 17). Allerdings ist in der Literatur eine durch Homodimerisierung von IFNAR2 initiierte Zellantwort beschrieben. Die Arbeitsgruppe Pattyn *et al.* ersetzte die ECD von IFNAR2 durch die ECD des EPOR. So konnte durch Stimulation mit EPO eine Homodimerisierung eingeleitet und die Transkription von ISGs beobachtet werden, wenn auch in abgeschwächter Form im Vergleich zum heterodimeren Rezeptorkomplex [142].

In einem späteren Ansatz der Arbeitsgruppe Scheller [141] wurden die GFP-mCherry-Fusionsproteine, welche ebenfalls von CHO-K1-Zellen exprimiert wurden, gereinigt [131]. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass nach Stimulation von SyCyRs exprimierenden HEK293-Zellen mit 2xmCherry-Fc, die Aktivierung von STAT1 und STAT2 zu beobachten war. Unter Stimulation dieser Zellen mit GC-Fc zeigte sich das gleiche Aktivierungsmuster. Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe in Ba/F3-gp130-SyCyR-2AmIFNAR-Zellen unter Stimulation mit mCherry-Fc als auch GC-Fc die Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT5 beschreiben. Diese Ergebnisse fügen sich nahtlos in das in dieser Arbeit beschriebene Aktivierungsmuster der heterodimeren SyCyRs ein und zeigen damit, dass synthetische IFNAR2 Homodimere eine dem heterodimeren Rezeptorkomplex ähnelnde Aktivierung von Signalproteinen aufweisen. Der Grund, weshalb ein solches Phänomen nicht beobachtet werden konnte, könnte die zu niedrige Konzentration des mCherry Fusionsproteins aus den konditionierten Zellkulturüberständen sein, wie nach Abschluss dieser Arbeit festgestellt wurde. Zoellner *et al.* [141] konnten, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen in dieser Arbeit, in ihren Versuchen keine Signaltransduktion von IFNAR1-Homodimeren beobachten.

Krishnan *et al.* [167] beobachteten jedoch die Phosphorylierung von TYK2 in IFNAR1-Homodimeren. Die ECD des CD4 wurde an die ICD des IFNAR1 fusioniert, während die TMD Anteile beider enthielt. Die Dimerisierung der Rezeptoren wurde antikörpervermittelt eingeleitet. Trotz Phosphorylierung von TYK2 und der ICD konnte keine STAT-Aktivierung festgestellt werden. Dies weist deckend zu den hier aufgeführten Ergebnissen darauf hin, dass ohne IFNAR2 keine IFN-abhängige Signaltransduktion stattfindet.

Ziel weiterer Forschung sollte es sein, die exakte Signaltransduktion der INFAR2-Homodimere zu analysieren und Unterschiede zu den heterodimeren Komplexen zu definieren. Eine mögliche Vorgehensweise wäre die Durchführung eines weiteren *microarrays*. Ein tieferes Verständnis der spezifischen Funktion der einzelnen Untereinheiten des IFNAR sollte auch durch Kombination mit anderen Rezeptoren der Interferonfamilie zu gewinnen sein. Dies ist unter anderem Gegenstand der weiteren Forschung der AG Scheller.

## 4.3 Neue therapeutische Ansätze

#### 4.3.1 Optimierung der CAR-T-Zelltherapie

#### 4.3.1.1 Kritische Nebenwirkungen limitieren Nutzen und Effektivität

Die CAR-T-Zelltherapie erfährt als erste Methode der synthetischen Zytokinbiologie leitliniengerechte klinische Anwendung und stellt damit einen Durchbruch auf diesem Gebiet dar [108]. Trotz bisheriger Erfolge im Bereich therapierefraktärer beziehungsweise rezidivierter B-ALL und DLBCL ist die Therapie noch oft von schweren Nebenwirkungen begleitet [120, 121]. Besonders hervorzuheben ist das *cytokine release syndrome* (CRS), wobei es zu einer unkontrollierten Freisetzung von Zytokinen und damit einer lebensgefährlichen inflammatorischen systemischen Reaktion des Körpers mit einhergehender Organdysfunktion kommt. Zusätzlich sind auch ernstzunehmende neurotoxische Effekte von Bedeutung [125, 168].

Angesichts dieser schwerwiegenden Nebenwirkungen, deren Pathomechanismen sich noch nicht vollständig erschließen, suchten Forschungsgruppen bereits nach Möglichkeiten die CAR-T-Zellen bei Eintreten solch unerwünschter Effekte inhibieren zu können [169]. So wurde versucht, mittels eines in die CAR-T-Zellen eingebrachten modifizierten truncated epidermal growth factor receptor (tEGFR), die Aktivität besagter Zellen notfalls zu hemmen. Durch Applikation des monoklonalen AK Cetuximab, der gegen den EGFR gerichtet ist, konnte dies erreicht werden [170]. Ein anderer Ansatz war die Applikation des Tyrosinkinase-Inhibitors Dasatinib. Dieser supprimiert die Aktivität von T-Zellen hauptsächlich über eine reversible Hemmung der lymphocyte kinase (Lck). So konnte eine akute und transiente Ausschaltung der CAR-T-Zell-vermittelten Toxizität erreicht werden [171, 172]. Anhand dieser Reversibilität konnte mit Dasatinib, im Gegensatz zu der AK-vermittelten Depletion durch Erkennung von Oberflächenmarkern wie dem tEGFR, eine gewisse Steuerbarkeit der T-Zell-Aktivität erreicht werden. Dennoch stellt sowohl die Applikation von Cetuximab als auch von Dasatinib ein Risiko dar, denn diese Stoffe sind entsprechend ihrer eigentlichen Anwendung in der Therapie maligner Erkrankungen keineswegs hintergrundfrei, sondern begleitet von teils schweren Nebenwirkungen. Deren Nutzen als reiner Ausschalter ist also fragwürdig und lässt die Suche nach nebenwirkungsfreien Möglichkeiten offen.

Weitere Aspekte der synthetischen Zytokinbiologie fanden bereits in Form von synthetischen Notch-Rezeptoren (synNotch) Einzug in die CAR-T-Zelltherapie. Nach Bindung eines spezifischen Liganden wird die intrazelluläre Domäne des Rezeptors abgetrennt und wandert als Transkriptionsfaktor in den Nukleus [173]. Dabei können sowohl ECD als auch ICD beliebig modifiziert werden [150]. So wurde ein synNotch in gegen *receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1* (ROR1) gerichtete CAR-T-Zellen eingebracht, der spezifische Tumor-Oberflächenproteine erkannte. Bei Aktivierung führte dieser zur ortsspezifischen Expression des ROR1-CAR, sodass off-tumor Effekte minimiert werden konnten [174]. SynNotch ist bisher allerdings einigen Limitationen erlegen. So ist er beschränkt auf Zell-Zell-Kontakte. Zusätzlich kann es zur spontanen Freisetzung der ICD und damit Aktivierung der T-Zelle kommen. Auch dauert es einige Stunden, bis die Aktivierung über Transkription, Translation und Expression auf der Oberfläche Wirkung zeigt [175]. Die bisherigen Versuche die toxischen Nebeneffekte der CAR-T-Zellen zu kontrollieren, weisen also unter anderem erhebliche Mängel in Bezug auf Steuerbarkeit oder Hintergrundfreiheit auf. Beide Elemente wären durch synthetische Zytokin/Zytokinrezeptorsysteme kontrollierbar. So bieten diese den Einsatz eines nebenwirkungsfreien Liganden und lassen sich durch dessen Entzug schnell, reversibel oder dauerhaft schalten. Demnach könnte ein solches System in Kombination mit einem inhibitorischen Rezeptor wie PD-1 konstruiert werden. Andererseits könnte in schweren Fällen auch das akute, dauerhafte Abschalten der CAR-T-Zellen von Nöten sein. Somit sollten Apoptose-induzierende SyCyRs ebenfalls von Nutzen sein. Mossner *et al.* [148] unternahmen die Analyse synthetischer Rezeptoren der TNFSF. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass trotz des Austausches der ECD des Fas-R gegen jeweils G<sub>VHH</sub> oder C<sub>VHH</sub>, dieser weiterhin Apoptose-induzierend wirkt.

Durch den Einsatz von SyCyRs sollten also Nebenwirkungen wie das CRS oder Neurotoxizität der Kontrolle des Behandlers unterliegen. Dies sollte nicht nur zu einer breiteren Indikationsstellung führen, sondern auch die Verfügbarkeit und Kosten senken, da die Therapie aufgrund der möglichen Komplikationen bisher nur von spezialisierten Zentren angeboten werden kann. Auch das *outcome* der Therapie würde sich ohne die Toxizitäts-bedingte Mortalität verbessern. Die gezielte Inhibition könnte sich Abseits von akuten toxischen Einflüssen auch bei längerfristiger Behandlung als nützlich erweisen. So könnte eine durch chronisch persistierende Aktivierung von Immunzellen resultierende Erschöpfung des Immunsystems verhindert werden, die für fehlendes Ansprechen der CAR-T-Zelltherapie vor allem in soliden Tumoren verantwortlich gemacht werden kann [176].

#### 4.3.1.2 Steigerung der Responsivität gegenüber der CAR-T-Zelltherapie

Neben der Elimination toxischer Nebenwirkungen der CAR-T-Zelltherapie gilt es besonders die immunsuppressive Tumormikroumgebung zu überwinden, welche die Effektivität der Therapie vor allem in soliden Tumoren deutlich einschränkt [176].

Bisher wurden fünf Generationen an CAR-T-Zellen entworfen (vgl. Abb. 27) [177]. Die erste Generation besaß lediglich den CAR mit einer intrazellulären Domäne bestehend aus CD3. In der weiteren Entwicklung zur zweiten Generation wurde etabliert, zusätzlich zu dem CAR auch die Expression der kostimulatorischen Domänen wie CD28 oder 4-1BB einzurichten [178, 179]. Die dritte Generation weist nicht nur eine sondern zwei dieser Domänen auf [177]. Jedoch müssen spezifische immunmodulatorische Ansätze verfolgt und weitere stimulatorische Mechanismen eingebracht werden, um dysfunktionale Immunprozesse zu umgehen. So zeichnet sich die vierte Generation durch genetische Modifikation aus, welche es erlaubt Zytokine freizusetzen oder weitere kostimulatorische Liganden zu exprimieren. Avanzi *et al.* [127] konstruierten CAR-T-Zellen, die konstitutiv das immunstimulatorische Zytokin IL-18 sekretieren, sodass die zytotoxische Aktivität von NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen erhöht wurde. Andererseits wurde auch die Expression weiterer kostimulatorischer Proteine wie CD40L analysiert [128]. Ein weiterer interessanter Ansatz wurde von Rafiq *et al.* [180] verfolgt. CAR-T-Zellen, die den Checkpoint-Inhibitor PD-L1 sezernierten, erreichten eine Minimierung der Toxizität, die eine systemische Gabe erzeugt hätte, indem sie diesen spezifisch in der Tumormikroumgebung freisetzten. Die fünfte Generation weist Fragmente der ICD von Zytokinrezeptoren mit Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren auf. So zeigte ein CAR-Konstrukt mit gekürzter ICD des IL-2 Rezeptor- $\beta$  eine Antigen-abhängige Aktivierung von JAK sowie STAT3 und -5. Es konnte eine Verbesserung hinsichtlich Proliferation, Persistenz und anti-Tumoreffekten festgestellt werden [181, 182].



#### Abb. 27: Generationen der Konstruktion von CARs.

Die erste Generation der *chimeric antigen receptors* (CARs) besaß lediglich CD3 als intrazelluläre Domäne. Weiterhin wurden kostimulatiorische Domänen wie beispielsweise CD28 oder 4-1BB (zweite Generation) und später beide (dritte Generation) miteingeschlossen. Die vierte Generation wurde genetisch dahingehend modifiziert, dass die CAR-T-Zellen Zytokine oder andere kostimulatorische Liganden freisetzen konnten. Die neueste, fünfte Generation ist in der Lage eine antigenabhängige zytokintypische-Signaltransduktion auszulösen, indem beispielsweise ein gekürzter IL-2 Rezeptor- $\beta$  mit eingebaut wurde und es so zur Aktivierung des JAK-STAT-Weges kam. Abbildung in Anlehnung an Mehrabadi *et al.* [177]. Erstellt mit Biorender.com. Auch im Rahmen der synthetischen Zytokinbiologie wurden schon verschiedene Methoden analysiert. Shum *et al.* [113] konnten zeigen, dass die Expression eines konstitutiv aktiven IL-7R in CAR-T-Zellen die Proliferations- und Überlebensrate der Zellen als auch deren anti-Tumoraktivität positiv beeinflusste.

All diese beschriebenen Ansätze mit konstitutiv sezernierten oder exprimierten immunstimulatorischen Proteinen sind effektiv im Hinblick auf eine Steigerung der generellen Aktivität des Immunsystems und scheinen ihre Wirkung sogar relativ auf die Tumorumgebung zu beschränken. Allerdings sind sie nicht einfach justierbar. Angesichts des variablen Verlaufs unterschiedlicher Tumorentitäten als auch des individuellen Charakters auf Patientenebene, sind anpassbarere Mechanismen von Vorteil. So müsste die Stärke der anti-Tumorantwort der CAR-T-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Therapie neu eingestellt werden und nicht ständig auf einem hohen Level verbleiben. Andererseits sind Tumore durch unbeständige Oberflächenexpression und Mechanismen der Immunevasion geprägt [183]. Sich also alleinig auf einen Mechanismus wie beispielsweise den PD-L1 zu verlassen, dürfte wenig effektiv sein.

Stimulatorische SyCyR-Konstrukte böten hingegen die Möglichkeit die Aktivität der CAR-T-Zellen optimal an den Bedarf anzupassen. So könnten Liganden je nach Bedarf extern zugeführt werden und gegebenenfalls mit Fusionsproteinen aus den entsprechenden monoklonalen Antikörpern (G<sub>VHH</sub>-C<sub>VHH</sub>), wie es Engelowski *et al.* [130] zeigen konnten, wieder wirkungslos gemacht werden. In Kombination mit erwähnten inhibitorischen SyCyRs, könnte die Aktivität noch feiner reguliert werden.

#### 4.3.2 Limitierungen von SyCyRs

Neben den beschriebenen Vorteilen der SyCyRs gegenüber anderen Ansätzen der synthetischen Zytokinbiologie, gibt es auch hier Limitierungen, die weitere Untersuchungen beanspruchen. GFP stellt als wohl bekanntester Vertreter der fluoreszierenden Proteine einen in der Wissenschaft vielseitig genutzten Biosensor dar. Neueste Entwicklungen, wie exemplarisch der Einsatz in dieser Arbeit, eröffnen weitere Nutzungsmöglichkeiten [102]. Obwohl GFP weitestgehend als nicht toxisch gegenüber Säugetierzellen betrachtet wird, werden in der Literatur auch gegensätzliche Beobachtungen beschrieben [151, 184, 185]. So wurden zytotoxische Effekte beobachtet, die unter anderem auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und oxidativem Stress als auch auf Apoptoseinduzierende Eigenschaften zurückzuführen sind [186, 187]. Daneben spielen auch immunogene Faktoren des GFP, wie beispielsweise die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, eine Rolle [188, 189]. Diese Beobachtungen könnten *in vitro* zu der Verfälschung von Ergebnissen und bei der medizinischen Applikation zu unvorhergesehenen toxischen Nebenwirkungen führen. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten keine zytotoxischen Effekte beobachtet werden, doch gilt es solche unbedingt auszuschließen. Damit sei die Applikation fluoreszierender Proteine *in vivo* Ziel zukünftiger Untersuchungen.

Eine Möglichkeit das System der SyCyRs in dieser Hinsicht zu optimieren bestünde in der Erzeugung von Neoleukinen, Computer-generierten Proteinen. Diese weisen zwar Bindungsstellen physiologischer Liganden auf, doch unterscheiden sich im Übrigen sowohl in Topologie als auch AS-Abfolge [164]. Damit stellen diese hintergrundfreien Proteine alternative Liganden dar. Diese natürliche Bindungsstelle könnte ebenfalls abgeändert werden, sodass nur ein entsprechender *nanobody* daran bindet, der als ECD fungiert (vgl. Abb. 28).

Des Weiteren bestünde die Möglichkeit einer Adaptation an den Ansatz einer Modifikation der Liganden- und Rezeptor-Bindungsstellen. Anstatt des Austausches der ECD gegen einen *nanobody*, könnte die natürliche ECD, ebenso wie der Ligand, mutiert werden. Zu nennen ist hier die bereits erwähnte Erzeugung von orthogonalem IL-2 und einem orthogonalen IL-2R. Ohne die Einbindung weiterer zellulärer Mechanismen eröffnet dieser Ansatz einen großen therapeutischen Nutzen, da die systemische Applikation von IL-2 aufgrund der Pleiotropie und schweren Nebenwirkungen kaum zielgerichtet, geschweige denn im therapeutischen Rahmen möglich ist [190]. Man könnte auch, entsprechend dem Vorgehen in der beschriebenen Arbeit, den mutierten Liganden nutzen und das SyCyR-System mit *nanobody* beibehalten [190]. Nur dieser könnte dann das mutierte Zytokin erkennen (vgl. Abb. 28).

Zukünftige Forschung im Rahmen der synthetischen Zytokinbiologie sollte sich mit nicht-immunogenen Liganden beschäftigen, sodass synthetische Zytokin/Zytokinrezeptorsysteme in ihrer Hintergrundfreiheit optimiert werden können und sich möglichst sicher in einer Anwendung *in vivo* darstellen.



Abb. 28: Alternative Liganden für ein synthetisches Zytokin/Zytokinrezeptorsystem. Links im Bild stellt sich ein SyCyR-Dimer mit der in orange abgebildeten extrazellulären Domäne (ECD), einem *nanobody*, dar. Transmembranäre und intrazelluläre Domäne des jeweiligen Zytokinrezeptors, welcher für den SyCyR ausgewählt werden soll, sind in gelb dargestellt. Rechts abgebildet ist ein SyCyR, welcher eine mutierte ECD aufweist (orange). Transmembranäre und intrazelluläre Domäne sind auch hier gelb dargestellt. Computer-generierte Neoleukine sowie mutierte Zytokinvarianten können SyCyRs mit dem entsprechenden *nanobody* erkennen und die Dimerisierung einleiten. Ebenso führen mutierte Zytokinvarianten zur Dimerisierung und Signaltransduktion von SyCyRs mit mutierter ECD. Die Doppellipidschicht der Zelle ist in blau gestaltet. Erstellt mit Biorender.com.

Obwohl Engelowski *et al.* [130] herausstellen konnten, dass sich SyCyRs und wt-Rezeptoren der IL-6/IL-12-Familie in ihrer Zellantwort bis auf geringe Unterschiede gleichen, scheint dies, was andere modifizierte Rezeptoren betrifft, nicht immer der Fall zu sein. So gibt es Daten, die dafürsprechen, dass *downstream* Signale nicht unerheblich durch Prozesse wie extrazelluläre Ligandenbindung oder veränderte Topologie der Rezeptorrekrutierung verändert werden. Dementsprechend resultierten geringe, kaum die Affinität betreffende Veränderungen des Zytokins EPO, durch eine veränderte Bindungskinetik an die extrazelluläre Domäne des EPOR, in einer erheblichen Abschwächung der Signalstärke [191]. Ebenfalls führte eine abgewandelte Geometrie der Dimerisierung von Zytokinrezeptoren, am Beispiel des EPOR, zu einer erheblichen Veränderung der Signalstärke als auch der Signalwege und Genexpression [192]. Auch konstitutiv aktive gp130-Rezeptoren untermauern diese Ergebnisse, indem sie ebenfalls eine veränderte Komposition an Signalwegen aktivieren [193]. Somit obliegt es einer separaten eingehenden Analyse eines jeden Zytokin/Zytokinrezeptorsystems, auszuschließen, dass solch veränderte Signalkaskaden zu unvorhergesehenen Effekten führen.

## 4.4 Schlussfolgerungen

Das in dieser Arbeit untersuchte synthetische System aus Zytokin und dessen Rezeptoruntereinheiten stellt einen weiteren Schritt in der fortschreitenden Erschließung des Feldes der synthetischen Zytokinbiologie dar. Es konnte erfolgreich belegt werden, dass sich das synthetische Konstrukt und der natürliche Signalweg der Typ I Interferone weitestgehend kongruent verhalten. Dabei bietet das untersuchte synthetische System im Hinblick auf bisherige Methoden einige vielversprechende Vorteile. Bedingt durch die entsprechende Fusion der Proteine GFP und m-Cherry, kann eine beliebige Komposition der natürlicherweise heterodimeren Rezeptorkomplexe erreicht werden. Die synthetischen Liganden sind hintergrundfrei, was sowohl für die Forschung als auch die praktische Anwendung einen großen Nutzen darstellt. Zusätzlich ist das künstliche System anhand gegen die Liganden gerichteter nanobodies frei schaltbar. Das Konzept der SyCyRs beinhaltet somit enormes Potential im Hinblick auf analytische Aspekte, die neue Erkenntnisse im Bereich der Zytokinbiologie erhoffen lassen. Damit einhergehend eröffnen sich neue Perspektiven in der Therapie von Erkrankungen, die bislang mit einer infausten Prognose vergesellschaftet waren. Wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, ist die hier zugrunde liegende Vorgehensweise, extrazelluläre Domänen gegen nanobodies auszutauschen, auf weitere Zytokine ausweitbar [130, 148]. Somit sollte es das Ziel weitergehender Forschung sein, andere Zytokinfamilien anhand des SyCyR-Systems näher zu untersuchen und somit mehr Erkenntnisse über dessen Universalität zu gewinnen.

# 5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der IFN-Rezeptorkomplexe und Signalwege3
Abb. 2: Schematische Darstellung von humanem IgG und heavy-chain only antibodies.
Abb. 3: Forschungsansätze der synthetischen Zytokinbiologie
Abb. 4: Der synthetische gp130-Rezeptor
Abb. 5: Schematische Darstellung der site directed mutagenesis
Abb. 6: Schematische Darstellung der SOE-PCR
Abb. 7: Schematische Darstellung der heterodimeren Rezeptorkomplexe der
natürlichen IFNARs (A) und SyCyRs (B)46
Abb. 8: Schematische Darstellung des 2A-Konstruktes von SyCyR-2A-mIFNAR (A) und
2A-mIFNAR (B)
Abb. 9: Schematische Darstellung der synthetischen Liganden
Abb. 10: Klonierungsschema für pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR und pcDNA3.1-2A-
mIFNAR51
Abb. 11: Expression des natürlichen IFNARs und des SyCyRs in HEK293T-Zellen52
Abb. 12: Klonierung von pMOWS-Vektoren mit wt-IFNAR und SyCyR54
Abb. 13: Schematische Darstellung der generierten Ba/F3-gp130-Zelllinien55
Abb. 14: Analyse der Oberflächenexpression von wt-IFNAR (A) und SyCyR (B) auf
Ba/F3-gp130-Zelllinien mittels Durchflusszytometrie56
Abb. 15: Aktivierung des JAK-STAT-Weges in transient transfizierten HEK293-Zellen.
Abb. 16: Testexpression und Stimulation in kinasedefizienten Zellinien U1A (A), U4C (B)
und γ2A (C), die den wt-IFNAR exprimierten59
Abb. 17: Testexpression und Stimulation in kinasedefizienten Zellinien U1A (A), U4C (B)
und γ2A (C), die den SyCyR exprimierten60
Abb. 18: Analyse der intrazellulären Signalwege von SyCyR und wt-IFNAR in Ba/F3-
gp130 Zellen62
Abb. 19: Proliferation der Ba/F3-gp130-Zelllinien nach Stimulation mit natürlichen und
synthetischen Liganden64
Abb. 20: Analyse der Kinetik der Genexpression von MX1 in Ba/F3-gp130-Zellen mittels
<i>real-time</i> qPCR65
Abb. 21: Relative Genexpression von OASL1 in Ba/F3-gp130-Zellen mittels real-time
qPCR

Abb. 22: Vergleichbare Genexpression von wt-IFNAR und SyCyR in	Ba/F3-gp130-
Zellen	68
Abb. 23: Übersicht der Mutations- und Deletionsvarianten des SyCyR	70
Abb. 24: Klonierungsschema der Mutationsvarianten des SyCyR	72
Abb. 25: Klonierungsschema von ΔIFNAR1	74
Abb. 26: Testexpression der SyCyRs mit ΔIFNAR1 in transient transfizie	erten HEK293-
Zellen	75
Abb. 27: Generationen der Konstruktion von CARs.	85
Abb. 28: Alternative Liganden für ein synthetisches Zytokin/Zytokinrezep	torsystem88

# 6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien	19
Tabelle 2: Zusammensetzung der erstellten Lösungen und Puffer	20
Tabelle 3: Kulturmedien	22
Tabelle 4: Liste der verwendeten Kits	22
Tabelle 5: Auflistung der genutzten Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 6: Geräteliste	23
Tabelle 7: Übersicht der Antibiotika und Konzentrationen	25
Tabelle 8: Verwendete Zytokine und Proteine für die Zellstimulation	25
Tabelle 9: Zur Anwendung gekommene Antikörper und Verdünnungsgrad	26
Tabelle 10: Plasmide	27
Tabelle 11: Oligonukleotide	27
Tabelle 12: eukaryotische Zelllinien	29
Tabelle 13: Ansatz für colony-PCR	34
Tabelle 14: Colony-PCR-Programm	34
Tabelle 15: Ansätze für die SDM	34
Tabelle 16: PCR-Programm für die SDM	35
Tabelle 17: Ansatz für PCR 1/2 und SOE PCR	37
Tabelle 18: Programm PCR 1/2 und SOE PCR	37
Tabelle 19: Ansatz für die real-time qPCR	38
Tabelle 20: PCR-Programm für die real-time qPCR	38
Tabelle 21: Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel	44
Tabelle 22: Regulierte mRNAs nach Stimulation mit IFNa4 oder GFP-mCherry-F	⁼c (GC-
Fc) in Ba/F3-gp130-Zellen, welche den SyCyR ausprägen. Diese Daten	wurden
publiziert [141]	69
Tabelle 23: Mutationen und Deletionen von mIFNAR1 und -2	71

# 7 Literatur - und Quellenverzeichnis

- 1. Clark, I.A. and B. Vissel, *The meteorology of cytokine storms, and the clinical usefulness of this knowledge.* Semin Immunopathol, 2017. **39**(5): p. 505-516.
- Floss, D.M. and J. Scheller, *Naturally occurring and synthetic constitutive-active cytokine receptors in disease and therapy.* Cytokine Growth Factor Rev, 2019.
   47: p. 1-20.
- 3. Ramani, T., C.S. Auletta, D. Weinstock, B. Mounho-Zamora, P.C. Ryan, T.W. Salcedo and G. Bannish, *Cytokines: The Good, the Bad, and the Deadly.* Int J Toxicol, 2015. **34**(4): p. 355-65.
- 4. O'Shea, J.J., M. Gadina and R.M. Siegel, 9 Cytokines and Cytokine Receptors, in *Clinical Immunology (Fifth Edition)*, R.R. Rich, et al., Editors. 2019, Elsevier: London. p. 127-155.e1.
- 5. Renauld, J.C., *Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(8): p. 667-76.
- 6. Negishi, H., T. Taniguchi and H. Yanai, *The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(11).
- 7. Platanias, L.C., *Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(5): p. 375-86.
- 8. Lazear, H.M., T.J. Nice and M.S. Diamond, *Interferon-lambda: Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond.* Immunity, 2015. **43**(1): p. 15-28.
- 9. van Pesch, V., H. Lanaya, J.C. Renauld and T. Michiels, *Characterization of the murine alpha interferon gene family.* J Virol, 2004. **78**(15): p. 8219-28.
- 10. Jaitin, D.A., L.C. Roisman, E. Jaks, M. Gavutis, J. Piehler, J. Van der Heyden, G. Uze and G. Schreiber, *Inquiring into the differential action of interferons (IFNs): an IFN-alpha2 mutant with enhanced affinity to IFNAR1 is functionally similar to IFN-beta.* Mol Cell Biol, 2006. **26**(5): p. 1888-97.
- 11. Cohen, B., D. Novick, S. Barak and M. Rubinstein, *Ligand-induced association of the type I interferon receptor components.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(8): p. 4208-14.
- 12. Taniguchi, T. and A. Takaoka, *A weak signal for strong responses: interferonalpha/beta revisited.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(5): p. 378-86.
- 13. Ivashkiv, L.B. and L.T. Donlin, *Regulation of type I interferon responses.* Nat Rev Immunol, 2014. **14**(1): p. 36-49.
- 14. Stark, G.R. and J.E. Darnell, Jr., *The JAK-STAT pathway at twenty.* Immunity, 2012. **36**(4): p. 503-14.
- 15. Decker, T., M. Muller and S. Stockinger, *The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection.* Nat Rev Immunol, 2005. **5**(9): p. 675-87.
- 16. Takaoka, A., Y. Mitani, H. Suemori, M. Sato, T. Yokochi, S. Noguchi, N. Tanaka and T. Taniguchi, *Cross talk between interferon-gamma and -alpha/beta signaling components in caveolar membrane domains.* Science, 2000. **288**(5475): p. 2357-60.
- 17. Pestka, S., C.D. Krause and M.R. Walter, *Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors.* Immunol Rev, 2004. **202**: p. 8-32.
- 18. Uze, G. and D. Monneron, *IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family.* Biochimie, 2007. **89**(6-7): p. 729-34.
- 19. Schreiber, G., *The molecular basis for differential type I interferon signaling.* J Biol Chem, 2017. **292**(18): p. 7285-7294.
- 20. Wang, W.B., D.E. Levy and C.K. Lee, *STAT3 negatively regulates type I IFNmediated antiviral response.* J Immunol, 2011. **187**(5): p. 2578-85.

- Nguyen, K.B., W.T. Watford, R. Salomon, S.R. Hofmann, G.C. Pien, A. Morinobu, M. Gadina, J.J. O'Shea and C.A. Biron, *Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection.* Science, 2002.
   **297**(5589): p. 2063-6.
- 22. Arthur, J.S. and S.C. Ley, *Mitogen-activated protein kinases in innate immunity.* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(9): p. 679-92.
- Uddin, S., F. Lekmine, N. Sharma, B. Majchrzak, I. Mayer, P.R. Young, G.M. Bokoch, E.N. Fish and L.C. Platanias, *The Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is required for interferon alpha-dependent transcriptional activation but not serine phosphorylation of Stat proteins.* J Biol Chem, 2000. 275(36): p. 27634-40.
- 24. Li, Y., A. Sassano, B. Majchrzak, D.K. Deb, D.E. Levy, M. Gaestel, A.R. Nebreda, E.N. Fish and L.C. Platanias, *Role of p38alpha Map kinase in Type I interferon signaling.* J Biol Chem, 2004. **279**(2): p. 970-9.
- Hjortsberg, L., C. Lindvall, M. Corcoran, V. Arulampalam, D. Chan, L. Thyrell, M. Nordenskjold, D. Grander and K. Pokrovskaja, *Phosphoinositide 3-kinase regulates a subset of interferon-alpha-stimulated genes.* Exp Cell Res, 2007. 313(2): p. 404-14.
- 26. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon.* Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957. **147**(927): p. 258-67.
- 27. van Boxel-Dezaire, A.H., M.R. Rani and G.R. Stark, *Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons.* Immunity, 2006. **25**(3): p. 361-72.
- 28. Hu, X., K.H. Park-Min, H.H. Ho and L.B. Ivashkiv, *IFN-gamma-primed* macrophages exhibit increased CCR2-dependent migration and altered *IFN-gamma responses mediated by Stat1.* J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3637-47.
- 29. Ho, H.H. and L.B. Ivashkiv, *Role of STAT3 in type I interferon responses. Negative regulation of STAT1-dependent inflammatory gene activation.* J Biol Chem, 2006. **281**(20): p. 14111-8.
- Ng, S.L., B.A. Friedman, S. Schmid, J. Gertz, R.M. Myers, B.R. Tenoever and T. Maniatis, *IKB kinase epsilon (IKK(epsilon)) regulates the balance between type I and type II interferon responses.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(52): p. 21170-5.
- 31. Fuchs, S.Y., *Hope and fear for interferon: the receptor-centric outlook on the future of interferon therapy.* J Interferon Cytokine Res, 2013. **33**(4): p. 211-25.
- 32. Yoshimura, A., T. Naka and M. Kubo, SOCS proteins, cytokine signalling and *immune regulation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 454-65.
- 33. Liau, N.P.D., A. Laktyushin, I.S. Lucet, J.M. Murphy, S. Yao, E. Whitlock, K. Callaghan, N.A. Nicola, N.J. Kershaw and J.J. Babon, *The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1.* Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1558.
- Wang, G., W. Liu, C. Wang, J. Wang, H. Liu, D. Hao and M. Zhang, Molecular characterization and immunoregulatory analysis of suppressors of cytokine signaling 1 (SOCS1) in black rockfish, Sebastes schlegeli. Dev Comp Immunol, 2022. 130: p. 104355.
- 35. Sarasin-Filipowicz, M., X. Wang, M. Yan, F.H. Duong, V. Poli, D.J. Hilton, D.E. Zhang and M.H. Heim, *Alpha interferon induces long-lasting refractoriness of JAK-STAT signaling in the mouse liver through induction of USP18/UBP43.* Mol Cell Biol, 2009. **29**(17): p. 4841-51.
- 36. Walsh, D., M.B. Mathews and I. Mohr, *Tinkering with translation: protein synthesis in virus-infected cells.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(1): p. a012351.

- 37. Lee, M.S., B. Kim, G.T. Oh and Y.J. Kim, *OASL1 inhibits translation of the type I interferon-regulating transcription factor IRF7.* Nat Immunol, 2013. **14**(4): p. 346-55.
- 38. Levin, D., W.M. Schneider, H.H. Hoffmann, G. Yarden, A.G. Busetto, O. Manor, N. Sharma, C.M. Rice and G. Schreiber, *Multifaceted activities of type l interferon are revealed by a receptor antagonist.* Sci Signal, 2014. **7**(327): p. ra50.
- 39. Hervas-Stubbs, S., J.L. Perez-Gracia, A. Rouzaut, M.F. Sanmamed, A. Le Bon and I. Melero, *Direct effects of type I interferons on cells of the immune system*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(9): p. 2619-27.
- 40. Santini, S.M., C. Lapenta, M. Logozzi, S. Parlato, M. Spada, T. Di Pucchio and F. Belardelli, *Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice.* J Exp Med, 2000. **191**(10): p. 1777-88.
- 41. Ito, T., R. Amakawa, M. Inaba, S. Ikehara, K. Inaba and S. Fukuhara, *Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs.* J Immunol, 2001. **166**(5): p. 2961-9.
- 42. Montoya, M., G. Schiavoni, F. Mattei, I. Gresser, F. Belardelli, P. Borrow and D.F. Tough, *Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation.* Blood, 2002. **99**(9): p. 3263-71.
- 43. Parlato, S., S.M. Santini, C. Lapenta, T. Di Pucchio, M. Logozzi, M. Spada, A.M. Giammarioli, W. Malorni, S. Fais and F. Belardelli, *Expression of CCR-7, MIP-3beta, and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities.* Blood, 2001. **98**(10): p. 3022-9.
- 44. Bogdan, C., J. Mattner and U. Schleicher, *The role of type I interferons in non-viral infections.* Immunol Rev, 2004. **202**: p. 33-48.
- 45. Sampson, L.L., J. Heuser and E.J. Brown, Cytokine regulation of complement receptor-mediated ingestion by mouse peritoneal macrophages. M-CSF and IL-4 activate phagocytosis by a common mechanism requiring autostimulation by IFN-beta. J Immunol, 1991. **146**(3): p. 1005-13.
- 46. Ortaldo, J.R., W. Phillips, K. Wasserman and R.B. Herberman, *Effects of metabolic inhibitors on spontaneous and interferon-boosted human natural killer cell activity.* J Immunol, 1980. **125**(4): p. 1839-44.
- 47. Nguyen, K.B., T.P. Salazar-Mather, M.Y. Dalod, J.B. Van Deusen, X.Q. Wei, F.Y. Liew, M.A. Caligiuri, J.E. Durbin and C.A. Biron, *Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection.* J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4279-87.
- 48. Fink, K., K.S. Lang, N. Manjarrez-Orduno, T. Junt, B.M. Senn, M. Holdener, S. Akira, R.M. Zinkernagel and H. Hengartner, *Early type I interferon-mediated signals on B cells specifically enhance antiviral humoral responses.* Eur J Immunol, 2006. **36**(8): p. 2094-105.
- 49. Le Bon, A., C. Thompson, E. Kamphuis, V. Durand, C. Rossmann, U. Kalinke and D.F. Tough, *Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN.* J Immunol, 2006. **176**(4): p. 2074-8.
- 50. Brinkmann, V., T. Geiger, S. Alkan and C.H. Heusser, *Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells.* J Exp Med, 1993. **178**(5): p. 1655-63.
- 51. Marshall, H.D., A.L. Prince, L.J. Berg and R.M. Welsh, *IFN-alpha beta and self-MHC divert CD8 T cells into a distinct differentiation pathway characterized by rapid acquisition of effector functions.* J Immunol, 2010. **185**(3): p. 1419-28.
- 52. Thompson, L.J., G.A. Kolumam, S. Thomas and K. Murali-Krishna, *Innate inflammatory signals induced by various pathogens differentially dictate the IFN-I dependence of CD8 T cells for clonal expansion and memory formation.* J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1746-54.
- 53. Hall, M., S. Bates and G. Peters, *Evidence for different modes of action of cyclindependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins.* Oncogene, 1995. **11**(8): p. 1581-8.
- 54. Sangfelt, O., S. Erickson, J. Castro, T. Heiden, A. Gustafsson, S. Einhorn and D. Grander, *Molecular mechanisms underlying interferon-alpha-induced G0/G1 arrest: CKI-mediated regulation of G1 Cdk-complexes and activation of pocket proteins*. Oncogene, 1999. **18**(18): p. 2798-810.
- 55. Schroder, K., P.J. Hertzog, T. Ravasi and D.A. Hume, *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions.* J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
- 56. Bosinger, S.E. and N.S. Utay, *Type I interferon: understanding its role in HIV pathogenesis and therapy.* Curr HIV/AIDS Rep, 2015. **12**(1): p. 41-53.
- 57. Zitvogel, L., L. Galluzzi, O. Kepp, M.J. Smyth and G. Kroemer, *Type I interferons in anticancer immunity.* Nat Rev Immunol, 2015. **15**(7): p. 405-14.
- 58. Heim, M.H., 25 years of interferon-based treatment of chronic hepatitis C: an epoch coming to an end. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(7): p. 535-42.
- Guilhot, F., C. Chastang, M. Michallet, A. Guerci, J.L. Harousseau, F. Maloisel, R. Bouabdallah, D. Guyotat, N. Cheron, F. Nicolini, J.F. Abgrall and J. Tanzer, *Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group.* N Engl J Med, 1997. **337**(4): p. 223-9.
- Mandelli, F., G. Avvisati, S. Amadori, M. Boccadoro, A. Gernone, V.M. Lauta, F. Marmont, M.T. Petrucci, M. Tribalto, M.L. Vegna and et al., *Maintenance treatment with recombinant interferon alfa-2b in patients with multiple myeloma responding to conventional induction chemotherapy.* N Engl J Med, 1990. 322(20): p. 1430-4.
- 61. Osterborg, A., M. Bjorkholm, M. Bjoreman, G. Brenning, K. Carlson, F. Celsing, G. Gahrton, G. Grimfors, H. Gyllenhammar, R. Hast and et al., *Natural interferonalpha in combination with melphalan/prednisone versus melphalan/prednisone in the treatment of multiple myeloma stages II and III: a randomized study from the Myeloma Group of Central Sweden.* Blood, 1993. **81**(6): p. 1428-34.
- 62. Gogas, H., H. Abali, P.A. Ascierto, L. Demidov, H. Pehamberger, C. Robert, J. Schachter, A.M. Eggermont, A. Hauschild and E. Espinosa, *Who benefits most from adjuvant interferon treatment for melanoma?* Am J Ther, 2015. **22**(1): p. 54-60.
- Alberts, D.S., E.V. Hannigan, P.Y. Liu, C. Jiang, S. Wilczynski, L. Copeland and M. Markman, *Randomized trial of adjuvant intraperitoneal alpha-interferon in* stage III ovarian cancer patients who have no evidence of disease after primary surgery and chemotherapy: An intergroup study. Gynecol Oncol, 2006. **100**(1): p. 133-8.
- 64. Snell, L.M., T.L. McGaha and D.G. Brooks, *Type I Interferon in Chronic Virus Infection and Cancer.* Trends Immunol, 2017. **38**(8): p. 542-557.
- 65. Cunningham, C.R., A. Champhekar, M.V. Tullius, B.J. Dillon, A. Zhen, J.R. de la Fuente, J. Herskovitz, H. Elsaesser, L.M. Snell, E.B. Wilson, J.C. de la Torre, S.G. Kitchen, M.A. Horwitz, S.J. Bensinger, S.T. Smale and D.G. Brooks, *Type I and Type II Interferon Coordinately Regulate Suppressive Dendritic Cell Fate and Function during Viral Persistence*. PLOS Pathog, 2016. **12**(1): p. e1005356.

- 66. Spranger, S., R.M. Spaapen, Y. Zha, J. Williams, Y. Meng, T.T. Ha and T.F. Gajewski, *Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells.* Sci Transl Med, 2013. **5**(200): p. 200ra116.
- 67. Wilson, E.B., Y. Kidani, H. Elsaesser, J. Barnard, L. Raff, C.L. Karp, S. Bensinger and D.G. Brooks, *Emergence of distinct multiarmed immunoregulatory antigenpresenting cells during persistent viral infection.* Cell Host Microbe, 2012. **11**(5): p. 481-91.
- Teijaro, J.R., C. Ng, A.M. Lee, B.M. Sullivan, K.C. Sheehan, M. Welch, R.D. Schreiber, J.C. de la Torre and M.B. Oldstone, *Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling.* Science, 2013. **340**(6129): p. 207-11.
- 69. Wilson, E.B., D.H. Yamada, H. Elsaesser, J. Herskovitz, J. Deng, G. Cheng, B.J. Aronow, C.L. Karp and D.G. Brooks, *Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection.* Science, 2013. **340**(6129): p. 202-7.
- Benci, J.L., B. Xu, Y. Qiu, T.J. Wu, H. Dada, C. Twyman-Saint Victor, L. Cucolo, D.S.M. Lee, K.E. Pauken, A.C. Huang, T.C. Gangadhar, R.K. Amaravadi, L.M. Schuchter, M.D. Feldman, H. Ishwaran, R.H. Vonderheide, A. Maity, E.J. Wherry and A.J. Minn, *Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade*. Cell, 2016. **167**(6): p. 1540-1554 e12.
- 71. Terawaki, S., S. Chikuma, S. Shibayama, T. Hayashi, T. Yoshida, T. Okazaki and T. Honjo, *IFN-alpha directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity.* J Immunol, 2011. **186**(5): p. 2772-9.
- 72. Ronnblom, L., *The importance of the type I interferon system in autoimmunity.* Clin Exp Rheumatol, 2016. **34**(4 Suppl 98): p. 21-4.
- 73. Ronnblom, L.E., G.V. Alm and K.E. Oberg, *Autoimmunity after alpha-interferon therapy for malignant carcinoid tumors.* Ann Intern Med, 1991. **115**(3): p. 178-83.
- 74. Black, C.M., A.J. Silman, A.I. Herrick, C.P. Denton, H. Wilson, J. Newman, L. Pompon and X. Shi-Wen, *Interferon-alpha does not improve outcome at one year in patients with diffuse cutaneous scleroderma: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.* Arthritis Rheum, 1999. **42**(2): p. 299-305.
- 75. Gilliet, M., W. Cao and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(8): p. 594-606.
- Gottenberg, J.E., N. Cagnard, C. Lucchesi, F. Letourneur, S. Mistou, T. Lazure, S. Jacques, N. Ba, M. Ittah, C. Lepajolec, M. Labetoulle, M. Ardizzone, J. Sibilia, C. Fournier, G. Chiocchia and X. Mariette, *Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjogren's syndrome.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(8): p. 2770-5.
- 77. Eloranta, M.L., K. Franck-Larsson, T. Lovgren, S. Kalamajski, A. Ronnblom, K. Rubin, G.V. Alm and L. Ronnblom, *Type I interferon system activation and association with disease manifestations in systemic sclerosis.* Ann Rheum Dis, 2010. **69**(7): p. 1396-402.
- 78. Baechler, E.C., H. Bilgic and A.M. Reed, *Type I interferon pathway in adult and juvenile dermatomyositis.* Arthritis Res Ther, 2011. **13**(6): p. 249.
- Munoz, L.E., C. van Bavel, S. Franz, J. Berden, M. Herrmann and J. van der Vlag, Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Lupus, 2008.
  **17**(5): p. 371-5.

- 80. Vallin, H., S. Blomberg, G.V. Alm, B. Cederblad and L. Ronnblom, *Patients with* systemic lupus erythematosus (*SLE*) have a circulating inducer of interferonalpha (*IFN-alpha*) production acting on leucocytes resembling immature dendritic cells. Clin Exp Immunol, 1999. **115**(1): p. 196-202.
- 81. Deng, Y. and B.P. Tsao, *Advances in lupus genetics and epigenetics.* Curr Opin Rheumatol, 2014. **26**(5): p. 482-92.
- 82. Eloranta, M.L., T. Lovgren, D. Finke, L. Mathsson, J. Ronnelid, B. Kastner, G.V. Alm and L. Ronnblom, *Regulation of the interferon-alpha production induced by RNA-containing immune complexes in plasmacytoid dendritic cells.* Arthritis Rheum, 2009. **60**(8): p. 2418-27.
- 83. Khamashta, M., J.T. Merrill, V.P. Werth, R. Furie, K. Kalunian, G.G. Illei, J. Drappa, L. Wang, W. Greth and C.D.s. investigators, *Sifalimumab, an anti-interferon-alpha monoclonal antibody, in moderate to severe systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled study.* Ann Rheum Dis, 2016. **75**(11): p. 1909-1916.
- 84. Furie, R., M. Khamashta, J.T. Merrill, V.P. Werth, K. Kalunian, P. Brohawn, G.G. Illei, J. Drappa, L. Wang, S. Yoo and C.D.S. Investigators, *Anifrolumab, an Anti-Interferon-alpha Receptor Monoclonal Antibody, in Moderate-to-Severe Systemic Lupus Erythematosus.* Arthritis Rheumatol, 2017. **69**(2): p. 376-386.
- 85. Anderson, E. and R. Furie, *Anifrolumab in systemic lupus erythematosus: current knowledge and future considerations.* Immunotherapy, 2020. **12**(5): p. 275-286.
- 86. Sun, X., A. Wiedeman, N. Agrawal, T.H. Teal, L. Tanaka, K.L. Hudkins, C.E. Alpers, S. Bolland, M.B. Buechler, J.A. Hamerman, J.A. Ledbetter, D. Liggitt and K.B. Elkon, *Increased ribonuclease expression reduces inflammation and prolongs survival in TLR7 transgenic mice.* J Immunol, 2013. **190**(6): p. 2536-43.
- Pellerin, A., K. Otero, J.M. Czerkowicz, H.M. Kerns, R.I. Shapiro, A.M. Ranger, K.L. Otipoby, F.R. Taylor, T.O. Cameron, J.L. Viney and D. Rabah, *Anti-BDCA2* monoclonal antibody inhibits plasmacytoid dendritic cell activation through Fcdependent and Fc-independent mechanisms. EMBO Mol Med, 2015. 7(4): p. 464-76.
- 88. Berggren, O., N. Hagberg, G. Weber, G.V. Alm, L. Ronnblom and M.L. Eloranta, *B lymphocytes enhance interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells.* Arthritis Rheum, 2012. **64**(10): p. 3409-19.
- 89. Hagberg, N., O. Berggren, D. Leonard, G. Weber, Y.T. Bryceson, G.V. Alm, M.L. Eloranta and L. Ronnblom, *IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells stimulated with RNA-containing immune complexes is promoted by NK cells via MIP-1beta and LFA-1.* J Immunol, 2011. **186**(9): p. 5085-94.
- 90. Porcar, M. and J. Pereto, *Nature versus design: synthetic biology or how to build a biological non-machine.* Integr Biol (Camb), 2016. **8**(4): p. 451-5.
- 91. Konning, D., S. Zielonka, J. Grzeschik, M. Empting, B. Valldorf, S. Krah, C. Schroter, C. Sellmann, B. Hock and H. Kolmar, *Camelid and shark single domain antibodies: structural features and therapeutic potential.* Curr Opin Struct Biol, 2017. **45**: p. 10-16.
- 92. Flajnik, M.F., N. Deschacht and S. Muyldermans, A case of convergence: why did a simple alternative to canonical antibodies arise in sharks and camels? PLoS Biol, 2011. **9**(8): p. e1001120.
- 93. Ebrahimizadeh, W., S.L. Mousavi Gargari, Z. Javidan and M. Rajabibazl, *Production of Novel VHH Nanobody Inhibiting Angiogenesis by Targeting Binding Site of VEGF.* Appl Biochem Biotechnol, 2015. **176**(7): p. 1985-95.
- 94. Wesolowski, J., V. Alzogaray, J. Reyelt, M. Unger, K. Juarez, M. Urrutia, A. Cauerhff, W. Danquah, B. Rissiek, F. Scheuplein, N. Schwarz, S. Adriouch, O. Boyer, M. Seman, A. Licea, D.V. Serreze, F.A. Goldbaum, F. Haag and F. Koch-

Nolte, *Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity.* Med Microbiol Immunol, 2009. **198**(3): p. 157-74.

- 95. Desmyter, A., T.R. Transue, M.A. Ghahroudi, M.H. Thi, F. Poortmans, R. Hamers, S. Muyldermans and L. Wyns, *Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme.* Nat Struct Biol, 1996. **3**(9): p. 803-11.
- 96. Stanfield, R.L., H. Dooley, M.F. Flajnik and I.A. Wilson, *Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme.* Science, 2004. **305**(5691): p. 1770-3.
- 97. Streltsov, V.A., J.A. Carmichael and S.D. Nuttall, *Structure of a shark IgNAR antibody variable domain and modeling of an early-developmental isotype.* Protein Sci, 2005. **14**(11): p. 2901-9.
- 98. Davies, J. and L. Riechmann, *Single antibody domains as small recognition units:* design and in vitro antigen selection of camelized, human VH domains with improved protein stability. Protein Eng, 1996. **9**(6): p. 531-7.
- 99. Holt, L.J., C. Herring, L.S. Jespers, B.P. Woolven and I.M. Tomlinson, *Domain antibodies: proteins for therapy.* Trends Biotechnol, 2003. **21**(11): p. 484-90.
- Vincke, C., R. Loris, D. Saerens, S. Martinez-Rodriguez, S. Muyldermans and K. Conrath, General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. J Biol Chem, 2009. 284(5): p. 3273-3284.
- 101. Rossotti, M.A., K. Belanger, K.A. Henry and J. Tanha, *Immunogenicity and humanization of single-domain antibodies.* FEBS J, 2022. **289**(14): p. 4304-4327.
- 102. Palmer, A.E., Y. Qin, J.G. Park and J.E. McCombs, *Design and application of genetically encoded biosensors.* Trends Biotechnol, 2011. **29**(3): p. 144-52.
- 103. Shimomura, O., F.H. Johnson and Y. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea.* J Cell Comp Physiol, 1962. **59**: p. 223-39.
- 104. Cormack, B.P., R.H. Valdivia and S. Falkow, *FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP).* Gene, 1996. **173**(1 Spec No): p. 33-8.
- 105. Genove, G., B.S. Glick and A.L. Barth, *Brighter reporter genes from multimerized fluorescent proteins.* Biotechniques, 2005. **39**(6): p. 814, 816, 818 passim.
- 106. Cinelli, R.A., A. Ferrari, V. Pellegrini, M. Tyagi, M. Giacca and F. Beltram, *The enhanced green fluorescent protein as a tool for the analysis of protein dynamics and localization: local fluorescence study at the single-molecule level.* Photochem Photobiol, 2000. **71**(6): p. 771-6.
- Shaner, N.C., R.E. Campbell, P.A. Steinbach, B.N. Giepmans, A.E. Palmer and R.Y. Tsien, *Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein.* Nat Biotechnol, 2004.
  22(12): p. 1567-72.
- 108. Scheller, J., E. Engelowski, J.M. Moll and D.M. Floss, *Immunoreceptor Engineering and Synthetic Cytokine Signaling for Therapeutics.* Trends Immunol, 2019. **40**(3): p. 258-272.
- 109. Moraga, I., J.B. Spangler, J.L. Mendoza, M. Gakovic, T.S. Wehrman, P. Krutzik and K.C. Garcia, *Synthekines are surrogate cytokine and growth factor agonists that compel signaling through non-natural receptor dimers.* Elife, 2017. **6**.
- 110. Hutmacher, C. and D. Neri, *Antibody-cytokine fusion proteins: Biopharmaceuticals with immunomodulatory properties for cancer therapy.* Adv Drug Deliv Rev, 2019. **141**: p. 67-91.
- 111. Pretto, F., G. Elia, N. Castioni and D. Neri, *Preclinical evaluation of IL2-based immunocytokines supports their use in combination with dacarbazine, paclitaxel*

and TNF-based immunotherapy. Cancer Immunol Immunother, 2014. 63(9): p. 901-10.

- 112. Roskoski Jr., R., *The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer.* Pharmacol Res, 2014. **79**: p. 34-74.
- 113. Shum, T., B. Omer, H. Tashiro, R.L. Kruse, D.L. Wagner, K. Parikh, Z. Yi, T. Sauer, D. Liu, R. Parihar, P. Castillo, H. Liu, M.K. Brenner, L.S. Metelitsa, S. Gottschalk and C.M. Rooney, *Constitutive Signaling from an Engineered IL7 Receptor Promotes Durable Tumor Elimination by Tumor-Redirected T Cells.* Cancer Discov, 2017. **7**(11): p. 1238-1247.
- Bohlius, J., J. Wilson, J. Seidenfeld, M. Piper, G. Schwarzer, J. Sandercock, S. Trelle, O. Weingart, S. Bayliss, B. Djulbegovic, C.L. Bennett, S. Langensiepen, C. Hyde and A. Engert, *Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients.* J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(10): p. 708-14.
- 115. Peng, B., G. Kong, C. Yang and Y. Ming, *Erythropoietin and its derivatives: from tissue protection to immune regulation.* Cell Death Dis, 2020. **11**(2): p. 79.
- 116. Gerhartz, C., B. Heesel, J. Sasse, U. Hemmann, C. Landgraf, J. Schneider-Mergener, F. Horn, P.C. Heinrich and L. Graeve, *Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. J Biol Chem*, 1996. **271**(22): p. 12991-8.
- 117. Hemmann, U., C. Gerhartz, B. Heesel, J. Sasse, G. Kurapkat, J. Grotzinger, A. Wollmer, Z. Zhong, J.E. Darnell, Jr., L. Graeve, P.C. Heinrich and F. Horn, Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 12999-3007.
- 118. Si, W., C. Li and P. Wei, *Synthetic immunology: T-cell engineering and adoptive immunotherapy.* Synth Syst Biotechnol, 2018. **3**(3): p. 179-185.
- 119. Sermer, D. and R. Brentjens, *CAR T-cell therapy: Full speed ahead.* Hematol Oncol, 2019. **37 Suppl 1**: p. 95-100.
- 120. Schuster, S.J., J. Svoboda, E.A. Chong, S.D. Nasta, A.R. Mato, O. Anak, J.L. Brogdon, I. Pruteanu-Malinici, V. Bhoj, D. Landsburg, M. Wasik, B.L. Levine, S.F. Lacey, J.J. Melenhorst, D.L. Porter and C.H. June, *Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas.* N Engl J Med, 2017. **377**(26): p. 2545-2554.
- 121. Neelapu, S.S., F.L. Locke, N.L. Bartlett, L.J. Lekakis, D.B. Miklos, C.A. Jacobson, I. Braunschweig, O.O. Oluwole, T. Siddiqi, Y. Lin, J.M. Timmerman, P.J. Stiff, J.W. Friedberg, I.W. Flinn, A. Goy, B.T. Hill, M.R. Smith, A. Deol, U. Farooq, P. McSweeney, J. Munoz, I. Avivi, J.E. Castro, J.R. Westin, J.C. Chavez, A. Ghobadi, K.V. Komanduri, R. Levy, E.D. Jacobsen, T.E. Witzig, P. Reagan, A. Bot, J. Rossi, L. Navale, Y. Jiang, J. Aycock, M. Elias, D. Chang, J. Wiezorek and W.Y. Go, *Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma.* N Engl J Med, 2017. **377**(26): p. 2531-2544.
- 122. Miliotou, A.N. and L.C. Papadopoulou, *CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy.* Curr Pharm Biotechnol, 2018. **19**(1): p. 5-18.
- 123. Xu, J., J.J. Melenhorst and J.A. Fraietta, *Toward precision manufacturing of immunogene T-cell therapies.* Cytotherapy, 2018. **20**(5): p. 623-638.
- 124. Ruella, M. and C.H. June, *Chimeric Antigen Receptor T cells for B Cell Neoplasms: Choose the Right CAR for You.* Curr Hematol Malig Rep, 2016. **11**(5): p. 368-84.

- 125. Jin, Z., R. Xiang, K. Qing, X. Li, Y. Zhang, L. Wang, H. Zhu, Y. Mao, Z. Xu and J. Li, *The severe cytokine release syndrome in phase I trials of CD19-CAR-T cell therapy: a systematic review.* Ann Hematol, 2018. **97**(8): p. 1327-1335.
- 126. Beavis, P.A., C.Y. Slaney, M.H. Kershaw, D. Gyorki, P.J. Neeson and P.K. Darcy, Reprogramming the tumor microenvironment to enhance adoptive cellular therapy. Semin Immunol, 2016. **28**(1): p. 64-72.
- 127. Avanzi, M.P., O. Yeku, X. Li, D.P. Wijewarnasuriya, D.G. van Leeuwen, K. Cheung, H. Park, T.J. Purdon, A.F. Daniyan, M.H. Spitzer and R.J. Brentjens, Engineered Tumor-Targeted T Cells Mediate Enhanced Anti-Tumor Efficacy Both Directly and through Activation of the Endogenous Immune System. Cell Rep, 2018. **23**(7): p. 2130-2141.
- 128. Curran, K.J., B.A. Seinstra, Y. Nikhamin, R. Yeh, Y. Usachenko, D.G. van Leeuwen, T. Purdon, H.J. Pegram and R.J. Brentjens, *Enhancing antitumor efficacy of chimeric antigen receptor T cells through constitutive CD40L expression.* Mol Ther, 2015. **23**(4): p. 769-78.
- 129. Berdeja, J.G., Y. Lin, N. Raje, N. Munshi, D. Siegel, M. Liedtke, S. Jagannath, M.V. Maus, A. Turka, L.P. Lam, K. Hege, R.A. Morgan, M.T. Quigley and J.N. Kochenderfer, Durable Clinical Responses in Heavily Pretreated Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Updated Results from a Multicenter Study of bb2121 Anti-Bcma CAR T Cell Therapy. Blood, 2017. **130**(Suppl\_1): p. 740-740.
- Engelowski, E., A. Schneider, M. Franke, H. Xu, R. Clemen, A. Lang, P. Baran, C. Binsch, B. Knebel, H. Al-Hasani, J.M. Moll, D.M. Floss, P.A. Lang and J. Scheller, Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands. Nat Commun, 2018. 9(1): p. 2034.
- 131. Mossner, S., H.T. Phan, S. Triller, J.M. Moll, U. Conrad and J. Scheller, *Multimerization strategies for efficient production and purification of highly active synthetic cytokine receptor ligands.* PLoS One, 2020. **15**(4): p. e0230804.
- 132. Floss, D.M., S. Mrotzek, T. Klocker, J. Schroder, J. Grotzinger, S. Rose-John and J. Scheller, *Identification of canonical tyrosine-dependent and noncanonical tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor.* J Biol Chem, 2013. **288**(27): p. 19386-400.
- 133. Ketteler, R., S. Glaser, O. Sandra, U.M. Martens and U. Klingmuller, *Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors.* Gene Ther, 2002. **9**(8): p. 477-87.
- 134. Suthaus, J., A. Tillmann, I. Lorenzen, E. Bulanova, S. Rose-John and J. Scheller, Forced homo- and heterodimerization of all gp130-type receptor complexes leads to constitutive ligand-independent signaling and cytokine-independent growth. Mol Biol Cell, 2010. **21**(15): p. 2797-807.
- 135. Gearing, D.P., S.F. Ziegler, M.R. Comeau, D. Friend, B. Thoma, D. Cosman, L. Park and B. Mosley, *Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(3): p. 1119-23.
- 136. Behrmann, I., T. Smyczek, P.C. Heinrich, H. Schmitz-Van de Leur, W. Komyod, B. Giese, G. Muller-Newen, S. Haan and C. Haan, 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, 2004. **279**(34): p. 35486-93.

- 137. Edelheit, O., A. Hanukoglu and I. Hanukoglu, Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. BMC Biotechnol, 2009. **9**: p. 61.
- 138. Fang, J., J.-J. Qian, S. Yi, T.C. Harding, G.H. Tu, M. VanRoey and K. Jooss, *Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide.* Nat Biotechnol, 2005. **23**(5): p. 584-590.
- 139. Yan, J., H. Wang, Q. Xu, N. Jain, V. Toxavidis, J. Tigges, H. Yang, G. Yue and W. Gao, Signal sequence is still required in genes downstream of "autocleaving" 2A peptide for secretary or membrane-anchored expression. Anal Biochem, 2010. **399**(1): p. 144-146.
- 140. Jostock, T., J. Mullberg, S. Ozbek, R. Atreya, G. Blinn, N. Voltz, M. Fischer, M.F. Neurath and S. Rose-John, *Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses.* Eur J Biochem, 2001. **268**(1): p. 160-7.
- Zoellner, N., N. Coesfeld, F.H. De Vos, J. Denter, H.C. Xu, E. Zimmer, B. Knebel, H. Al-Hasani, S. Mossner, P.A. Lang, D.M. Floss and J. Scheller, *Synthetic mimetics assigned a major role to IFNAR2 in type I interferon signaling*. Front Microbiol, 2022. **13**: p. 947169.
- 142. Pattyn, E., X. Van Ostade, L. Schauvliege, A. Verhee, M. Kalai, J. Vandekerckhove and J. Tavernier, *Dimerization of the interferon type I receptor IFNaR2-2 is sufficient for induction of interferon effector genes but not for full antiviral activity.* J Biol Chem, 1999. **274**(49): p. 34838-45.
- 143. Jaster, R., E. Tschirch, T. Bittorf and J. Brock, *Interferon-alpha inhibits* proliferation of Ba/F3 cells by interfering with interleukin-3 action. Cell Signal, 1999. **11**(10): p. 769-75.
- 144. Yan, H., K. Krishnan, J.T. Lim, L.G. Contillo and J.J. Krolewski, *Molecular* characterization of an alpha interferon receptor 1 subunit (*IFNaR1*) domain required for *TYK2* binding and signal transduction. Mol Cell Biol, 1996. **16**(5): p. 2074-82.
- 145. Gibbs, V.C., M. Takahashi, M. Aguet and A. Chuntharapai, *A negative regulatory region in the intracellular domain of the human interferon-alpha receptor.* J Biol Chem, 1996. **271**(45): p. 28710-6.
- 146. Wagner, T.C., S. Velichko, D. Vogel, M.R. Rani, S. Leung, R.M. Ransohoff, G.R. Stark, H.D. Perez and E. Croze, *Interferon signaling is dependent on specific tyrosines located within the intracellular domain of IFNAR2c. Expression of IFNAR2c tyrosine mutants in U5A cells.* J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 1493-9.
- 147. Velichko, S., T.C. Wagner, J. Turkson, R. Jove and E. Croze, *STAT3 activation* by type I interferons is dependent on specific tyrosines located in the cytoplasmic domain of interferon receptor chain 2c. Activation of multiple STATS proceeds through the redundant usage of two tyrosine residues. J Biol Chem, 2002. **277**(38): p. 35635-41.
- 148. Mossner, S., D. Floss and J. Scheller, *Pro- and anti-apoptotic fate decisions induced by di- and trimeric synthetic cytokine receptors.* iScience, 2021: p. 102471.
- 149. Mossner, S., M. Kuchner, N. Fazel Modares, B. Knebel, H. Al-Hasani, D.M. Floss and J. Scheller, *Synthetic interleukin 22 (IL-22) signaling reveals biological activity of homodimeric IL-10 receptor 2 and functional cross-talk with the IL-6 receptor gp130.* J Biol Chem, 2020. **295**(35): p. 12378-12397.
- 150. Morsut, L., K.T. Roybal, X. Xiong, R.M. Gordley, S.M. Coyle, M. Thomson and W.A. Lim, *Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors.* Cell, 2016. **164**(4): p. 780-91.

- 151. Okabe, M., M. Ikawa, K. Kominami, T. Nakanishi and Y. Nishimune, '*Green mice*' as a source of ubiquitous green cells. FEBS Lett, 1997. **407**(3): p. 313-9.
- 152. Fink, D., S. Wohrer, M. Pfeffer, T. Tombe, C.J. Ong and P.H. Sorensen, Ubiquitous expression of the monomeric red fluorescent protein mCherry in transgenic mice. Genesis, 2010. **48**(12): p. 723-9.
- 153. Goldberg, B.S. and M.E. Ackerman, *Antibody-mediated complement activation in pathology and protection.* Immunol Cell Biol, 2020. **98**(4): p. 305-317.
- 154. Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins.* Science, 1994. **264**(5164): p. 1415-21.
- 155. Stark, G.R., I.M. Kerr, B.R. Williams, R.H. Silverman and R.D. Schreiber, *How cells respond to interferons.* Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 227-64.
- 156. Farrar, J.D., J.D. Smith, T.L. Murphy and K.M. Murphy, *Recruitment of Stat4 to the human interferon-alpha/beta receptor requires activated Stat2.* J Biol Chem, 2000. **275**(4): p. 2693-7.
- 157. Torpey, N., S.E. Maher, A.L. Bothwell and J.S. Pober, *Interferon alpha but not interleukin 12 activates STAT4 signaling in human vascular endothelial cells.* J Biol Chem, 2004. **279**(25): p. 26789-96.
- Prietzsch, H., J. Brock, H.D. Kleine, S. Liebe and R. Jaster, Interferon-alpha inhibits cell cycle progression by Ba/F3 cells through the antagonisation of interleukin-3 effects on key regulators of G(1)/S transition. Cell Signal, 2002. 14(9): p. 751-9.
- 159. Pan, M., E. Kalie, B.J. Scaglione, E.S. Raveche, G. Schreiber and J.A. Langer, *Mutation of the IFNAR-1 receptor binding site of human IFN-alpha2 generates type I IFN competitive antagonists.* Biochemistry, 2008. **47**(46): p. 12018-27.
- 160. Haller, O., S. Stertz and G. Kochs, *The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins.* Microbes Infect, 2007. **9**(14-15): p. 1636-43.
- 161. Verhelst, J., P. Hulpiau and X. Saelens, *Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited.* Microbiol Mol Biol Rev, 2013. **77**(4): p. 551-66.
- 162. Kang, J.S., Y.S. Hwang, L.K. Kim, S. Lee, W.B. Lee, J. Kim-Ha and Y.J. Kim, OASL1 Traps Viral RNAs in Stress Granules to Promote Antiviral Responses. Mol Cells, 2018. **41**(3): p. 214-223.
- 163. Ning, S., J.S. Pagano and G.N. Barber, *IRF7: activation, regulation, modification and function.* Genes Immun, 2011. **12**(6): p. 399-414.
- Silva, D.A., S. Yu, U.Y. Ulge, J.B. Spangler, K.M. Jude, C. Labao-Almeida, L.R. Ali, A. Quijano-Rubio, M. Ruterbusch, I. Leung, T. Biary, S.J. Crowley, E. Marcos, C.D. Walkey, B.D. Weitzner, F. Pardo-Avila, J. Castellanos, L. Carter, L. Stewart, S.R. Riddell, M. Pepper, G.J.L. Bernardes, M. Dougan, K.C. Garcia and D. Baker, *De novo design of potent and selective mimics of IL-2 and IL-15.* Nature, 2019. 565(7738): p. 186-191.
- 165. Zheng, X., Y. Wu, J. Bi, Y. Huang, Y. Cheng, Y. Li, Y. Wu, G. Cao and Z. Tian, *The use of supercytokines, immunocytokines, engager cytokines, and other synthetic cytokines in immunotherapy.* Cell Mol Immunol, 2022. **19**(2): p. 192-209.
- 166. Penafuerte, C., N. Bautista-Lopez, M.R. Boulassel, J.P. Routy and J. Galipeau, The human ortholog of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 fusion protein induces potent ex vivo natural killer cell activation and maturation. Cancer Res, 2009. **69**(23): p. 9020-8.
- 167. Krishnan, K., H. Yan, J.T. Lim and J.J. Krolewski, *Dimerization of a chimeric CD4-interferon-alpha receptor reconstitutes the signaling events preceding STAT phosphorylation.* Oncogene, 1996. **13**(1): p. 125-33.

- 168. Brudno, J.N. and J.N. Kochenderfer, *Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management.* Blood, 2016. **127**(26): p. 3321-30.
- 169. Ruella, M. and C.H. June, *Predicting Dangerous Rides in CAR T Cells: Bridging the Gap between Mice and Humans.* Mol Ther, 2018. **26**(6): p. 1401-1403.
- 170. Paszkiewicz, P.J., S.P. Fräßle, S. Srivastava, D. Sommermeyer, M. Hudecek, I. Drexler, M. Sadelain, L. Liu, M.C. Jensen, S.R. Riddell and D.H. Busch, *Targeted antibody-mediated depletion of murine CD19 CAR T cells permanently reverses B cell aplasia.* J Clin Invest, 2016. **126**(11): p. 4262-4272.
- 171. Lee, K.C., I. Ouwehand, A.L. Giannini, N.S. Thomas, N.J. Dibb and M.J. Bijlmakers, *Lck is a key target of imatinib and dasatinib in T-cell activation.* Leukemia, 2010. **24**(4): p. 896-900.
- 172. Mestermann, K., T. Giavridis, J. Weber, J. Rydzek, S. Frenz, T. Nerreter, A. Mades, M. Sadelain, H. Einsele and M. Hudecek, *The tyrosine kinase inhibitor dasatinib acts as a pharmacologic on/off switch for CAR T cells.* Sci Transl Med, 2019. **11**(499).
- 173. Struhl, G. and A. Adachi, *Nuclear access and action of notch in vivo.* Cell, 1998. **93**(4): p. 649-60.
- 174. Srivastava, S., A.I. Salter, D. Liggitt, S. Yechan-Gunja, M. Sarvothama, K. Cooper, K.S. Smythe, J.A. Dudakov, R.H. Pierce, C. Rader and S.R. Riddell, Logic-Gated ROR1 Chimeric Antigen Receptor Expression Rescues T Cell-Mediated Toxicity to Normal Tissues and Enables Selective Tumor Targeting. Cancer Cell, 2019. **35**(3): p. 489-503 e8.
- 175. Freitag, F., M. Maucher, Z. Riester and M. Hudecek, *New targets and technologies for CAR-T cells.* Curr Opin Oncol, 2020. **32**(5): p. 510-517.
- 176. Philip, M., L. Fairchild, L. Sun, E.L. Horste, S. Camara, M. Shakiba, A.C. Scott, A. Viale, P. Lauer, T. Merghoub, M.D. Hellmann, J.D. Wolchok, C.S. Leslie and A. Schietinger, *Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming.* Nature, 2017. **545**(7655): p. 452-456.
- 177. Mehrabadi, A.Z., R. Ranjbar, M. Farzanehpour, A. Shahriary, R. Dorostkar, M.A. Hamidinejad and H.E.G. Ghaleh, *Therapeutic potential of CAR T cell in malignancies: A scoping review.* Biomed Pharmacother, 2022. **146**: p. 112512.
- 178. Schuster, S.J., M.R. Bishop, C.S. Tam, E.K. Waller, P. Borchmann, J.P. McGuirk, U. Jager, S. Jaglowski, C. Andreadis, J.R. Westin, I. Fleury, V. Bachanova, S.R. Foley, P.J. Ho, S. Mielke, J.M. Magenau, H. Holte, S. Pantano, L.B. Pacaud, R. Awasthi, J. Chu, O. Anak, G. Salles, R.T. Maziarz and J. Investigators, *Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma.* N Engl J Med, 2019. **380**(1): p. 45-56.
- 179. Locke, F.L., A. Ghobadi, C.A. Jacobson, D.B. Miklos, L.J. Lekakis, O.O. Oluwole, Y. Lin, I. Braunschweig, B.T. Hill, J.M. Timmerman, A. Deol, P.M. Reagan, P. Stiff, I.W. Flinn, U. Farooq, A. Goy, P.A. McSweeney, J. Munoz, T. Siddiqi, J.C. Chavez, A.F. Herrera, N.L. Bartlett, J.S. Wiezorek, L. Navale, A. Xue, Y. Jiang, A. Bot, J.M. Rossi, J.J. Kim, W.Y. Go and S.S. Neelapu, *Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial.* Lancet Oncol, 2019. **20**(1): p. 31-42.
- Rafiq, S., O.O. Yeku, H.J. Jackson, T.J. Purdon, D.G. van Leeuwen, D.J. Drakes, M. Song, M.M. Miele, Z. Li, P. Wang, S. Yan, J. Xiang, X. Ma, V.E. Seshan, R.C. Hendrickson, C. Liu and R.J. Brentjens, *Targeted delivery of a PD-1-blocking scFv by CAR-T cells enhances anti-tumor efficacy in vivo.* Nat Biotechnol, 2018.
  36(9): p. 847-856.
- 181. Asmamaw Dejenie, T., G.M.M. Tiruneh, G. Dessie Terefe, F. Tadele Admasu, W. Wale Tesega and E. Chekol Abebe, *Current updates on generations, approvals,*

and clinical trials of CAR T-cell therapy. Hum Vaccin Immunother, 2022. **18**(6): p. 2114254.

- 182. Kagoya, Y., S. Tanaka, T. Guo, M. Anczurowski, C.H. Wang, K. Saso, M.O. Butler, M.D. Minden and N. Hirano, *A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects.* Nat Med, 2018. **24**(3): p. 352-359.
- 183. Vinay, D.S., E.P. Ryan, G. Pawelec, W.H. Talib, J. Stagg, E. Elkord, T. Lichtor, W.K. Decker, R.L. Whelan, H. Kumara, E. Signori, K. Honoki, A.G. Georgakilas, A. Amin, W.G. Helferich, C.S. Boosani, G. Guha, M.R. Ciriolo, S. Chen, S.I. Mohammed, A.S. Azmi, W.N. Keith, A. Bilsland, D. Bhakta, D. Halicka, H. Fujii, K. Aquilano, S.S. Ashraf, S. Nowsheen, X. Yang, B.K. Choi and B.S. Kwon, *Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies.* Semin Cancer Biol, 2015. **35 Suppl**: p. S185-S198.
- 184. Ansari, A.M., A.K. Ahmed, A.E. Matsangos, F. Lay, L.J. Born, G. Marti, J.W. Harmon and Z. Sun, *Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in in Vivo Cell Tracking Experiments.* Stem Cell Rev Rep, 2016. 12(5): p. 553-559.
- 185. Brazelton, T.R. and H.M. Blau, *Optimizing techniques for tracking transplanted stem cells in vivo.* Stem Cells, 2005. **23**(9): p. 1251-65.
- 186. Liu, H.S., M.S. Jan, C.K. Chou, P.H. Chen and N.J. Ke, *Is green fluorescent protein toxic to the living cells*? Biochem Biophys Res Commun, 1999. **260**(3): p. 712-7.
- 187. Pfeifer, A. and I.M. Verma, *Gene therapy: promises and problems.* Annu Rev Genomics Hum Genet, 2001. **2**: p. 177-211.
- Gambotto, A., G. Dworacki, V. Cicinnati, T. Kenniston, J. Steitz, T. Tuting, P.D. Robbins and A.B. DeLeo, *Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein* (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope. Gene Ther, 2000. 7(23): p. 2036-40.
- 189. Stripecke, R., M. Carmen Villacres, D. Skelton, N. Satake, S. Halene and D. Kohn, *Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy.* Gene Ther, 1999. **6**(7): p. 1305-12.
- Sockolosky, J.T., E. Trotta, G. Parisi, L. Picton, L.L. Su, A.C. Le, A. Chhabra, S.L. Silveria, B.M. George, I.C. King, M.R. Tiffany, K. Jude, L.V. Sibener, D. Baker, J.A. Shizuru, A. Ribas, J.A. Bluestone and K.C. Garcia, *Selective targeting of engineered T cells using orthogonal IL-2 cytokine-receptor complexes.* Science, 2018. **359**(6379): p. 1037-1042.
- Kim, A.R., J.C. Ulirsch, S. Wilmes, E. Unal, I. Moraga, M. Karakukcu, D. Yuan, S. Kazerounian, N.J. Abdulhay, D.S. King, N. Gupta, S.B. Gabriel, E.S. Lander, T. Patiroglu, A. Ozcan, M.A. Ozdemir, K.C. Garcia, J. Piehler, H.T. Gazda, D.E. Klein and V.G. Sankaran, *Functional Selectivity in Cytokine Signaling Revealed Through a Pathogenic EPO Mutation.* Cell, 2017. **168**(6): p. 1053-1064 e15.
- 192. Moraga, I., G. Wernig, S. Wilmes, V. Gryshkova, C.P. Richter, W.J. Hong, R. Sinha, F. Guo, H. Fabionar, T.S. Wehrman, P. Krutzik, S. Demharter, I. Plo, I.L. Weissman, P. Minary, R. Majeti, S.N. Constantinescu, J. Piehler and K.C. Garcia, *Tuning cytokine receptor signaling by re-orienting dimer geometry with surrogate ligands.* Cell, 2015. **160**(6): p. 1196-208.
- 193. Rebouissou, S., M. Amessou, G. Couchy, K. Poussin, S. Imbeaud, C. Pilati, T. Izard, C. Balabaud, P. Bioulac-Sage and J. Zucman-Rossi, *Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours*. Nature, 2009. **457**(7226): p. 200-4.

## 8 Anhang

### 8.1 Vektorkarten

Hier finden sich Darstellungen der verwendeten Plasmide.

#### 8.1.1 pcDNA3.1-2A-mIFNAR



Ergänzende Abb. 1: Vektorkarte von pcDNA3.1-2A-mIFNAR (vgl. 3.1.2).

#### 8.1.2 pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR



Ergänzende Abb. 2: Vektorkarte von pcDNA3.1-SyCyR-2A-mIFNAR (vgl. 3.1.2).

### 8.2 Genexpression von Ba/F3-gp130-Zellen

Im Folgenden dargestellt (vgl. ergänzende Abb. 3) ist die Analyse der Genexpression untransduzierter Ba/F3-gp130-Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml GFP-mCherry aus konditionierten CHO-K1-Zellüberständen, sowie 20 ng/ml HIL-6. Sie wurden entsprechend Abb. 18 stimuliert und anschließend per *real-time* qPCR auf die Expression von MX1 untersucht. Da hier keine Genexpression nachgewiesen werden konnte, ist die Genexpression in Abb. 18 auf die Stimulation mit IFNα4 und GFP-mCherry zurückzuführen.



# Ergänzende Abb. 3: Analyse der Kinetik der Genexpression von MX1 mittels *real-time* qPCR in untransduzierten Ba/F3-gp130 Zellen.

Relative Genexpression von MX1 in untransduzierten Ba/F3-gp130 Zellen. Die Zellen wurden über verschiedene Zeiträume (30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h) mit 20 ng/ml HIL-6 und 200 U/ml IFNa4 oder 100 ng/ml GFP-mCherry stimuliert. Nach Isolation der RNA und Umwandlung in cDNA erfolgte die Ermittlung der relativen Genexpression von MX1 mittels *real-time* qPCR. Die Standardabweichung ist in grau dargestellt. Es handelt sich um einen repräsentativen von drei Versuchen.

## Danksagung

Ich möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet haben. Dieses Projekt wäre ohne die Hilfe und Unterstützung vieler Menschen nicht möglich gewesen.

In erster Linie möchte ich meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller und meiner Betreuerin PD Dr. Doreen Floß meinen tiefsten Dank aussprechen. Ihre fachliche Kompetenz und unermüdliche Unterstützung haben einen entscheidenden Beitrag zu meinem akademischen Erfolg geleistet. Dabei war mir bewusst, dass die stets geduldige und ambitionierte Anleitung, die ich während meiner Arbeit erhielt, keinesfalls selbstverständlich ist.

Herzlich danken möchte ich ebenfalls meinen Arbeitskollegen des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II sowie allen Beteiligten der anderen Arbeitsgruppen als auch meinen mitstudierenden Freunden. Sie alle, die mich in dieser Zeit begleitet, mit mir Ideen ausgetauscht und konstruktive Kritik geäußert haben, machten durch die gemeinsamen Diskussionen und den Zusammenhalt die Forschungszeit zu einer bereichernden Erfahrung.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern. Eure bedingungslose Liebe und Unterstützung gaben mir in meinem bisherigen Leben die Sicherheit und Resilienz, die ich brauchte, um schwierige Zeiten durchzustehen und zu dem Menschen zu werden, der ich heute bin. Eure Opferbereitschaft, eure Ermutigung und die Kompromisse, die ihr für meine Entwicklung eingegangen seid, machen diesen Meilenstein nicht zu einem persönlichen Triumph, sondern auch zu eurer Errungenschaft. Weiterhin möchte ich auch meiner gesamten Familie danken, die für mich ein Rückzugsort ist und auf die ich mich immer verlassen kann.