

**Charakterisierung von  
Chemokin-Rezeptor-Interaktionen mittels  
APEX2-Fusionsproteinen**



Bastian Felix Meyer

2024

Aus der  
Abteilung für Klinische Pharmakologie  
Klinik der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Stefan Endres

**Charakterisierung von Chemokin-Rezeptor-Interaktionen  
mittels APEX2-Fusionsproteinen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Bastian Felix Meyer

aus  
Heidelberg

Jahr  
2024

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. David Anz  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Sebastian Theurich  
Prof. Dr. Dolores Schendel  
PD Dr. Heike Pohla

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2024

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Chemokine und Chemokinrezeptoren</b>	<b>1</b>
1.1.1 Eigenschaften von Chemokinen	1
1.1.2 Eigenschaften von Chemokinrezeptoren	2
1.1.3 Redundanz bei Chemokin-Rezeptor-Bindungspaaren	4
1.1.4 Die klinische Bedeutung von Chemokin-Rezeptor-Achsen	6
<b>1.2 Die CCL22-CCR4-Achse</b>	<b>7</b>
1.2.1 Das Chemokin CCL22	8
1.2.2 Der CC-Chemokin-Rezeptor 4	9
1.2.3 Die klinische Bedeutung der CCR4-CCL22-Achse	9
1.2.4 Hinweise auf einen weiteren, bisher unbekanntem Rezeptor für CCL22	10
<b>1.3 Verfahren zur Untersuchung von Ligandenbindung</b>	<b>11</b>
1.3.1 FRET (Förster-Resonanzenergietransfer)	12
1.3.2 Radioliganden-Bindungstest	12
1.3.3 Co-Immunpräzipitation	13
1.3.4 Messung des Calciumeinstroms	14
1.3.5 APEX2 Proximity Labeling	15
<b>1.4 Fragestellung</b>	<b>16</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>17</b>
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3 Reagenzien und Kits	19
2.1.4 Puffer und Lösungen	21
2.1.5 Zellkultur	22
2.1.6 Zelllinien	23
2.1.7 Antikörper und Farbstoffe	23
2.1.8 Primer und Plasmide	24
2.1.9 Software	25
<b>2.2 Methoden</b>	<b>25</b>
2.2.1 Allgemeine Zellkulturmethoden	25
2.2.1.1 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	26
2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	26
2.2.1.3 Mykoplasmentest	26
2.2.1.4 Generierung von konditioniertem Medium	27
2.2.1.5 Migrationsversuche	27
2.2.2 Tierzucht und -haltung	28
2.2.3 Gewinnung von primären murinen Zellen	28
2.2.4 Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren	28
2.2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese	29
2.2.4.3 Klonierung	29
2.2.4.4 Restriktionsverdau	30
2.2.4.5 Ligation	30
2.2.4.6 Mutagenese	30
2.2.4.7 DNA-Transformation von Bakterienkultur	30
2.2.4.8 Transfektion von Zelllinien	31
2.2.4.9 Lentivirale Transduktion von Zelllinien	31
2.2.5 Proteinchemische Methoden	32
2.2.5.1 Gewinnung von Zellysat	32
2.2.5.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	33

---

2.2.5.3 Western Blot.....	33
2.2.5.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	35
2.2.6 Bestimmung der APEX2-Enzymaktivität mittels Chemilumineszenz .....	35
2.2.7 Allgemeines zur Biotinylierung .....	36
2.2.8 Biotinylierung einer B3Z-Co-Kultur .....	37
2.2.9 Streptavidin- <i>Pulldown</i> .....	37
2.2.10 Durchflusszytometrie.....	38
2.2.11 Konfokalmikroskopie .....	38
2.2.12 Statistische Analyse .....	39
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Aufbau und Funktion der APEX2-Fusionsproteine .....</b>	<b>40</b>
3.1.1 Generierung der APEX2-Konstrukte .....	41
3.1.2 Expression der Fusionsproteine .....	42
3.1.3 Funktionelle Validierung der Fusionsproteine.....	44
<b>3.2 Spezifität der Biotinylierung von CCR4 .....</b>	<b>47</b>
<b>3.3 Bestimmung der Bindungsfähigkeiten von Chemokinen über <i>Proximity Labeling</i> .....</b>	<b>52</b>
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>55</b>
4.1 Zusammensetzung der Fusionsproteine .....	55
4.2 Spezifität der Fusionsproteine.....	57
4.3 <i>Proof of Concept</i> anhand der CCL22-CCL17-CCR4-Achse und Interpretation des Rezeptor- <i>Screenings</i> .....	59
4.4 Stärken sowie Limitationen des APEX2 <i>Proximity Labelings</i> .....	62
4.5 Ausblick über mögliche weitere Anwendungsgebiete.....	65
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>66</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>68</b>
<b>7. Verzeichnis der Abkürzungen .....</b>	<b>86</b>
<b>8. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>88</b>
<b>9. Danksagung .....</b>	<b>89</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Unser Immunsystem wird durch eine Reihe von interzellulären Botenstoffen reguliert, wobei Chemokine eine zentrale Rolle spielen. Diese von Körperzellen produzierten Moleküle binden an Chemokinrezeptoren auf Zelloberflächen, was zur Bewegung oder Aktivierung von Immunzellen führen kann. Ein komplexes Netzwerk aus einer Vielzahl von Chemokinen und Rezeptoren ermöglicht eine vielfältige Kommunikation, zu dessen Entschlüsselung diese Arbeit einen Beitrag leisten soll.

### 1.1.1 Eigenschaften von Chemokinen

Chemokine sind körpereigene Botenstoffe und gehören zur Gruppe der chemotaktisch wirkenden Zytokine, von denen bis heute etwa 50 verschiedene Vertreter bekannt sind (Bachelierie *et al.* 2014, Nagarsheth *et al.* 2017). Gemeinsam haben Chemokine eine relativ kleine Molekülgröße von etwa 10 kDa und eine verwandte dreidimensionale Struktur (Miller *et al.* 2017). Ihre ähnliche dreidimensionale Struktur erhalten Chemokine durch Disulfidbrücken zwischen bestimmten Cystein-Resten. Vom N-Terminus ausgehend, lassen sich Chemokine anhand der Konfiguration der ersten beiden Cystein-Reste in vier Gruppen einteilen (Miller *et al.* 2017). Nach internationaler Nomenklatur werden Chemokine benannt, indem dem Gruppen-Präfix der Buchstabe „L“ für „Ligand“ folgt und eine aufsteigende Zahl angestellt wird. Beispielsweise beschreibt CCL5 den CC-Chemokin-Ligand Nr. 5 (Bachelierie *et al.* 2014).

Funktionell unterscheidet man homöostatische von inflammatorischen Chemokinen (Moser *et al.* 2004). Erstgenannte werden kontinuierlich exprimiert und tragen zur Immuntoleranz, Reifung und Verteilung von Immunzellen im Gewebe bei (Zlotnik *et al.* 2012). Inflammatorische Chemokine wie CCL2 steuern dagegen die Aktivierung und Migration von Immunzellen bei entzündlichen Prozessen (Daly *et al.* 2003, Zlotnik *et al.* 2012). Diese Einteilung versteht sich nicht als strikt, sondern dient, aufgrund von Doppelfunktionen einiger Chemokine, nur als Orientierung (Moser *et al.* 2004). Neben ihrer bekanntesten Eigenschaft, gerichtete Migration von Leukozyten auszulösen, nehmen Chemokine Einfluss auf die Organo- und Angiogenese und spielen eine wichtige Rolle in der Biologie und Metastasierung vieler Tumore (Müller *et al.* 2001, Murakami *et al.* 2004, Strieter *et al.* 2005, Zlotnik *et al.* 2011). Die unterschiedlichen und weitreichenden Einflüsse von Chemokinen auf bestimmte Prozesse des Körpers werden

in defizienten Mausmodellen deutlich. Beispielsweise haben CCL22-defiziente Mäuse unter homöostatischen Bedingungen einen unauffälligen Phänotyp, welcher jedoch bei Immunaktivierung durch eine überschießende Immunantwort auffällt (Rapp *et al.* 2019). Auch CXCL4-defiziente Tiere unterscheiden sich im Wachstum zunächst nicht von Wildtyp-Tieren, weisen jedoch einen schwereren Verlauf einer Influenza-Infektion auf (Guo *et al.* 2017). Eine CXCL12-Defizienz bei Mäusen ist dagegen nicht mit dem Leben vereinbar und führt durch die Rolle des Chemokins bei der Angio- und Organogenese bereits in der Embryonalperiode zum Tod (Ratajczak *et al.* 2006, Tachibana *et al.* 1998). Posttranslational können Chemokine eine Vielzahl von Modifikationen durchlaufen, die ihr Wirken wesentlich beeinflussen. Neben Di- und Oligomeren von Homo- oder Heteromeren kann auch die Peptidkette einzelner Chemokine direkt moduliert werden (Allen *et al.* 2007, Proudfoot *et al.* 2003). Matrix-Metalloproteasen (MMPs) oder das Enzym Dipeptidyl-Peptidase 4/CD26 (DPP4) können durch Abspaltung einzelner Peptide die Bindungseigenschaften von Chemokinen grundlegend modulieren (Antonsson *et al.* 2010, McQuibban *et al.* 2002, Richter *et al.* 2014, Van Damme *et al.* 1999, Wolf *et al.* 2008). So bindet beispielsweise CCL4 durch DPP4-abhängige Modifikation zusätzlich an CCR1, während sich die Bindungsstärke von CXCL12 verringert (Christopherson *et al.* 2002, Guan *et al.* 2002). Für einige Chemokine wie CCL11, CXCL9 oder CXCL10 ist ein kompletter Funktionsverlust durch die Spaltung mittels DPP4 beschrieben (Aiuti *et al.* 1997, Broxmeyer *et al.* 2008, Proost *et al.* 2001, Struyf *et al.* 1999). Neben der bekannten Rolle im Glucosestoffwechsel wurde DPP4 aufgrund des zusätzlichen Einflusses auf Chemokine bereits im Mausmodell als Therapieziel bei Tumorerkrankungen genutzt. So führt der DPP4-Inhibitor Sitagliptin beim malignen Melanom zur verbesserten T-Zell Infiltration und stärkerem Ansprechen einer Chemotherapie sowie Checkpoint-Blockade *in vivo* durch den Erhalt von biologisch aktivem CXCL10 (Barreira da Silva *et al.* 2015).

### 1.1.2 Eigenschaften von Chemokinrezeptoren

Chemokine wirken über die Bindung an Chemokinrezeptoren. Diese Membranrezeptoren gehören mit ihren sieben Transmembrandomänen zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Chemokinrezeptoren finden sich in erster Linie auf der Zelloberfläche von Leukozyten, werden aber auch von anderen Zelltypen exprimiert. Die Einteilung der bisher entdeckten 19 Chemokinrezeptoren erfolgt analog zu den Chemokinen in C-, CC-, CXC und CX3C-Rezeptoren. Die Klasse der gebundenen Chemokine gibt die aufsteigende Nomenklatur vor. So bindet

beispielsweise der CC-Rezeptor 4 (CCR4) ausschließlich CC-Chemokine. Neben diesem Regelfall gibt es auch Chemokinrezeptoren wie CCR5, die familienübergreifend Liganden binden, oder sogar durch Nicht-Chemokine aktiviert werden.

Das *two-site*-Modell von Crump et al. beschreibt das Grundkonzept der Abläufe einer Bindung an Chemokinrezeptoren (Crump et al. 1997). Zentrale Rolle dabei spielen die N-Termini beider Bindungspartner, wodurch eine Konformationsänderung am Rezeptor erfolgt und intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt werden. In den letzten Jahren wurden neue Prinzipien der Rezeptorbindung und -aktivierung entdeckt, die die Interaktionen zwischen Ligand und Rezeptor als deutlich variabler und komplexer erkennen lassen. Neben möglichen Dimerisierungen und posttranslationalen Modifikationen beider Bindungspartner fließen multiple Bindungsstellen, der Einfluss der extrazellulären Schleifen und mehrere mögliche Konformationen der Rezeptoren mit in das überarbeitete *multi-site / multi-variable* Modell ein (Kleist et al. 2016).

Aktiviert Chemokinrezeptoren führen in der Regel zum Calciuminflux und haben abhängig von der Signaltransduktion Einfluss auf Genexpression, Zellstoffwechsel und Migration einer Zelle. Die Signalkaskaden enden, wenn die Rezeptor-assoziierten G-Proteine wieder assoziieren (Murphy et al. 2014). Nach Aktivierung werden Chemokinrezeptoren im Regelfall nach kurzer Zeit über Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert, wodurch eine zeitliche begrenzte Desensibilisierung der Zelle für weitere Chemokine erreicht wird.

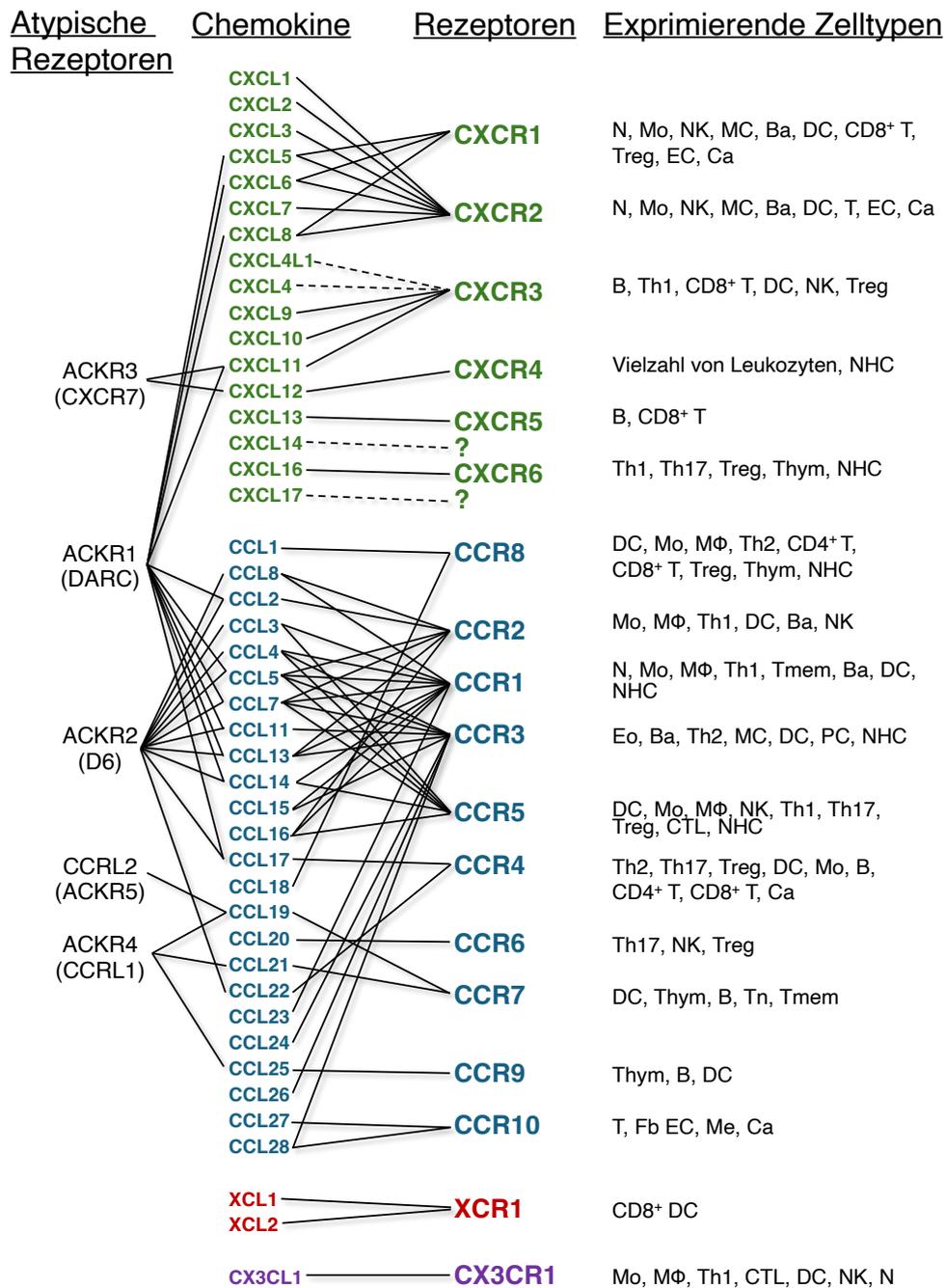
Neben klassischen Chemokinrezeptoren gibt es die Gruppe der atypischen Chemokinrezeptoren (ACKR), von denen mit dem Duffy Antigen Rezeptor (ACKR1), dem D6-Rezeptor (ACKR2), CXCR7 (ACKR3) und CCR11 (ACKR4) vier identifiziert wurden (Bachelier et al. 2014). Diese Rezeptoren vereint die Eigenschaft Chemokine durch Internalisierung und Abbau abzufangen, wobei sie nicht mit G-Proteinen assoziiert sind und somit keine Migration vermitteln. Insgesamt hat sich die Vorstellung, ACKRs seien „stumme Chemokinrezeptoren“, die Chemokine lediglich abbauen, in den letzten Jahren gewandelt. Es gilt als erwiesen, dass ACKRs großen Einfluss auf die Wirkung von Chemokinen haben und deren Interaktion mit klassischen Chemokinrezeptoren modulieren. Beispielsweise schützt ACKR2 auf Trophoblasten den Embryo über den Kontakt zum mütterlichen Blut und den dortigen Chemokinen vor Entzündung und Abstoßungsreaktion (Madigan et al. 2010, Martinez de la Torre et al. 2007). Weiter zeigen ACKR3-defiziente (ACKR3<sup>-/-</sup>) Mäuse schwere Fehlentwicklungen und sind oftmals nicht lebensfähig (Gerrits et al. 2008, Sierro et al. 2007). Daher stellen ACKRs

---

heute bereits ein potenzielles Ziel neuer Chemokin-gerichteter Therapien dar (Bonecchi et al. 2016).

### 1.1.3 Redundanz bei Chemokin-Rezeptor-Bindungspaaren

Die Anzahl möglicher Bindungspartner von Chemokinen und Chemokinrezeptoren ist sehr variabel. So gibt es neben „promiskuitiven“ Rezeptoren wie CCR1 und CXCR2 mit bis zu zehn Bindungspartnern auch „monogame“ Bindungspaare wie CXCL12 und CXCR4 oder CCL20 und CCR6. Dabei interagiert kein Chemokin mit nur einem einzelnen Zelltyp, sondern einzelne Zellen interagieren über die Expression mehrerer Rezeptoren mit unterschiedlichen Chemokinen. So entsteht ein komplexes Kommunikationsnetzwerk, das in Teilen redundant zu sein scheint (Mantovani *et al.* 1999).



**Abbildung 1: Spezifität von Chemokinen für Chemokinrezeptoren und Verteilung der Chemokinrezeptoren auf Leukozyten-Subpopulationen.** Ba: Basophiler Granulozyt; Ca: Tumorzelle; CTL: Cytotoxische T-Zelle, EC: Endothelzelle; Eo, Eosinophiler Granulozyt; Fb: Fibroblast; MC: Mastzelle; Me: Melanozyt; Mo: Monozyt; MΦ: Makrophage; N: Neutrophiler Granulozyt; NK: Natürliche Killerzelle; NHC: nicht-hämatopoetische Zelle; PC: Plasmazelle; T: T-Zelle; Th1, Typ1 T-Helferzelle; Th17: Typ-17-T-Helferzelle, Tmem: *memory* T-Zelle, Tn: naive T-Zelle; Thym: Thymozyt; Treg: regulatorische T-Zelle. Adaptiert nach Bachelierie et al. 2014.

Es ist anzunehmen, dass durch räumlich-zeitliche Verteilung der Chemokin- und Chemokinrezeptorexpression die Immunantwort dynamisch feingesteuert wird. So können Mäuse, die defizient für einzelne Chemokinrezeptoren sind, auch erst im Rahmen von Entzündungen Auffälligkeiten in der Verteilung von Immunzellen zeigen (Dyer *et al.* 2019). Ebenso können mehrere Liganden eines einzelnen Rezeptors sequenziell wirken (Mariani *et al.* 2004, Vestergaard *et al.* 2000). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das Vorhandensein mehrerer Liganden einzelner Rezeptoren ist das sogenannte „*biased signaling*“ (Corbisier *et al.* 2015), was unterschiedliche Signalwege mehrerer Liganden an einem einzelnen Rezeptor beschreibt und inzwischen ein fest etabliertes Prinzip von Chemokinrezeptoren ist (Jørgensen *et al.* 2018). In der Zusammenschau ist davon auszugehen, dass die scheinbare Redundanz *in vivo* dazu dient, Chemokinsignale räumlich und zeitlich zu modulieren.

#### 1.1.4 Die klinische Bedeutung von Chemokin-Rezeptor-Achsen

Chemokine steuern grundlegende Funktionen des Immunsystems. Aus diesem Grund spielen sie auch in der Pathogenese von zahlreichen Krankheiten eine wichtige Rolle. Dies konnte für Atherosklerose, Infektionserkrankungen, sowie allergische und atopische Erkrankungen gezeigt werden (Berger *et al.* 1999, Horikawa *et al.* 2002, Kakinuma *et al.* 2002, Lederman *et al.* 2006, Murdoch *et al.* 2000, Soehnlein *et al.* 2013, Vijayanand *et al.* 2010). Auch in der Tumorummunologie beeinflussen Chemokinrezeptoren das Krankheitsgeschehen. Tumore können Chemokinrezeptoren nutzen, um lokal invasiv und metastasierend zu wachsen (Gupta *et al.* 2014, Johnson *et al.* 2010, Singh *et al.* 2004). Chemokine steuern ebenso die Infiltration von Immunzellen, die zur Tumorbekämpfung unabdingbar sind. Klassische Chemotherapeutika wie Alkylantien, Cisplatin oder Anthrazykline entfalten ihre antitumorale Wirkung neben direkten cytotoxischen Effekten auch über die Induktion von Chemokingradienten (Hong *et al.* 2011, Sistigu *et al.* 2014). Daneben wurde auch für neue Therapien wie Checkpoint-, CDK4/6- und PARP-Inhibitoren gezeigt, dass deren Wirkung über Chemokinrezeptoren vermittelt wird (Bronger *et al.* 2019, Chow *et al.* 2019, Flomenberg *et al.* 2005, Pantelidou *et al.* 2019, Peng *et al.* 2012).

Aufgrund ihrer zentralen Rolle bei Allergien, Infektions- und Tumorerkrankungen stellen Chemokinrezeptoren wichtige Zielstrukturen in deren Therapien dar (Charo *et al.* 2006, Ha *et al.* 2017, Trivedi *et al.* 2018). Bisher haben drei Chemokin-gerichtete Medikamente eine Zulassung erhalten. Der CCR5-Antagonist Maraviroc ist seit 2007 als

Kombinationstherapie im Rahmen einer HIV-Infektion zugelassen (Fätkenheuer *et al.* 2005, Parra *et al.* 2011). Plerixafor erhielt als CXCR4 Antagonist 2009 die Zulassung zur Verbesserung der Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen bei Patienten mit Lymphom oder multiplem Myelom (Flomenberg *et al.* 2005). 2018 wurde der monoklonale Antikörper gegen CCR4, Mogamulizumab, zur Behandlung zweier T-Zell-Lymphome zugelassen. Die Forschung an weiteren *small molecules* und molekularen Antikörpern hält an. Auch zukünftig verspricht die gezielte Modulation von Chemokinrezeptor-Signalen großes therapeutisches Potential. (Liu *et al.* 2021, Mishra *et al.* 2016). Die therapeutische Blockade einzelner Chemokinrezeptoren bringt jedoch auch Hürden mit sich. Auf den Verlauf von Erkrankungen haben in der Regel mehrere Chemokinrezeptoren Einfluss, weshalb die Blockade einer einzelnen Chemokin-Rezeptor-Achse ungenügend sein kann. Eine weitere Hürde besteht darin, dass eine einzelne Chemokin-Rezeptor-Achse gleichzeitig neben pathologischen auch physiologische Prozesse steuern kann. Durch Blockade kann so eine Vielzahl von Nebenwirkungen auftreten. Beispielsweise wurde 2005 eine klinische Studie zum Einsatz des CCR5-Antagonisten Aplaviroc wegen Hepatotoxizität eingestellt (Yeni *et al.* 2009). Die ambivalente Wirkung einzelner Chemokinrezeptoren wird auch am Beispiel CXCR3 deutlich. Zum einen infiltrieren zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen und Th1-Zellen über CXCR3 in den Tumor (Chheda *et al.* 2016, Wendel *et al.* 2008). Zum anderen nutzen Tumorzellen CXCR3 zur Metastasierung in Lymphknoten oder die Lunge (Cambien *et al.* 2009, Kawada *et al.* 2007, Walser *et al.* 2006). Letztlich scheinen auch variable Bindungseigenschaften, wie unterschiedliche Zustandsformen oder Multimerisierungen der Rezeptoren den Therapieerfolg zu erschweren (Miao *et al.* 2020).

## 1.2 Die CCL22-CCR4-Achse

Die CCL22-CCR4-Achse spielt sowohl in physiologischen als auch in pathophysiologischen Prozessen eine herausragend wichtige Rolle. Zum einen hält sie die Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Antigenen aufrecht und verhindert so Autoimmunerkrankungen; zum anderen trägt sie auch zur Entstehung und Aufrechterhaltung von inflammatorischen und malignen Prozessen bei (Gobert *et al.* 2009, Rapp *et al.* 2019).

### 1.2.1 Das Chemokin CCL22

CCL22 wurde 1977 erstmalig unter dem Namen *macrophage-derived chemokine* (MDC) beschrieben (Godiska *et al.* 1997). Wenig später wurden dendritische Zellen (DC) als die Hauptproduzenten von CCL22 erkannt und der Name der einheitlichen Nomenklatur angepasst (Kanazawa *et al.* 1999). Humanes CCL22 besteht aus 69 Aminosäuren und zeigt 83% Übereinstimmung mit seinem murinen Pendant (Mantovani *et al.* 2000, Schaniel *et al.* 1998). Hohe Konzentrationen von CCL22 finden sich im Thymus, Lymphknoten, Milz und an Orten mit entzündlicher Aktivität (Galli *et al.* 2000, Vulcano *et al.* 2001). CCL22 steuert abhängig vom Aktivierungszustand des Immunsystems die Reifung und Verteilung von Immunzellen. Unter homöostatischen Bedingungen trägt CCL22 maßgeblich zur Aufrechterhaltung der Immuntoleranz bei, indem es in Lymphknoten Zell-Zell-Kontakte zwischen DCs und CCR4<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (Tregs) fördert, was autoreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterdrückt (Montane *et al.* 2011, Rapp *et al.* 2019, Vitali *et al.* 2012). Demgegenüber steht die Rolle von CCL22 während inflammatorischen Prozessen, bei denen CCR4<sup>+</sup> Th2-Zellen zum Ort der Entzündung gelangen, was die Immunreaktion aufrecht erhält (Matsukawa *et al.* 2000, Richter *et al.* 2014, Yamashita *et al.* 2002, Yanai *et al.* 2007). Ein gegenläufiger Effekt ist die ausgelöste Migration von CCL22 auf CCR4<sup>+</sup> Tregs, um überschießenden Gewebeschaden zu verhindern (Montane *et al.* 2011). Darüber hinaus spielt CCL22 eine wichtige Rolle in der Tumorummunologie. Hohe intratumorale CCL22-Spiegel wurden für eine Vielzahl von Tumoren nachgewiesen (Ghia *et al.* 2001, Gobert *et al.* 2009, Ishida *et al.* 2006, Kuehnemuth *et al.* 2018, Mizukami *et al.* 2008, Wågsäter *et al.* 2008, Wertel *et al.* 2015). CCL22 kommt hier eine Schlüsselrolle zu, indem es durch seine immunsuppressive Wirkung eine suffiziente Immunantwort verhindern kann. Tumore nutzen diesen Mechanismus, um gezielt Tregs anzureichern, die lokal eine effektive antitumorale T-Zell-Antwort verhindern, indem sie CCL22 entweder direkt sezernieren (Li *et al.* 2013), oder indirekt über Interleukine (Wang *et al.* 2019, Wiedemann *et al.* 2016) in DCs und Makrophagen induzieren, was oftmals mit einem verschlechterten Gesamtüberleben einhergeht (Fu *et al.* 2007, Liyanage *et al.* 2002, Sasada *et al.* 2003). An CCL22-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Eliminierung von CCL22 bei Tumorerkrankungen zu einer verbesserten Immunantwort und verlängertem Überleben im Tiermodell führt. Gleichzeitig waren diese Tiere jedoch auch anfälliger in einem Modell für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Rapp *et al.* 2019).

CCL22 ist ein Substrat der Exopeptidase DPP4, die ubiquitär im menschlichen Körper zu finden ist (Mortier *et al.* 2016). Das Enzym spaltet je zwei Aminosäuren vom N-

Terminus diverser Chemokine ab und kann so deren biologische Aktivität verändern. Aus der 69-Aminosäuren langen Peptidkette von CCL22 entstehen so die veränderten Chemokine (3-69)CCL22, (5-69)CCL22, (7-69)CCL22 und (9-69)CCL22 (Vulcano *et al.* 2001). Der genaue Zweck der Spaltung ist bis heute umstritten. Einige Autoren vermuten, dass die Spaltung der Regulierung und Inaktivierung von CCL22 dient, da die verkürzten Moleküle keine agonistischen Effekte mehr bei CCR4 zeigen (Mantovani *et al.* 2000, Struyf *et al.* 1998). Andere vermuten einen bisher unbekanntem Rezeptor für CCL22 oder (3-69)CCL22 und verweisen auf die veränderten biologischen Eigenschaften des Moleküls (Struyf *et al.* 1998).

Neben CCR4 bindet CCL22 noch an den atypischen Chemokinrezeptor ACKR2. Es wird vermutet, dass dadurch die Wirkung von CCL22 limitiert wird. Nach der Bindung wird CCL22 rasch durch Rezeptorinternalisierung dem Kreislauf entzogen.

#### 1.2.2 Der CC-Chemokin-Rezeptor 4

CCR4 gehört wie alle klassischen Chemokinrezeptoren zur Gruppe der G-Proteingekoppelten Rezeptoren und kann nach Aktivierung gerichtete Migration auslösen (Faustino *et al.* 2013). Unter homöostatischen Bedingungen exprimieren in erster Linie regulatorische T-Zellen CCR4, was der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz dient. Daneben findet sich CCR4 auch auf Thymozyten, aktivierten T- und B-Zellen, sowie aktivierten NK-Zellen und Makrophagen (Annunziato *et al.* 2000, Imai *et al.* 1999, Inngjerdigen *et al.* 2000, Yoshie *et al.* 2015). Neben CCL22 ist auch CCL17 ein Agonist von CCR4, wobei beide Chemokine ausschließlich CCR4 aktivieren und CCR4 keine weiteren bekannten Bindungspartner hat (Yoshie *et al.* 2015). Die Bindung eines Liganden an CCR4 führt zum Calciumeinstrom und Rezeptorinternalisierung, was eine zeitlich-begrenzte Desensibilisierung des Rezeptors auslöst. CCL22 ist im Vergleich zu CCL17 der potentere Induktor von Migration, Calciumeinstrom und Rezeptorinternalisierung. Es ist davon auszugehen, dass beide Liganden sequenziell wirken und somit Immunzellen über CCL17 aus dem Blut über Endothelzellen rekrutiert werden und anschließend anhand eines CCL22-Gradienten zum Ort der Entzündung gelangen (Mariani *et al.* 2004, Vestergaard *et al.* 2000).

#### 1.2.3 Die klinische Bedeutung der CCR4-CCL22-Achse

Die CCR4-CCL22-Achse hat Einfluss auf die Prävention, Entstehung und Aufrechterhaltung vieler Krankheiten (Li *et al.* 2012, Traeger *et al.* 2008, Vijayanand *et*

al. 2010). Über Antagonisten und Antikörper gegen CCL22 oder CCR4 kann gerichtete Migration moduliert, oder CCR4<sup>+</sup> Zellen direkt depletiert werden. Grundlegend ist dabei die vorwiegende Expression von CCR4<sup>+</sup> auf Th2-Zellen, Tregs und diversen Tumorzellen, sowie die oftmals erhöhte CCL22-Konzentration im Tumormikromilieu.

Eine Ansatzmöglichkeit in der Tumorthherapie ist die Rezeptorblockade von CCR4 über Antikörper oder *small molecules*, wodurch CCR4<sup>+</sup> Zellen an der Migration gehindert, oder über Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität abgetötet werden. Zum einen werden so direkt CCR4<sup>+</sup> Tumorzellen abgetötet, während zusätzlich eine Immunstimulation über gleichzeitige Treg-Depletion ausgelöst wird (Sugiyama *et al.* 2013). Die Treg-Depletion kann allerdings mit dem Risiko therapielimitierender und teilweise lebensgefährlicher Nebenwirkungen einhergehen (Dai *et al.* 2018, Ifuku *et al.* 2015, Moore *et al.* 2020). Auch Tumore nutzen Chemokinrezeptoren zur Migration (Müller *et al.* 2001). So befähigt die CCL22-CCR4-Achse Zellen des Magen- und Prostatakarzinoms zur Metastasierung und wurde daher als therapeutisches Ziel erkannt, um dem entgegenzuwirken (Cao *et al.* 2014, Maolake *et al.* 2017).

Eine weitere Modulationsmöglichkeit der CCL22-CCR4-Achse ist es, CCL22 zu antagonisieren, um die immunsuppressive Wirkung von CCL22 gezielt zu hemmen. Dieser Ansatz beruht auf der Feststellung, dass die CCL22-Konzentration in vielen Tumoren erhöht ist, was ein immunsuppressives Mikromilieu schafft (Curiel *et al.* 2004, Gobert *et al.* 2009, Mailloux *et al.* 2010, Mizukami *et al.* 2008, Wågsäter *et al.* 2008). Ein Grundprinzip der Tumorthherapie ist es, „kalte Tumoren“, in denen wenig Immunreaktion stattfindet, über eine Behandlung in „heiße Tumoren“ mit verbesserter Immunzellinvasion zu überführen (Galon *et al.* 2019). Die CCL22-CCR4-Achse steuert vor allem die Infiltration von CCR4<sup>+</sup> Treg, die einen immuninhibitorischen und tumorfördernden Effekt ausüben können (Nagarsheth *et al.* 2017). Durch Elimination von CCL22 ist es denkbar, die Infiltration dieser Zellen zu hemmen, was bestehende Tumorthapien durch eine verstärkte Immunantwort verbessern kann und gleichzeitig die Nebenwirkungen einer vollständigen Treg-Depletion umgeht (Rapp *et al.* 2019, Wiedemann *et al.* 2016). Erhöhte intratumorale CCL22-Konzentrationen können allerdings auch genutzt werden, um die Infiltration von zytotoxischen T-Zellen durch CCR4-Transduktion zu verbessern (Rapp *et al.* 2016).

#### 1.2.4 Hinweise auf einen weiteren, bisher unbekanntem Rezeptor für CCL22

Für CCL22 und CCL17 wurde bisher einzig CCR4 als Rezeptor identifiziert. Dennoch wird die Möglichkeit eines weiteren Rezeptors für CCL22 oder für dessen verkürzte

Abkömmlinge (3-69)CCL22 und (5-69)CCL22 weiter diskutiert. Hierfür gibt es mehrere Hinweise.

Trotz des gemeinsamen Rezeptors scheinen CCL17 und CCL22 in Teilen gegensätzliche Funktionen zu erfüllen. Im Rahmen eines Colitismodells zeigten CCL17-defiziente Mäuse (CCL17<sup>-/-</sup>) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren einen milderen Verlauf, während CCL22<sup>-/-</sup> Tiere deutlich stärker Colitiden entwickelten (Heiseke *et al.* 2012, Rapp *et al.* 2019). Struyf *et al.* postulieren mindestens einen weiteren Rezeptor für (3-69)CCL22, da dieses nicht an CCR4 bindet, jedoch einen deutlichen antiviralen Effekt auf HIV zeigt und in nahezu unverändertem Maße wie CCL22 Migration humaner CCR4-Monozyten auslöst (Struyf *et al.* 1998). CCL22 und CCL17 binden beide an CCR4, was neben einem Calciumeinstrom auch eine zeitlich begrenzte Desensibilisierung der Zellen auslöst. In Versuchen von Schaniel *et al.* sind aktivierte T-Zellen nach Inkubation mit CCL17 jedoch nicht vollständig für CCL22 desensibilisiert. Daraus schlussfolgern die Autoren, dass eine T-Zell-Subpopulation einen weiteren, unbekanntem Chemokinrezeptor exprimiert, der CCL22, aber nicht CCL17 bindet (Schaniel *et al.* 1999).

Die Hinweise auf einen weiteren Rezeptor stammen zum Großteil aus älteren Veröffentlichungen und müssen mit dem heutigen Wissen über die CCR4-CCL22-CCL17-Achse diskutiert werden. Dennoch konnte die Frage nach einem weiteren Rezeptor bisher nicht abschließend geklärt werden.

Die gut untersuchten Bindungseigenschaften von CCL22 und seinen Derivaten bieten sich daher an, um das APEX2 *Proximity Labeling* anhand dieser Achse zu validieren.

### 1.3 Verfahren zur Untersuchung von Ligandenbindung

Noch immer gibt es einzelne Chemokine und Rezeptoren, deren Bindungspartner unbekannt sind, oder zu denen weitere Interaktionspartner vermutet werden. Zur Beantwortung dieser Fragen steht eine Vielzahl bereits gut etablierter Methoden zur Auswahl. Diese weisen unterschiedliche Vor- und Nachteile auf und nicht eine einzelne Methode kann als „die beste“ angesehen werden. Die Wahl sollte daher von der zu beantwortenden Fragestellung abhängig gemacht werden.

In dieser Arbeit werden dem APEX2 *Proximity Labeling* vier häufig verwendete Methoden gegenübergestellt und deren Merkmale beleuchtet. Neben den vorgestellten Methoden gibt es beispielsweise mit dem *virtual screening* noch weitere Möglichkeiten Liganden-Rezeptor-Interaktionen zu untersuchen. Da hier allerdings eine bekannte

Kristallstruktur der Chemokinrezeptoren Voraussetzung ist und diese Daten nur von wenigen Chemokinrezeptoren vorliegen, wird das *virtual screening* hier nicht näher diskutiert (Arimont *et al.* 2019, Arimont *et al.* 2017).

### 1.3.1 FRET (Förster-Resonanzenergietransfer)

Basierend auf dem von Theodor Förster beschriebenen Grundprinzip, können Protein-Protein-Interaktionen durch den Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) bestimmt werden, indem enge räumliche Nähe zweier Proteine ein fluoreszierendes Signal auslöst (Förster *et al.* 1948). Hierbei müssen zuvor zwei Proteine, deren Interaktion untersucht werden soll, an je ein geeignetes Fluorochrom gekoppelt werden, wobei das Emissionsspektrum des Donors genannten Fluorochroms im Absorptionsspektrum des anderen liegt, welches als Akzeptor dient (Bajar *et al.* 2016, Marosvölgyi *et al.* 2013). Als Vorteil kann die sehr enge räumliche Nähe von maximal 10 nm angesehen werden, die zum Auftreten von FRET notwendig ist und unspezifische Signale vermindert. Zu berücksichtigen ist, dass die Fusion der Fluorochrome an Ligand und Rezeptor eine mögliche Beeinträchtigung der Bindungseigenschaften hervorrufen kann.

Tabelle 1 **Eigenschaften des Förster-Resonanzenergietransfers**

Vorteile	Nachteile
FRET tritt bei räumlicher Nähe der Fluorochrome von < 10 nm auf, was unspezifische Signale reduziert und für eine tatsächliche Proteininteraktion spricht.	Voraussetzung von Klonierungs- und Validierungsuntersuchungen.
Auswertung über FACS oder Konfokalmikroskopie möglich.	Möglicher Einfluss der gekoppelten Fluorochrome auf Bindungseigenschaften.
Die Interaktion der Proteine kann zeitlich aufgelöst untersucht werden. Das Signal entsteht zum Zeitpunkt der Interaktion.	Es kann nur ein Fluorochrom-gekoppelter Rezeptor auf Interaktion mit dem Liganden untersucht werden. Dies macht FRET eher als Validierungs- anstatt <i>Screening</i> -Methode denkbar.
	Anfälligkeit für <i>Photobleaching</i> .

### 1.3.2 Radioliganden-Bindungstest

Radioliganden-Bindungstests sind eine weit verbreitete Methode und gehören zu den Standardverfahren, um Liganden für GPCRs zu identifizieren (Flanagan *et al.* 2016). Die Bindung eines radioaktiv-markierten Liganden kann über die Messung seiner elektromagnetischen Strahlung detektiert werden. Eine Vielzahl an <sup>125</sup>Iod-markierten Chemokinen sind kommerziell erhältlich (Daugherty *et al.* 2000, Maguire *et al.* 2012). Ein

möglicher Versuchsaufbau zur Identifizierung neuer Bindungspartner wäre es,  $^{125}\text{I}$ -markiertes Chemokin mit Zellen, die den zu untersuchenden Rezeptor exprimieren, zu inkubieren. Nach mehreren Waschschritten, durch die die ungebundenen Liganden eliminiert werden, bleiben lediglich die gebundenen Chemokine übrig, deren  $\gamma$ -Strahlung gemessen werden kann. Eine Stärke der Methode ist, neben der einfachen Durchführbarkeit, die hohe Sensitivität. Bei der Suche nach bisher unbekanntem Rezeptoren ist allerdings zu beachten, dass hier nicht der Rezeptor selbst markiert wird und so nur zuvor festgelegte Rezeptoren untersucht werden können.

Tabelle 2 **Eigenschaften des Radioliganden-Bindungstest**

Vorteile	Nachteile
Es kann mit Zellmembranen, Zelllinien und primären Zellen gearbeitet werden	Es werden radioaktiv-markierte Liganden benötigt, deren Bindungseigenschaften abweichen können (Flanagan <i>et al.</i> 2016).
Im Vergleich zu nicht-radioaktiven Methoden ist der Radioliganden-Bindungstest sehr sensitiv und einfach durchführbar (de Jong <i>et al.</i> 2005).	Der gebundene Rezeptor wird nicht direkt markiert, was seine anschließende Identifizierung erschweren kann.
Die Methode kann weitgehend automatisiert ablaufen, wodurch eine hohe Zahl von Rezeptoren getestet werden kann (Flanagan <i>et al.</i> 2016).	Durch alternative Verfahren sind Gefahren im Umgang mit Radioliganden vermeidbar.
Es können quantitative Aussagen über Bindungseigenschaften wie $\text{EC}_{50}$ oder $K_d$ eines Liganden gemacht werden (Flanagan <i>et al.</i> 2016).	Eine eventuell stattfindende Rezeptorinternalisierung kann das Messergebnis verfälschen.

### 1.3.3 Co-Immunpräzipitation

Ein Standardverfahren zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen ist die Co-Immunpräzipitation. Hierbei wird von einem bekannten Protein ausgegangen, dessen Interaktionspartner identifiziert werden sollen. Mittels Antikörpern, die gegen das Ausgangsprotein gerichtet sind, kann dieses inklusive seiner Bindungspartner isoliert und analysiert werden (Lin *et al.* 2017). Dieses Verfahren findet bereits Anwendung bei der Identifizierung von Chemokinrezeptor-Dimeren (Bennett *et al.* 2011, Sibley *et al.* 2005). Übertragen auf die Fragestellung nach Bindungen zwischen Chemokinen und deren Rezeptoren, muss zunächst ein geeigneter Antikörper gefunden werden, der die Interaktion möglichst nicht beeinträchtigt. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass weder Ligand noch Rezeptor in ihrer Aminosäuresequenz verändert werden müssen. Zu beachten ist, dass sich die Bindungseigenschaften von Rezeptoren durch die Lyse der

Zellmembran so verändern können, dass keine Ligandenbindung mehr möglich ist (Sibley *et al.* 2005). Die Co-Immünpräzipitation findet an dieser Stelle Erwähnung, da sie als ein Standardverfahren hier zwar an gewisse Grenzen stößt, aber das APEX2 *Proximity Labeling* eine ähnliche Herangehensweise nutzt und die „Schwächen“ der Co-Immünpräzipitation ausgleichen kann.

Tabelle 3 **Eigenschaften der Co-Immünpräzipitation**

Vorteile	Nachteile
Kein Einfluss durch Fusionsproteine, da rekombinante Chemokine verwendet werden können.	Die Zellyse und Löslichkeit der GPCR hat großen Einfluss auf das Versuchsergebnis und geht bei membrangebundenen Proteinen oft mit Hindernissen einher.
Gelingt die Isolation eines Chemokin-Rezeptor Bindungspaares, ließen sich so auch bisher unbekannte Rezeptoren identifizieren.	Voraussetzung geeigneter Antikörper ohne Beeinflussung der Chemokin-Rezeptor-Interaktion.
	Schwache, nicht-kovalente Bindung nachteilig bei notwendigen Waschschrritten.
	Obligate Zellyse schränkt Auswertungsmöglichkeiten ein.

### 1.3.4 Messung des Calciumeinstroms

Die meisten Chemokine lösen über die Bindung an GPCRs den Phosphatidylinositol-Signalweg aus, wodurch sich die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht. (Dixit *et al.* 2012, Sozzani *et al.* 1993) Dieser Anstieg lässt sich über fluoreszierende Calciumindikatoren detektieren. Nach Inkubation einer zu untersuchenden Zelllinie mit einem Calciumindikator wie beispielsweise Fluo-4 und Zugabe des zu untersuchenden Liganden ist bei ausgelöstem Calcium-Einstrom eine Änderung der Fluoreszenz zu messen. Diese lässt sich anschließend durch FACS, Konfokalmikroskopie oder mittels Mikroplattenleser messen (Gee *et al.* 2000, Van Hout *et al.* 2017). Ein großer Vorteil dieser Methode ist es, dass der Ligand nicht molekularbiologisch verändert werden muss. Wichtig zu bedenken ist, dass nicht bestimmt wird, über welchen Rezeptor der Calciumeinstrom ausgelöst wird. Es ist außerdem möglich, dass einzelne Chemokine auch ohne Calciumeinstrom wirken (Curnock *et al.* 2002).

Tabelle 4 **Eigenschaften der Calciumeinstrom-Messung**

Vorteile	Nachteile
Unveränderte Bindungseigenschaften des Liganden und Rezeptors.	Nur Messung des Calciumeinstroms. Keine Identifikation des Rezeptors.
Schnelle Durchführbarkeit und geringer Materialaufwand.	Calciuminflux kann trotz Bindung ausbleiben. z.B.: (partieller) Antagonist

### 1.3.5 APEX2 *Proximity Labeling*

*Proximity Labeling* beschreibt eine Methode, mit der Interaktions- und Bindungspartner eines Proteins untersucht werden können. Das Grundprinzip besteht darin, ein Protein, dessen Interaktionspartner bestimmt werden sollen, mit einem geeigneten *Labeling*-Enzym wie APEX2 zu fusionieren. Das Labeling-Enzym katalysiert eine Reaktion, durch die Proteine in seiner unmittelbaren räumlichen Nähe kovalent markiert werden. Die genetisch modifizierte Ascorbatperoxidase 2 (APEX2) ist ein 28 kDA großes Enzym, das speziell für die Anwendung des *Proximity Labelings* weiterentwickelt wurde und durch gerichtete Evolution aus dem Vorgänger APEX entstanden ist. APEX2 wurde aus 10<sup>6</sup> mutierten APEX-Varianten ausgewählt und unterscheidet sich durch eine Aminosäure von APEX (A134P). Dadurch wurden Verbesserungen der katalytischen Aktivität und Stabilität erreicht (Lam *et al.* 2015). APEX2 katalysiert als Peroxidase die Oxidation von Biotinphenol, was ultra-kurzlebige (< 1 ms) Biotinphenol-Radikale erzeugt, die kovalente Bindungen zu Proteinen in der nahen Umgebung eingehen können (Lam *et al.* 2015). Die Biotinylierung kann anschließend über Streptavidin detektiert und genutzt werden. Somit ist eine Vielzahl von Methoden zur Auswertung, wie beispielsweise Fluoreszenzmikroskopie, FACS oder Westernblot, möglich. Die biotinylierten Proteine können über Westernblot oder Massenspektrometrie identifiziert werden (Rhee *et al.* 2013). Neben dem hauptsächlichen Einsatz im Intrazellularraum wurde APEX2 bereits extrazellulär eingesetzt und dabei an Parathormon gekoppelt, um den Parathormon-Rezeptor zu detektieren (Charest-Morin *et al.* 2017). Daneben wurde APEX2 bereits mit dem Cas13-Enzym fusioniert, um über CRISPR/CAS RNA-assoziierte Proteine zu identifizieren (Han *et al.* 2020, Lu *et al.* 2022) und genutzt, um die Mechanismen einer *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) Infektion zu untersuchen (V'kovski *et al.* 2020). Hierfür wurden unter anderem APEX2-gekoppelte *virus-like particles* (VLPs) genutzt (Plescia *et al.* 2020). Die Einsatzmöglichkeiten von *Proximity Labeling* sind dabei nicht nur auf den *in vitro* Einsatz beschränkt. Das

Verfahren wurde bereits *in vivo* an Mäusen in einem Tumor-Xenograft Modell (Dingar *et al.* 2015) und an neuronalen Synapsen (Uezu *et al.* 2016) eingesetzt.

Tabelle 5 **Eigenschaften des APEX2 Proximity Labelings**

Vorteile	Nachteile
Eignung zur Identifizierung zuvor unbekannter Bindungspartner.	Zunächst Klonierung der Fusionsproteine notwendig
Vielzahl möglicher Methoden zur Auswertung einer Bindung (FACS, IHC, Westernblot)	Möglichkeit veränderter Bindungseigenschaften aufgrund der Fusion.
Die kovalente Biotinylierung stellt eine robuste Bindung dar, die Waschschritte und Temperaturunterschiede überdauert.	Hintergrundsignal durch endogen biotinyliertes Protein (Erdmann <i>et al.</i> 2015).
Untersuchung auf Einzelzellebene, als auch im Hochdurchsatzverfahren möglich.	Individuelle Anpassungen in der Versuchsdurchführung für jeweilige Anwendungen notwendig.

## 1.4 Fragestellung

Chemokine und ihre Rezeptoren bilden ein komplexes Kommunikationsnetzwerk, das unser Immunsystem reguliert. Erkenntnisse über Chemokin-Rezeptor-Interaktion können einen wichtigen Beitrag zum Verständnis pathophysiologischer Prozesse und zu möglichen Therapieansätzen leisten. Das *APEX2 Proximity Labeling* stellt eine neuartige Methode dar, um Bindungspartner von Chemokinen zu identifizieren. Bisher fand dieses Verfahren nahezu ausschließlich intrazellulär Anwendung und wurde noch nicht zur Identifizierung von Chemokinrezeptoren eingesetzt.

Zentrale Fragestellungen dieser Arbeit sind:

1. Beeinträchtigt die Fusion von APEX2 mit Chemokinen deren Bindungseigenschaften?
2. Kann das *APEX2 Proximity Labeling* extrazellulär zur Identifizierung von Chemokinrezeptoren angewandt werden?
3. Ist es möglich ein Rezeptor-*Screening* zu etablieren, mit dem eine Vielzahl von Chemokinrezeptoren auf ihre Bindung zu Fusionsproteinen untersucht werden kann? Kann dabei für CCL22 oder seine Abkömmlinge ein neuer, bisher unbekannter Rezeptor identifiziert werden?
4. Welche Vor- und Nachteile bringt das *APEX2 Proximity Labeling* im Vergleich zu bestehenden Verfahren?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 6 **Geräte**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmenstandort</b>
<b>12-Tube Magnetic Separation Rack</b>	Cell Signalling Technology	Danvers, USA
<b>Biologische Sicherheitswerkbank Klasse 2, HERAsafe KS Serie</b>	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, USA
<b>Chemidoc Imaging System</b>	Bio-Rad Laboratories	Hercules, USA
<b>Durchflusszytometer FACS Fortessa</b>	BD Biosciences	New Jersey, USA
<b>Durchflusszytometer FACS Canto II</b>	BD Biosciences	New Jersey, USA
<b>Feinwaage ENTRIS224-1S</b>	Sartorius	Göttingen, Deutschland
<b>Fujifilm LAS4000</b>	Fujifilm	Tokyo, Japan
<b>Gefrierbehälter <i>Mr. Frosty</i></b>	Thermo Fischer Scientific	Waltham, USA
<b>Gel Imager Alphamager HP</b>	Alpha Innotec	Kassendorf, Deutschland
<b>GeneTouch Thermal Cycler</b>	Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>Konfokalmikroskop Leica tcs sp5</b>	Leica Microsystems	Wetzlar, Deutschland
<b>Kühlschrank -80°C HERAfreeze HFU T Series</b>	Heraeus, ThermoFischerScientific	Massachusetts, USA
<b>Lichtmikroskop Axiovert 40C</b>	Carl Zeiss Microscopy	Oberkochen, Deutschland
<b>Magnetrührer RH BASIC 2</b>	IKA	Staufen, Germany
<b>Mikroplattenleser Mithras Ib 940</b>	Berthold Technologies	Bad Wildbad, Deutschland
<b>Mini Trans-Blot Cell</b>	Bio-Rad Laboratories	Hercules, USA
<b>Multifuge 3L-R, X3 and 4KR</b>	Heraeus, Thermo Fischer Scientific	Waltham, USA
<b>Nanodrop 2000c</b>	Thermo Fischer Scientific	Waltham, USA
<b>neoLab-Orbital Shaker</b>	neoLab Migge	Heidelberg, Deutschland
<b>Neubauer-Zählkammer</b>	MTG GmbH	Bruckberg, Deutschland
<b>Pipetten Research plus</b>	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
<b>Pipetus</b>	Hirschmann	Eberstadt, Deutschland
<b>PowerPac™ Universal Power Supply</b>	Bio-Rad Laboratories	Hercules, USA

<b>Rotationsmischer Cellmixer CMV</b>	Laborgeräte München	München, Deutschland
<b>Sprout Minizentrifuge</b>	Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>Taumelrollenmischer RM 5</b>	Ingenieurbüro CAT M.Zipperer GmbH	Ballrechten-Dottingen, Deutschland
<b>Thermomixer comfort</b>	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
<b>Thermoshaker Innova44</b>	New Brunswick Scientific, Eppendorf	Hamburg, Deutschland
<b>Vortex Mixer RS-VA 10</b>	Phoenix Instrument GmbH	Garbsen, Deutschland
<b>Zentrifuge Rotina 420R</b>	Hettich GmbH	Tuttlingen, Deutschland

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7 **Verbrauchsmaterialien**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
<b>12-well Zellkulturplatte</b>	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
<b>24-well Zellkulturplatte</b>	Corning	Corning, USA
<b>96-well Platte Schwarz Brandplates</b>	Brand	Wertheim
<b>96-well u-bottom Tissue Culture Plates</b>	Corning	Corning, USA
<b>96-well-Platte schwarz</b>	ThermoFischerScientific	Waltham, USA
<b>Adhäsionsobjektträger SuperFrost Plus</b>	ThermoFischerScientific	Waltham, USA
<b>Deckgläser, rund 22mm</b>	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
<b>Filter 0,45 <math>\mu\text{m}</math> Millex HA Filter unit</b>	Merck Millipore	Burlington, USA
<b>Handschuhe Vasco Nitril</b>	B. Braun	Melsungen, Deutschland
<b>konische Zentrifugenröhrchen, 50 ml</b>	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA
<b>Kryoröhrchen Greiner Bio-One Cryo.s</b>	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
<b>Migrationsplatten 96-well 3<math>\mu\text{m}</math> / 5 <math>\mu\text{m}</math> Transwell</b>	Corning	Corning, USA
<b>Multistepper Pipettenspitzen</b>	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
<b>PVDF Membran 0,45 <math>\mu\text{m}</math> Immobilon</b>	Merck Millipore	Burlington, USA
<b>Spritzen 5 ml</b>	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA
<b>Stripetten 25ml, 10ml, 5ml</b>	Corning	Corning, USA
<b>Westernblot Filterpapier</b>	Bio-Rad Laboratories	Hercules, USA

<b>Zellkulturflasche 75 cm<sup>2</sup>, 175 cm<sup>2</sup></b>	Corning	Corning, USA
<b>Zellkulturschalen Cellstar 10 cm</b>	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
<b>Zellschaber 16 cm</b>	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland

## 2.1.3 Reagenzien und Kits

Tabelle 8 Reagenzien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
<b>Ammoniumchlorid</b>	Merck	Darmstadt, Deutschland
<b>Ampicillin</b>	ThermoFischerScientific	Waltham, USA
<b>BamHI Endonuclease</b>	New England Biolabs	Ipswich, USA
<b>Biotin-Phenol</b>	Iris Biotech	Marktredwitz, Deutschland
<b>Borsäure</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>Bovines Serum Albumin (BSA)</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>CHAPS</b>	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
<b>Compensation Beads OneComp eBeads</b>	ThermoFischerScientific	Waltham, USA
<b>Compensation Beads UltraComp eBeads</b>	ThermoFischerScientific	Waltham, USA
<b>cOmplete Protease Inhibitor Cocktail</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>CountBright Absolute Counting Beads</b>	ThermoFischerScientific	Waltham, USA
<b>Cutsmart Puffer</b>	New England Biolabs	Ipswich, USA
<b>Deoxynucleotide (dNTP) Solution Set</b>	New England Biolabs	Ipswich, USA
<b>DH5alpha competent cells</b>	ThermoFischerScientific	Waltham, USA
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>DNA-Gel Loading Dye</b>	ThermoFischerScientific	Waltham, USA
<b>DNA Ligase T4 20X</b>	New England Biolabs	Ipswich, USA
<b>DNA Ligase T4 Puffer 10X</b>	New England Biolabs	Ipswich, USA
<b>EDTA</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>FACSFlow, FACSClean</b>	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
<b>Formaldehyd 4% ROTI-Histofix</b>	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
<b>Glycerin</b>	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland

<b>Glycin</b>	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
<b>Ionomycin</b>	ThermoFischerScientific	Waltham, USA
<b>Isofluran</b>	Abbott	Zug, Schweiz
<b>Isopropanol</b>	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
<b>Kaliumchlorid</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>Kaliumhydrogencarbonat</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>LB-Bouillon</b>	ThermoFischerScientific	Waltham, USA
<b>Methanol</b>	Merck	Darmstadt, Deutschland
<b>Milchpulver</b>	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
<b>Milchpulver, blotting grade</b>	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
<b>Mounting medium Vectashield DAPI</b>	Vector Laboratories	Burlingame, USA
<b>NaCl 0,9 % Ecotainer</b>	B. Braun	Melsungen, Deutschland
<b>Nagellack</b>	L'Oréal	Clichy, Frankreich
<b>Natriumascorbat</b>	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumazid</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>Natriumchlorid</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>Natriumdesoxycholat</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>Natriumphosphat</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>NotI Endonuclease</b>	New England Biolabs	Ipswich, USA
<b>Orange G</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa</b>	ThermoFischerScientific	Waltham, USA
<b>PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa</b>	ThermoFischerScientific	Waltham, USA
<b>Phosphate Buffered Saline (PBS)</b>	Lonza	Basel, Schweiz
<b>Pierce Streptavidin magnetic beads</b>	ThermoFischerScientific	Waltham, USA
<b>PMA</b>	ThermoFischerScientific	Waltham, USA
<b>Q5 High-Fidelity DNA Polymerase</b>	New England Biolabs	Ipswich, USA
<b>Q5 Reaction Buffer Pack</b>	New England Biolabs	Ipswich, USA
<b>RetroNectin</b>	Takara Bio	Kusatsu, Japan
<b>SDS / Natriumlaurylsulfat</b>	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
<b>Skalpell</b>	Feather Safety Razor	Osaka, Japan

<b>Streptavidin-HRP</b>	Research And Diagnostic Systems	Minneapolis, USA
<b>Tetramethylethyldiamin (TEMED)</b>	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
<b>Trichlorethanol</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>TRIS</b>	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
<b>TRIS-Hydrochlorid</b>	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
<b>Triton X 100</b>	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
<b>Trolox</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>Trypan-Blau</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>Tween 20</b>	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
<b>Wasserstoffperoxid 30%</b>	Merck	Darmstadt, Deutschland

Tabelle 9 Kits

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
<b>CCL17 ELISA murin</b>	ThermoFischerScientific	Waltham, USA
<b>CCL22 ELISA murin</b>	Research and Diagnostic Systems	Minneapolis, MN, USA
<b>Chemilumineszenz-Substrat West Femto</b>	ThermoFischerScientific	Waltham, USA
<b>DC Protein Assay Kit</b>	Bio-Rad Laboratories	Hercules, USA
<b>DNA Clean &amp; Concentrator-5</b>	Zymo Research	Irvine, USA
<b>GeneJuice Transfection Reagent</b>	Merck	Darmstadt, Deutschland
<b>Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit</b>	New England Biolabs	Ipswich, USA
<b>Sequenzierungskit Mix2Seq Kit NightXpress</b>	Eurofins Genomics	Konstanz, Deutschland
<b>Zymoclean Gel DNA Recovery Kit</b>	Zymo Research	Irvine, USA
<b>ZymoPURE II Plasmid Maxiprep</b>	Zymo Research	Irvine, USA

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, mit ddH<sub>2</sub>O hergestellt. Der angegebene pH wurde bei allen Puffern und Lösungen durch die Zugabe von NaOH oder HCL erreicht. Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 8 aufgelistet. Die Zusammensetzung der Puffer ist bei den jeweiligen Methoden angegeben.

## 2.1.5 Zellkultur

Tabelle 10 **Medienzusätze**

Name	Hersteller	Standort
<b>Blasticidin</b>	InvivoGen	California, USA
<b><i>Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)</i></b>	Lonza	Basel, Schweiz
<b><i>Fetal calf serum (FCS)</i></b>	ThermoFischerScientific	Waltham, USA
<b>G418</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>HEPES 1M</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>L-Glutamin 200mM</b>	PAA	Pasching, Österreich
<b><i>Non-essential amino acids (NEAA, 100x)</i></b>	Gibco Products	Grand Island, USA
<b>Penicillin/Streptomycin (100x)</b>	PAA	Pasching, Österreich
<b>Puromycin</b>	InvivoGen	California, USA
<b><i>Roswell Park Memory Institute (RPMI)</i></b>	Lonza	Basel, Schweiz
<b>Trypsin 10X</b>	PAA	Steinheim, Deutschland

Tabelle 11 **Zellkulturmedien**

Medium	Zusammensetzung	Medium	Zusammensetzung
<b>RPMI 3+</b> B3Z	RPMI 10 % FCS 2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	<b>DMEM 5+</b> Plat-E	DMEM 10% FBS 2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin Puromycin Blasticidin
<b>Kryokonservierungs-Medium</b>		90 % FCS 10 % DMSO	
<b>DMEM 3+</b> Expi293F	DMEM 10 % FCS 2mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	<b>Migrationsmedium</b> primäre Zellen, B3Z	RPMI 5 % FCS 2mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

## 2.1.6 Zelllinien

Tabelle 12 Zelllinien

Name	Eigenschaft	Medium	Herkunft
<b>B3Z</b>	Murines CD8+ T-Zell-Hybridom semi-adhären	RPMI 3+	Professor Nilabh Shastri (University of California, Berkeley, USA)
<b>Expi293F</b>	Produktions-Zelllinie Humane embryotische Nierenzelllinie adhären	DMEM 3+	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA
<b>Plat-E</b>	Verpackungszelllinie zur retroviralen Transduktion Humane embryotische Nierenzelllinie adhären	DMEM 3+	American Type Culture Collection, Manassas, USA

## 2.1.7 Antikörper und Farbstoffe

Tabelle 13 FACS-Färbungen

Name	Klon / Produktnummer	Hersteller	Standort
<b>Anti-mouse CCR4</b>	Klon 2G12	Biologend	San Diego, USA
<b>Anti-mouse CD3</b>	Klon 17A2	Biologend	San Diego, USA
<b>Anti-mouse CD4</b>	Klon GK1.5	Biologend	San Diego, USA
<b>eBioscience Cell Proliferation Dye eFluor 450</b>	65-0842-85	ThermoFischerScientific	Waltham, USA
<b>Fixable Viability Kit</b>	423102	Biologend	San Diego, USA
<b>Streptavidin-PE</b>	405204	Biologend	San Diego, USA

Tabelle 14 Antikörper für Westernblot und Immunhistochemie

Name	Klon / Produktnummer	Hersteller	Standort
<b>Anti-FLAG (DYKDDDDK)</b>	8146T	Cell Signalling Technology	Danvers, USA
<b>Anti-GFP</b>	2956T	Cell Signalling Technology	Danvers, USA
<b>Anti-HA</b>	10768600 Klon 3F10	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>Anti-mouse IgG-HRP</b>	sc-2005	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA
<b>Anti-rabbit IgG-HRP</b>	sc-2004 sc-2357	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA

<b>Anti-rat IgG-HRP</b>	sc-2006	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA
<b>Anti-sheep-HRP</b>	HAF016	Research And Diagnostic Systems	Minneapolis, USA
<b>Beta-Actin-HRP</b>	sc-47778	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA
<b>Streptavidin-PE</b>	405204	Biolegend	San Diego, USA

## 2.1.8 Primer und Plasmide

<b>mCCL22_APEX2</b>	CCL22_For_NotI	5' ATTGCGGCCGCCACCATGGCTACCCTGC 3'
	CCL22_GSG_Rev_NotI	5' ATTGCGGCCGCAGAACCACCACCACCGGACAGTTTATGGAG 3'
	3-69/5-69 CCL22_rev mutagenesis	5' TGCATCAGAGGTCTGAATTG 3'
	3-69 CCL22_for mutagenesis	5' TATGGTGCCAATGTGGAAG 3'
	5-69 CCL22_for mutagenesis	5' GCCAATGTGGAAGACAGTATC 3'
<b>mCCL17_APEX2</b>	CCL17_for	5' ATGAAGACCTTCACCTCAGC 3'
	CCL17_rev	5' TCATGGCCTTGGGTTTTTC 3'
	CCL17_Not_for	5' ATTGCGGCCGCCACCATGAAGACCTTCACCTC 3'
	CCL17_Not_rev	5' ATTGCGGCCGCAGAACCACCACCACCTGGCCTTGGGTTT 3'
<b>Kontroll-APEX2</b>	CCL22_APEX_mut_for	5' CAGAGGTCTGAATTGCCACAG 3'
	CCL22_APEX_mut_rev	5' GGTGGTGGTGGTTCTGC 3'
<b>CCR4-HA</b>	mCCR4_BamHI_for	5' ATTAGGATCCGCCACCATGAATGCCACAGAGG 3'
	mCCR4_HA_NotI_rev	5' ATGCGGCCGCTAAGCGTAATCTG GAACATCGTATGGGTACAAAGCGTCACGGAAG 3'
<b>Plasmide</b>	APEX2	pcDNA3 APEX2-NES (Addgene, Watertown, USA)
	CCR4	pmXs-puro (Bruno Cadilha, Klinische Pharmakologie, München) pmp71-CCR4 (Bruno Cadilha, Klinische Pharmakologie, München)

## 2.1.9 Software

Tabelle 15 **Software**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
<b>EndNote</b>	Clarivate Analytics	Philadelphia, USA
<b>FlowJo</b>	FlowJo	Ashland, USA
<b>Image Lab</b>	Bio-Rad Laboratories	Hercules, USA
<b>Keynote</b>	Apple	Cupertino, USA
<b>Leica LAS AF</b>	Leica	Wetzlar, Deutschland
<b>Microsoft Office</b>	Microsoft	Redmond, USA
<b>Prism 8</b>	Graphpad	La Jolla, USA
<b>SnapGene</b>	GSL Biotech	Chicago, USA
<b>TMcalculator</b>	New England Biolabs	Ipswich, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

Die Zellkultur erfolgte bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 % CO<sub>2</sub>-Anteil Luftgemisch in Inkubatoren. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen in dem jeweiligen Medium (s. Tabelle 11) kultiviert. Die Arbeit mit Zellen geschah, sofern nicht anders angegeben, unter sterilen Bedingungen unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank. Zur Passage oder Aussaat wurden B3Z-Zellen mittels Zellschaber mechanisch aus den Zellkulturflaschen abgelöst und zunächst bei 400 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss konnte durch Zählung mit der gewünschten Zellzahl weiterverfahren werden. Adhärente Zellen wurden durch Inkubation mit einer Trypsinlösung bei 37 °C für 3 Minuten vom Flaschenboden abgelöst. Zuvor wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen vorsichtig mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) gewaschen. Die Inkubation wurde durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt und die Zellen bei 400 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und durch Zellkulturmedium ersetzt.

#### **Trypsinlösung**

- 1 x Trypsin in PBS

### 2.2.1.1 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Ermittlung der vorliegenden Zellzahl wurde durch die Trypanblau-Ausschlussfärbung erreicht. Hierbei wird eine Zellsuspension mit Trypanblau inkubiert und anschließend in der Neubauer-Zählkammer mäanderförmig ausgezählt. Der Farbstoff dringt in Zellen mit gestörter Membranintegrität ein und führt so zu einer Blaufärbung. Zellen mit intakter Membran nehmen den Farbstoff nicht auf und erscheinen unter dem Lichtmikroskop weiterhin hell. Somit lässt sich die Anzahl vitaler Zellen in einer Flüssigkeit bestimmen. Nachdem 10  $\mu\text{l}$  einer Zellsuspension mit 90  $\mu\text{l}$  Trypanblau inkubiert wurden, errechnet sich nach Auszählen von vier Großquadraten die Zahl vitaler Zellen pro Milliliter wie folgt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{n_{\text{Zellen}}}{n_{\text{Großquadrate}}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Zählkammerfaktor} \times \text{Umrechnungsfaktor}$$

Verdünnungsfaktor = 10, Zählkammerfaktor = 10, Umrechnungsfaktor  $\mu\text{l}$  in ml =  $10^3$

### 2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Bei der Arbeit mit immortalisierten Zelllinien ist zu bedenken, dass sich die Zellbiologie durch hohe Mitoseraten verändern kann. Daher ist die Kryokonservierung und das regelmäßige Verwerfen von Zellen mit hoher Passagezahl wichtig, um vergleichbare Versuchsbedingungen zu gewährleisten. Zur Konservierung wurde eine geeignete Zellzahl in Kryokonservierungs-Medium aufgenommen und in Kryoröhrchen mit Hilfe des *Mr. Frosty* Gefrierbehälters bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die langfristige Konservierung der Zelllinien wurden diese bei  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Stickstoff-Flüssigtank aufbewahrt. Auftaut wurden die Zellen durch rasche Resuspension in Zellkulturmedium und anschließendes Zentrifugieren bei  $400 \times g$  für 5 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Um avitale Zellen auszuwaschen, wurde das Zellkulturmedium 24 Stunden nach diesem Prozess gewechselt.

#### **Kryokonservierungs-Medium**

- 10 % DMSO in FCS

### 2.2.1.3 Mykoplasmentest

Die Zelllinien wurden durch eine Mitarbeiterin mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf eine Kontamination mit Mykoplasmen getestet. Bei den verwendeten Zelllinien wurde eine Kontamination mit den im Labor üblicherweise auftretenden Spezies ausgeschlossen.

#### 2.2.1.4 Generierung von konditioniertem Medium

Um konditioniertes Medium (CM) von transfizierten und untransfizierten Expi293F zu erhalten, wurden je 200.000 Expi293F pro Milliliter DMEM 3+ in Zellkulturflaschen ausgesät und über 72 Stunden inkubiert. Das Medium wurde anschließend abgenommen, bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die Konzentration der enthaltenen APEX2-Fusionsproteine wurde durch einen CCL22 oder CCL17 ELISA bestimmt und durch Verdünnung mit CM untransfizierter Expi293F bei Bedarf angeglichen. Dadurch ließen sich Stammlösungen mit hohen Konzentrationen von APEX2-Fusionsproteinen von bis zu 1500 ng/ml erreichen. Die Stammlösungen wurden auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei – 80 °C bis zur Verwendung gelagert. Die Konzentration von Kontroll-APEX2 kann nicht direkt durch ELISA bestimmt werden. Nach analoger Aussaat der Kontroll-APEX2-sezernierenden Zellen, wurde die Konzentration dieser Fusionsproteine im Überstand mithilfe des FLAG-Westernblots angenähert.

#### 2.2.1.5 Migrationsversuche

Um das Migrationsverhalten von Zellen auf unterschiedliche Chemokingradienten zu untersuchen, wurden Versuche in sterilen Migrationsplatten durchgeführt. Darin trennt eine Membran, mit einer bestimmten Porengröße, zwei Kammern voneinander. Für die B3Z-Zelllinie wurden Poren der Größe 3 µm verwendet. In die obere Kammer wurden je 1 x 10<sup>5</sup> B3Z in 70 µl Migrationsmedium pipettiert. In der unteren Kammer befand sich 225 µl Migrationsmedium mit einer definierten Konzentration von Chemokin oder Fusionsprotein zwischen 0 und 100 ng/ml. Die Migrationsplatten wurden anschließend für vier Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit befanden sich migrierte Zellen in der unteren Kammer, die in eine 96-well Platte überführt wurden. Die Platte wurde bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert und der Zellüberstand verworfen. Anschließend wurden die Konditionen in 97 µl PBS mit 3 µl *counting beads* aufgenommen und im Durchflusszytometer ausgewertet. Durch Analyse der gemessenen Zellzahl und Anzahl an *counting beads* wurde die absolute Anzahl an migrierten Zellen pro Kondition auf folgende Art für jede Kondition einzeln ermittelt:

$$\frac{n_{im\ FACS\ gemessene\ beads}}{n_{in\ 3\ \mu l\ befindliche\ beads}} = \chi$$

$$Gesamtzahl\ migrierter\ Zellen = \frac{n_{im\ FACS\ gemessene\ Zellen}}{\chi}$$

### 2.2.2 Tierzucht und -haltung

C57Bl/6-Mäuse wurden von Janvier Labs (Le Genest Saint Isle, Frankreich) bezogen. Zum Zeitpunkt der Lieferung hatten die Tiere ein Alter zwischen sechs und zehn Wochen. Es wurden Tiere beider Geschlechter verwendet. CCR4 <sup>-/-</sup> Tiere stammten aus eigener Zucht. Die Tierhaltung erfolgte nach SPF-Hygienerichtlinien (*Specific-Pathogen-Free*). Organentnahmen wurden zuvor durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

### 2.2.3 Gewinnung von primären murinen Zellen

Die Tötung der Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation unter Isofluran-Anästhesie. Nach Entnahme von Milz, Lymphknoten oder Thymus wurden unter sterilen Bedingungen mit Hilfe von 30  $\mu\text{m}$  Zellsieben Einzelzellsuspensionen hergestellt und diese durch dreiminütige Inkubation mit Erythrozytenlysepuffer behandelt. Anschließend wurden die Zellen gezählt und in RPMI 5+ kultiviert, oder darin auf Eis gelagert. Verwendet wurden die Zellen für Biotinylierungsversuche oder nach Antikörperfärbung zur Analyse im Durchflusszytometer.

#### **Erythrozytenlysepuffer**

- 0,15 M Ammoniumchlorid
- 1,0 mM Kaliumhydrogencarbonat
- 0,1 mM EDTA
- pH 7,2

### 2.2.4 Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren

#### 2.2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation und Erweiterung von DNA-Abschnitten wurde die Polymerase-Kettenreaktion angewandt. Hierfür wurde folgender 50  $\mu\text{l}$  Ansatz verwendet.

- 2 – 4  $\mu\text{g}$  DNA *template*
- Je 0,2  $\mu\text{M}$  *Primer*
- 2  $\mu\text{l}$  dNTPs
- 0,5  $\mu\text{l}$  Q5 Polymerase
- 10  $\mu\text{l}$  Q5 Puffer 5X
- ddH<sub>2</sub>O

Die Reaktion lief unter zuvor, durch den *TMcalculator*, bestimmten Temperaturzyklen in einem Thermocycler ab. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die Bande mit korrekter Größe isoliert. Nach Purifikation der DNA-Bande wurde die Konzentration mit dem *Nanodrop* ermittelt.

#### 2.2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente oder Plasmide anhand ihrer Molekülgröße separiert. Es konnten somit Klonierungsvorgänge überprüft, oder die aufgetrennten DNA-Fragmente isoliert und weiterverarbeitet werden. Es wurde hierfür ein 0,5 – 1,5 %iges Agarosegel in 150ml TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) mit 3,57  $\mu$ l Orange G hergestellt. Aus den DNA-Lösungen wurde durch eine entsprechende Menge 6 x *Loading Dye* eine 1 x Verdünnung hergestellt und anschließend die Gel-Taschen beladen, sodass nach Anlegen einer Spannung von 80 - 120 V die negativ geladenen DNA-Moleküle aufgetrennt wurden. Als Laufpuffer diente 1 x TBE-Puffer. Die DNA-Banden wurden im *ChemiDoc* unter UV-Licht sichtbar und bei Bedarf durch ein steriles Skalpell ausgeschnitten und nach Herstellerangaben mit dem *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* eluiert.

<b>TBE-Puffer</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 90 mM TRIS Base</li><li>• 90 mM Borsäure</li><li>• 2 mM EDTA</li></ul>
<b>Agarose-Gel</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 0,5 – 1 % Agarose in TBE-Puffer</li></ul>

#### 2.2.4.3 Klonierung

Durch Klonierungsprozesse wurde DNA erzeugt, die für die APEX2-Fusionsproteine oder Chemokin-Rezeptoren kodiert. Ausgehend von murinen Splenozyten wurde CCL22- oder CCL17-mRNA isoliert und über eine Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) in cDNA umgeschrieben. Für Klonierungen an CCR4 diente das Plasmid pmp71-CCR4 als Ausgang. Durch geeignete *Primer* (s. 2.1.8 Primer und Plasmide) und nachfolgende PCR, bzw. Mutagenese wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme (NotI oder BamHI) eingefügt und die DNA in das zuvor geschnittene Vector-Plasmid pcDNA3 APEX2-NES oder pmXs-puro eingebracht. Nach Transformation in DH5alpha Bakterien und Selektion durch eine vermittelte Ampicillin-Resistenz wurde das Plasmid über eine Bakterienkultur auf 100  $\mu$ g/ml Ampicillin-haltigen LB-Agarose-Platten bei 37 °C vermehrt und anschließend isoliert. Die DNA-Sequenz wurde extern mittels Sequenzierungsverfahren überprüft (Eurofins Genomics, Konstanz, Deutschland).

#### 2.2.4.4 Restriktionsverdau

Um DNA-Fragmente oder Plasmide zu schneiden, wurden die Restriktionsenzyme NotI oder BamHI eingesetzt. Zum Restriktionsverdau wurde der folgende 50  $\mu$ l Ansatz verwendet und bei 37 °C für 3 h inkubiert.

- 1  $\mu$ g DNA
- 5  $\mu$ l *Cutsmart*-Puffer 10X
- Jeweils 10 *units* Restriktionsenzym
- ddH<sub>2</sub>O

Im Anschluss wurde die DNA mit dem *Zymoclean Gel DNA-Recovery* Kit aufgereinigt.

#### 2.2.4.5 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit einem 5:1 Molekülverhältnis (*Insert* zu Plasmid) über Nacht bei 16 °C in folgendem 20  $\mu$ l Ansatz durchgeführt.

- *Insert*
- Plasmid
- 1  $\mu$ l DNA Ligase T4 20X
- 2  $\mu$ l Ligase Puffer 10X
- ddH<sub>2</sub>O

Im Anschluss wurde die Ligation über eine Gelelektrophorese überprüft und die DNA eluiert.

#### 2.2.4.6 Mutagenese

Für die Klonierung der trunkierten APEX2-Fusionsproteine, sowie die des Kontroll-Konstruktes wurde ausgehend vom CCL22\_APEX2-kodierenden Plasmid das *Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit* nach Herstellerangaben angewandt. Mit den in 2.1.8 aufgeführten *Primern* wurde die CCL22-kodierende Sequenz so entsprechend gekürzt. Anschließend erfolgte zur Erfolgskontrolle eine externe Sequenzierung der Plasmide.

#### 2.2.4.7 DNA-Transformation von Bakterienkultur

Die durch Klonierungsvorgänge erstellte, ringförmige DNA wurde mit Hilfe von Bakterienkulturen vermehrt. Hierfür wurden *E. coli* Bakterien des Stammes DH5-Alpha aus einem -80 °C Gefrierschrank in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 5 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurde 1  $\mu$ l einer 50 ng/ $\mu$ l DNA-Lösung den Bakterien zugegeben und resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien einem

90-sekündigen Hitze-Schock bei 42 °C im Heizblock ausgesetzt. Es folgte eine 2-minütige Inkubation auf Eis, wonach dem Reaktionsgefäß 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikazusatz zugefügt wurde. Anschließend wurden die Bakterien bei 37 °C für eine Stunde im Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend mithilfe einer 100 µg/ml Ampicillin-haltigen LB-Agarose-Platte ausgestrichen und bei 37 °C im Inkubator selektiert. Am Folgetag konnte eine Bakterienkultur über die Inkubation bei 37 °C im Schüttelkolben mit 250 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium vermehrt werden. Die somit vermehrte DNA konnte im Anschluss mithilfe des *ZymoPURE II Plasmid Maxiprep Kits* nach Herstellerangaben isoliert werden.

**LB-Selektionsmedium**

- 100 µg/ml Ampicillin in LB-Medium

#### 2.2.4.8 Transfektion von Zelllinien

Um DNA in eukaryotische Zellen wie die Expi293F Zelllinie einzubringen, wurde die Transfektion mit Hilfe des *GeneJuice Transfection Reagent* nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die verwendeten Plasmide vermittelten hierbei eine Resistenz gegen G418. Im Anschluss an die Transfektion wurden die Plasmid-tragenden Zellen durch Inkubation über 7 Tage G418-haltigem Medium selektioniert.

**Selektionsmedium Transfektion**

- Expi293F Medium
- 500 µg/ml G418

#### 2.2.4.9 Lentivirale Transduktion von Zelllinien

Zum Erreichen einer stabilen Proteinüberexpression wurden Zellen der B3Z-Zelllinie durch lentivirale Transduktion behandelt. Hierfür wurde ein viertägiges Protokoll angewandt, welches mit der Aussaat von Plat-E-Zellen im 6-well begann. 1,2 Millionen Zellen wurden hierfür in 1 ml DMEM 3+ Medium ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert, bis eine 70 % Konfluenz erreicht wurde. Am Folgetag wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 150 µl einer DNA-Lösung erstellt, die 15 µl eines 250 mM Calciumchlorid-Puffers, 18 µg der einzusetzenden DNA und ddH<sub>2</sub>O enthielt. In ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 150 µl Transfektions-Puffer wurde unter ständigem Mischen mittels Vortex Mixers die DNA-Lösung tröpfchenweise zugegeben und anschließend 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die 300 µl Lösung auf die Plat-E im 6-well pipettiert und 6 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium vorsichtig entnommen und durch 3 ml DMEM 3+ ersetzt. Es folgte eine Inkubation über 42 h. Am dritten Tag wurden RetroNectin-Platten vorbereitet, welche am Folgetag zur

Transduktion benötigt wurden. Hierfür wurden 24-well Platten mit 400  $\mu$ l einer 12,5  $\mu$ g/ml RetroNectin-Lösung gefüllt und bei 4 °C abgedeckt über Nacht inkubiert. Das RetroNectin wurde am Folgetag durch 500  $\mu$ l *Blocking*-Puffer ersetzt und die 24-well Platte anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Waschen der 24-well Platte mit PBS wurde das Plat-E-Medium mittels 5 ml Spritze abgenommen, durch ein 45  $\mu$ m Sieb steril gefiltert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. 1 ml des Virus-enthaltenden Plat-E-Zellüberstandes wurde in das gewaschene 24-well überführt und bei 3000 x g für 120 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium im 24-well durch 1 ml eines Zellgemisches mit 10.000 untransduzierten B3Z ersetzt, sowie bei 800 x g für 30 min bei 32 °C zentrifugiert und anschließend im Brutschrank inkubiert. In den folgenden Tagen wurden die transduzierten B3Z zunächst in das 6-well-Format und anschließend in eine Zellkulturflasche überführt. Die Transduktionseffizienz ließ sich bei den verwendeten Konstrukten per FACS durch die Expression von GFP bestimmen. Bei Bedarf konnten durch FACS-*sorting* nach GFP eine 100 % Reinheit an transduzierten Zellen erreicht werden.

#### **Transfektions-Puffer**

- 1,6 g Natriumchlorid
- 74 mg Kaliumchlorid
- 50 mg Natriumphosphat
- 1 g HEPES
- 100 ml ddH<sub>2</sub>O
- pH 6,76
- Reinigung mittels 20  $\mu$ m Filter

#### **Calciumchlorid-Puffer (2,5 M)**

- 2,7 mg Calciumchlorid
- 10 ml ddH<sub>2</sub>O
- Reinigung mittels 20  $\mu$ m Filter

#### ***Blocking*-Puffer Transduktion**

- 0,1 g BSA
- 5 ml autoklaviertes ddH<sub>2</sub>O
- Reinigung mittels 20  $\mu$ m Filter

### 2.2.5 Proteinchemische Methoden

#### 2.2.5.1 Gewinnung von Zelllysate

Zur Herstellung von Zelllysate wurden zunächst 10<sup>6</sup> B3Z im 6-well, beziehungsweise 10<sup>7</sup> B3Z in einer 10 cm Petrischale ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach erfolgter Biotinylierungsreaktion wurden die verbleibenden adhärennten Zellen mit einem Zellschaber gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einmaligem Waschen mit PBS und Zentrifugation bei 400 x g für 5 min wurde der Überstand abgenommen und das Zell-Pellet in 100-1000  $\mu$ l RIPA-Puffer gelöst. Mit Hilfe des Vortex

Mixers wurde das Pellet mechanisch gelöst und anschließend für 30 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß bei 4 °C und 17.000 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es konnte mit der Bestimmung der Proteinkonzentration weiterverfahren werden.

**RIPA-Puffer**

- 150 mM Natriumchlorid
- 1,0% Triton X-100
- 0,5% Natriumdesoxycholat
- 0,1% SDS
- 50 mM TRIS, pH 8,0
- 1% CHAPS
- Protease-Inhibitor

#### 2.2.5.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde mit Hilfe des *DC Protein Assay* von Bio-Rad nach Herstellerangaben und photometrischer Messung am Mikroplattenleser bestimmt.

#### 2.2.5.3 Western Blot

Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte auf Grundlage der Methode von Laemmli (Laemmli *et al.* 1970) mit Hilfe des Western Blot Systems von Bio-Rad. In Abhängigkeit von der zu untersuchenden Proteingröße wurden 10-12 % Polacrylamid-Gele verwendet. Bis zur vollständigen Polymerisation des Trenngels wurde dieses in der Gel-Kammer mit Isopropanol beschichtet. Anschließend wurde der Alkohol entfernt und durch das Sammelgel ersetzt. Zur Probenvorbereitung wurde ein definiertes Volumen Expi293F-Zellüberstand, oder eine definierte Proteinmenge zwischen 10 und 50  $\mu\text{g}$  mit der entsprechenden Menge 4 x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Proteine, die durch einen Streptavidin-Pulldown gewonnen wurden, sind durch Erhitzen der magnetischen Streptavidin-Beads mit 1 x Laemmli-Puffer über 5 min bei 95 °C isoliert worden. Die Proben durchliefen das Sammel- und Trenngel im *Running-Puffer* durch das Anlegen einer Spannung von 120 V. Als *Ladder* wurden dabei je 10  $\mu\text{l}$  *PageRuler Plus Prestained* oder *PageRuler Prestained* verwendet.

<b>Gel</b>	<b>Trenngel 10 %</b>	<b>Trenngel 12 %</b>	<b>Sammelgel 5 %</b>
ddH <sub>2</sub> O	4,1 ml	6,8 ml	2,26 ml
30 % Acrylamid	3,3 ml	4 ml	680 $\mu$ l
1,5 M TRIS HCL	2,5 ml	2,5 ml	1 ml
10 % APS	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	40 $\mu$ l
TMED	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l
0,5 % TriChlor EtOH	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	

**1,5 M TRIS HCL**

- 181,65 g TRIS Base
- 1 g SDS
- pH 8,8
- Gesamtvolumen 1 L

**0,5 M TRIS HCL**

- 60,55 g TRIS Base
- 1 g SDS
- 0,1 g Bromphenolblau
- pH 6,8
- Gesamtvolumen 1 L

**4 x Laemmli-Puffer**

- 0,25 M TRIS/HCL pH 6,8
- 8 % SDS
- 40 % Glycerol
- 0,01 % Bromphenolblau
- 10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

**Running-Puffer**

- 25 mM TRIS base
- 190 mM Glycin
- 0,1 % SDS
- pH 8,3

Vor dem Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) wurde das Polyacrylamid-Gel innerhalb des *Chemidoc* mit UV-Licht bestrahlt. Das im Trenngel enthaltene Trichlorethanol reagiert unter UV-Licht mit den Tryptophanresten der Proteine. Diese Methode wurde zur semiquantitativen Bestimmung der Proteinmenge und zur Ladungskontrolle verwendet. Alternativ konnte über einen  $\beta$ -Actin-Antikörper die Ladungskontrolle durchgeführt werden. Der Proteintransfer wurde nach dem „*Wet-Blotting*“-Verfahren bei einer Stromstärke von 350 mA für 60 min im Transfer-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde die PVDF-Membran mit Hilfe eines Schüttlers über eine Stunde im entsprechenden Blocking-Puffer inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper oder Streptavidin-HRP im jeweiligen Blocking-Puffer bei 4 °C über Nacht auf einem Taumelrollenmischer. Nach mehrmaligem

Waschen mit TBST fand bei Anwendung eines sekundären Antikörpers die Inkubation mit diesem in TBST für eine Stunde bei Raumtemperatur statt. Nach dieser Zeit wurde die PVDF-Membran erneut mehrmals mit TBST gewaschen und anschließend im *ChemiDoc* durch Zugabe von Chemilumineszenz-Substrat ausgewertet.

<b>Transfer-Puffer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 25 mM TRIS-Base</li> <li>• 190 mM Glycin</li> <li>• 20 % Methanol</li> <li>• pH 8,3</li> </ul>
<b>TBST</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 mM TRIS</li> <li>• 150 mM NaCl</li> <li>• 0,1 % Tween 20</li> <li>• pH 7,6</li> </ul>
<b>Western Blot Blocking-Puffer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 % BSA TBST (FLAG-WB) in</li> <li>• 5 % Milchpulver in TBST (HA-WB, GFP-WB, Streptavidin-WB)</li> </ul>

#### 2.2.5.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Murine CCL17 und CCL22 ELISA Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet, um die Konzentration von Fusionsproteinen im Zellüberstand der Expi293F Zelllinie, oder Chemokinen in Lösung zu bestimmen. Laut Hersteller ist das CCL22 ELISA Kit explizit auch zur Detektion der trunkierten CCL22 Formen geeignet. Trotz Modifikation der Chemokine durch die Fusion mit APEX2, stellte sich die Methode ELISA als valide heraus.

<b>ELISA-Waschpuffer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,05% Tween20 in PBS</li> </ul>
<b>IFN-g ELISA Coating Buffer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,2M Natriumphosphat in pH 6,5/ pH 9,5</li> </ul>

#### 2.2.6 Bestimmung der APEX2-Enzymaktivität mittels Chemilumineszenz

In eine schwarze 96-well-Platte wurden Triplikate á 100  $\mu$ l einer 150 ng/ml APEX2-Lösung pipettiert. Die Lösung wurde zuvor durch Verdünnen einer APEX2-Stammlösung mit PBS erstellt und auf 37°C erwärmt. Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette wurden je 10  $\mu$ l eines Chemilumineszenz-Substrates zugegeben. Nach 25 min Inkubation bei RT im Dunkeln wurde der Versuch im Mikroplattenleser durch Messung der Lumineszenz über 1 Sekunde pro well ausgewertet. Als Positivkontrolle diente eine Kondition mit der hochaktiven Meerrettichperoxidase (HRP) anstelle von APEX2.

### 2.2.7 Allgemeines zur Biotinylierung

Die Peroxidase APEX2 katalysiert eine Reaktion, bei der nach Zugabe von Biotinphenol und  $\text{H}_2\text{O}_2$  Biotinphenol-Radikale entstehen. Im Allgemeinen lief die Biotinylierung ab, indem eine bestimmte Zellzahl mit einer definierten Konzentration APEX2-Fusionsproteinen für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert wurde. Damit nur gebundenes APEX2 zurückbleibt, wurde das APEX2-haltige Medium anschließend abgenommen und durch  $500 \mu\text{M}$  Biotinphenol (BP) in PBS ersetzt. Die Biotinphenollösung wurde zuvor durch Verdünnung mit PBS hergestellt und auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmt. Nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bis zur Endkonzentration von  $1 \text{ mM}$  lief die Biotinylierungsreaktion für  $1 - 3$  Minuten ab, ehe sie durch Quencher-Lösung 2X abgestoppt wurde. Die Zellen wurden insgesamt dreimal mit Quencher-Lösung 1X gewaschen und anschließend einmal in PBS. Durch eine Färbung mit Streptavidin wurden die Zellen für die Analyse am FACS oder Konfokalmikroskop vorbereitet, oder mittels RIPA-Puffer für einen Streptavidin-Pulldown oder die SDS-PAGE lysiert. Tabelle 16 zeigt für alle Versuche mit Biotinylierung die jeweilige Konfiguration.

<b>Biotinphenol 1000X</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>500 \text{ mM}</math> in DMSO</li> </ul>
<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math> 100X</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>100 \text{ mM}</math> in PBS</li> </ul>
<b>Quencher-Lösung 2X</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>20 \text{ mM}</math> Natriumazid</li> <li>• <math>20 \text{ mM}</math> Natriumascorbat</li> <li>• <math>10 \text{ mM}</math> Trolox</li> <li>• in PBS</li> </ul>
<b>RIPA-Puffer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>150 \text{ mM}</math> Natriumchlorid</li> <li>• <math>1,0\%</math> Triton X-100</li> <li>• <math>0,5\%</math> Natriumdesoxycholat</li> <li>• <math>0,1\%</math> SDS</li> <li>• <math>50 \text{ mM}</math> TRIS, pH 8.0</li> <li>• <math>1\%</math> CHAPS</li> <li>• Protease-Inhibitor</li> </ul>
<b>Reaktionsmedium</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>900 \mu\text{l}</math> PBS</li> <li>• <math>100 \mu\text{l}</math> Überstand der Expi293F-Zelllinie</li> <li>• <math>1 \text{ mM}</math> Biotinphenol in DMSO</li> </ul>

Tabelle 16 **Konditionen bei Versuchen mit Biotinylierung**

	<b>Zellen</b>	<b>APEX2</b>	<b>Inkubation</b>	<b>Waschen</b>	<b>H2O2 Inkubation</b>
<b>Streptavidin- Westernblot (Abb. 7)</b>	5 x 10 <sup>5</sup> B3Z im 6-well	siehe Abbildung in 1 ml	5 min, 37 °C	in 1 ml PBS	1 min in 1 ml
<b>Mikroskopie (Abb. 9)</b>	5 x 10 <sup>5</sup> B3Z im 12-well	150 ng/ml in 1 ml	5 min, 37 °C	in 1 ml PBS	3 min in 1 ml
<b>Streptavidin- Pulldown (Abb. 10)</b>	5 x 10 <sup>6</sup> B3Z im 6-well	150 ng/ml in 10 ml	5 min, 37 °C	in 10 ml PBS	1 min 10 ml
<b>B3Z-Zellgemisch (Abb. 11)</b>	je 5 x 10 <sup>5</sup> B3Z im 6-well	75 ng/ml in 2 ml	5 min, 37 °C	in 2 ml PBS	1 min in 1 ml
<b>Rezeptorscreening (Abb. 12, 13)</b>	1 x 10 <sup>6</sup> B3Z im 6-well	75 ng/ml in 2 ml	5 min, 37° C	in 2 ml PBS	1 min in 1 ml

### 2.2.8 Biotinylierung einer B3Z-Co-Kultur

Je 500.000 CCR4-überexprimierende B3Z wurden mit einer zweiten B3Z-Zelllinie, die einen anderen CCR überexprimiert, über Nacht im 6-well in 3 ml RPMI 3+ co-kultiviert. Zuvor wurde eine der beiden Zelllinien mit dem *eBioscience Cell Proliferation Dye eFluor 450* nach Herstellerangaben gefärbt. Am Folgetag wurde die Biotinylierungsreaktion wie oben beschrieben im 6-well mit CCL22-APEX2 und Kontroll-APEX2 durchgeführt. Durch anschließende Färbung mit Streptavidin (1:100 für 30 min, RT) wurde die Biotinylierung der Zellen, die sich durch die vorangegangene Färbung mit dem *Cell Proliferation Dye* weiterhin unterscheiden ließen, durch FACS analysiert.

### 2.2.9 Streptavidin-Pulldown

Je 5 x 10<sup>6</sup> B3Z-CCR4<sup>+</sup>-HA wurden wie in Tabelle 16 beschrieben behandelt und biotinyliert. Nach Lösen der Zellen mittels Zellschaber wurden diese in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet durch Zugabe von 125 µl RIPA-Puffer lysiert und der Proteingehalt bestimmt (siehe 2.2.5 *Proteinchemische Methoden*). Zum Streptavidin-Pulldown wurden pro Kondition 38 µl magnetische *Beads* eingesetzt, die laut Hersteller somit 20 µg biotinyliertes Protein

binden könnten. Dies entsprach 1/40 der eingesetzten Proteinmenge an Zelllysat. Dem Zelllysat wurden die Beads, sowie PBS bis zu einem Gesamtvolumen von 1 ml zugefügt und nach Herstellerprotokoll der *Pierce Streptavidin magnetic beads* weiterverfahen. Das an Streptavidin gebundene Protein wurde anschließend entweder durch Zugabe von Laemmli-Puffer 2X gelöst und per Westernblot analysiert.

#### 2.2.10 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting* – FACS) wurden Zellen und Beads gezählt, oder Zellen auf ihre Morphologie hin analysiert. Dabei wurden die Zellen teilweise zuvor durch Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluorochrom-markierte Antikörper gefärbt. Für die Analyse wurde eine Suspension aus einer geeigneten Zellzahl in FACS-Puffer hergestellt. Die extrazellulären Antikörper- oder Streptavidinfärbungen wurden in 100  $\mu$ l FACS-Puffer durchgeführt. Die Antikörper wurden dabei in unterschiedlichen Verhältnissen zum Gesamtvolumen der Zellsuspension zwischen 1:200 und 1:1000 verwendet. Die Inkubationszeit und -temperatur war dabei abhängig von der Antikörper- oder Streptavidinfärbung. Vor der Analyse wurden die Zellen einmal in FACS-Puffer durch Zentrifugation bei 400 x g, für 5 min bei 4 °C gewaschen. Avitale Zellen wurden durch Verwendung *Fixable Viability Kits* ausgeschlossen.

##### **FACS-Puffer**

- 2 % FCS in PBS

#### 2.2.11 Konfokalmikroskopie

Eine 12-well-Platte wurde mit Deckgläschen bestückt und jeweils  $5 \times 10^5$  B3Z-CCR4+ oder B3Z-UT in 1 ml RPMI 3+ ausgesät, um über Nacht bei 37 °C zu inkubieren und am Glas zu adhären. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Das PBS wurde entnommen und durch 1 ml APEX2 in PBS ersetzt. Darin enthalten waren 150 ng/ml CCL22-APEX2, beziehungsweise dieselbe Konzentration an Kontroll-APEX2 (s. Generierung von konditioniertem Medium). Nach der Inkubation wurde die Flüssigkeit abgenommen und einmal mit PBS gewaschen. Dieses wurde abgenommen und anschließend durch BP in PBS ersetzt. Nach Zugabe von  $H_2O_2$  lief die Biotinylierung über 3 Minuten ab. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit abgenommen und insgesamt dreimal mit je 3 ml Quencher-Lösung gewaschen. Für eine detaillierte Beschreibung der Biotinylierung siehe 2.2.8 *Allgemeines zur Biotinylierung*. Danach wurden die wells dreimal mit PBS gewaschen

und die Flüssigkeit wieder abgenommen. Durch die Zugabe von 2 ml 3 % Formaldehyd, für 10 min bei RT, wurden die Zellen fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit Streptavidin-PE 1:250 in Konfokal-Blocking-Puffer über 1 h bei RT gefärbt. Jedes well wurde dreimal mit PBS gewaschen. Das PBS wurde abgenommen und eine Permeabilisierung durch Zugabe von je 2 ml 0,1 % Triton X100 in PBS über 30 min bei RT erreicht. Die Färbung wurde mit Streptavidin-PE 1:250 in Konfokal-Blocking-Puffer durchgeführt, indem die Zellen erneut bei RT 1 h inkubierten. Es wurde dreimal mit PBS gewaschen und die Flüssigkeit komplett abgenommen. Die Deckgläschen wurden mit einer Pinzette entnommen und mit Hilfe eines Tropfen *Mounting-Mediums*, das bereits DAPI enthielt, auf einen Objektträger befördert. Befestigt wurden die Gläschen durch Nagellack. Bis zur Auswertung wurden die Proben unter Lichtausschluss bei RT gelagert. Am Konfokalmikroskop wurden die Signale von PE, DAPI und Durchlicht über die Methode des *sequential scans* aufgenommen. Aufgrund einer Gerätewartung war die Durchlichtaufnahme nicht bei allen Versuchswiederholungen möglich. Die Einzelaufnahmen wurden mit Hilfe der LAS Software übereinander gelagert.

**150 ng/ml APEX2**

- 900  $\mu$ l PBS
- 100  $\mu$ l Stammlösung APEX2 (1500 ng/ml)

**Konfokal-Blocking-Puffer**

- 5 % BSA in PBS

### 2.2.12 Statistische Analyse

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Versuche mindestens dreimal durchgeführt. Angaben zur angewandten statistischen Analyse finden sich unter den jeweiligen Abbildungen. P-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant betrachtet.

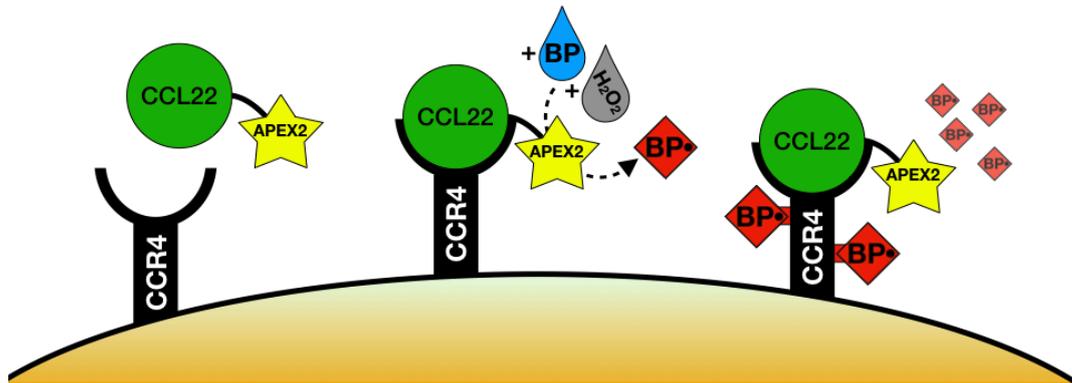
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Aufbau und Funktion der APEX2-Fusionsproteine

Das APEX2 *Proximity Labeling* System ermöglicht den Nachweis einer engen räumlichen Interaktion zwischen Proteinen. Es wurde speziell für die Anwendung Intrazellularraum entwickelt und kam bisher ausschließlich in diesem Bereich zum Einsatz. Die vorliegende Studie zielt darauf ab, ein System zu etablieren, durch das – ausgehend von einem Chemokin – auch extrazelluläre Chemokin-Rezeptor-Interaktionen an der Zellmembran charakterisiert werden können. Im Vergleich zu etablierten Methoden bietet das *Proximity Labeling* das Potential, auf diese Weise auch bisher unbekannte Rezeptoren zu identifizieren.

Zunächst ist es erforderlich, das zu untersuchende Chemokin, in diesem Fall CCL22, an APEX2 zu koppeln. Das Konstrukt CCL22-APEX2 wird durch Klonierung und anschließende Expression in einem geeigneten Zellsystem generiert und als CCL22-APEX2 Fusionsprotein bezeichnet. Durch die Bindung von CCL22-APEX2 an den Chemokinrezeptor CCR4, der sich auf der Zelloberfläche befindet, gelangt APEX2 in unmittelbare räumliche Nähe von CCR4, wodurch CCR4 biotinyliert wird. Biotinylierte Proteine können mittels Durchflusszytometrie, Western Blot oder Konfokalmikroskopie einfach identifiziert werden, wodurch die Bindung des Fusionsproteins nachgewiesen wird.

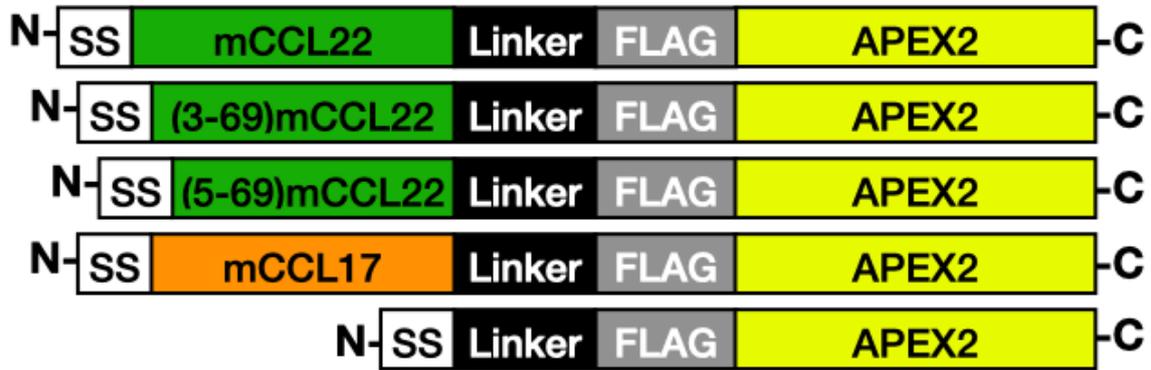
Abbildung 2 zeigt schematisch die Bindung eines CCL22-APEX2 Fusionsproteins an den Rezeptor CCR4. Durch die kontrollierte Zugabe von Biotinphenol und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, katalysiert APEX2 eine Reaktion, die in unmittelbarer Umgebung hochreaktive Biotinphenol-Radikale erzeugt. Diese sehr kurzlebigen Moleküle sind in der Lage, den Rezeptor kovalent zu biotinylieren.



**Abbildung 2: Konzept des *Proximity Labelings* am Beispiel der CCL22-CCR4 Achse.** Nach Bindung des APEX2-CCL22-Fusionsproteins an CCR4 gelangt APEX2 in räumliche Nähe zum Rezeptor. Durch die Zugabe von Biotinphenol (BP) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entstehen kurzlebige Biotinphenol-Radikale (BP•), die kovalent an CCR4 binden.

### 3.1.1 Generierung der APEX2-Konstrukte

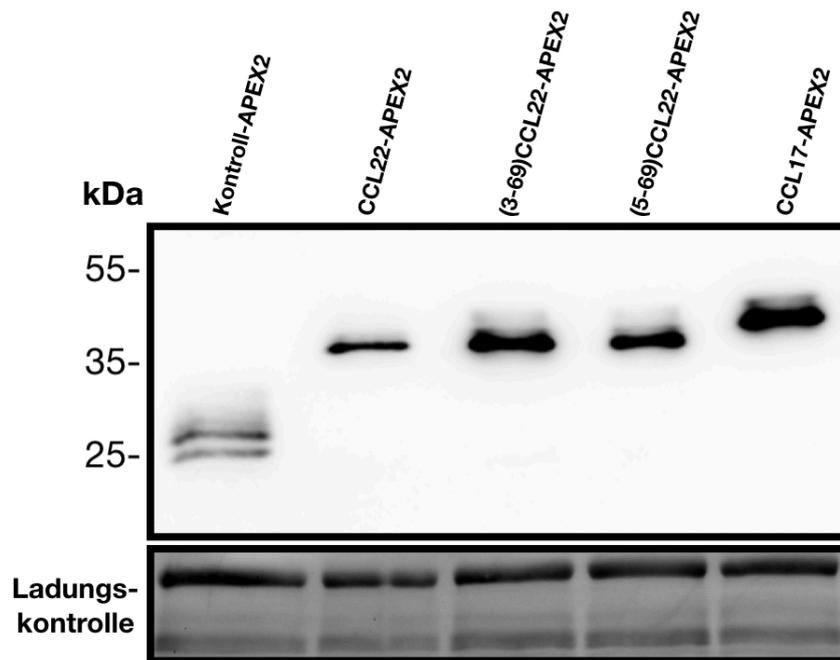
Durch gentechnische Methoden wurden Plasmide erstellt, die jeweils für ein Fusionsprotein aus Chemokine und APEX2 kodieren. Die durch DPP4 trankierten Formen von CCL22 wurden entsprechend der Aminosäureanzahl bei einfacher Spaltung (3-69)CCL22 und bei zweifacher Spaltung (5-69)CCL22 benannt. Da CCL22 und CCL17 über ihren N-Terminus an CCR4 binden, wurden die Fusionsproteine so konstruiert, dass dieser frei vorliegt und sich APEX2 am C-Terminus befindet. Ein zwischengeschalteter *Linker* hat die Funktion durch räumliche Distanz eine möglichst ungehinderte Faltung und Funktion von APEX2 zu gewährleisten. Um ausreichende und reproduzierbare Mengen an Fusionsproteinen zu erhalten, wurden mittels Transfektion und Selektion Expi293F-Zellen generiert, die die Plasmide stabil im Genom integriert tragen und eine konstante hohe Menge der Proteine in das Zellmedium sezernieren. Um das Fusionsprotein im Zellüberstand nachzuweisen, enthielt das jeweilige Plasmid einen FLAG-tag, der über einen Anti-FLAG-Antikörper detektiert werden kann. Ein weiteres Konstrukt diente als Kontrolle, indem lediglich die Signalsequenz, die der Sekretion der Proteine in das Zellkulturmedium dient, der APEX2-DNA vorgeschaltet war. Das Kontrollprotein bestand folglich ausschließlich aus dem APEX2-Protein, um unspezifische Bindungen aufzeigen zu können. Abbildung 3 zeigt schematisch den Aufbau der fünf Konstrukte.



**Abbildung 3: Aufbau und Klonierung der Fusionsproteine.** Dargestellt ist die schematische Gensequenz der unterschiedlichen Fusionsproteine vom N- zum C-Terminus. Verwendet wurde murines CCL22 und CCL17 (mCCL22, mCCL17), sowie die durch DPP4 trunkierten Formen von CCL22 (3-69, 5-69). Als Kontrolle diente eine DNA-Sequenz, welche lediglich die Signalsequenz (SS) enthielt, die wie bei den restlichen Konstrukten die Sekretion ermöglicht. Der *Linker* besteht aus der Aminosäuresequenz „GGGS“ und trennt somit Chemokin und APEX2 räumlich.

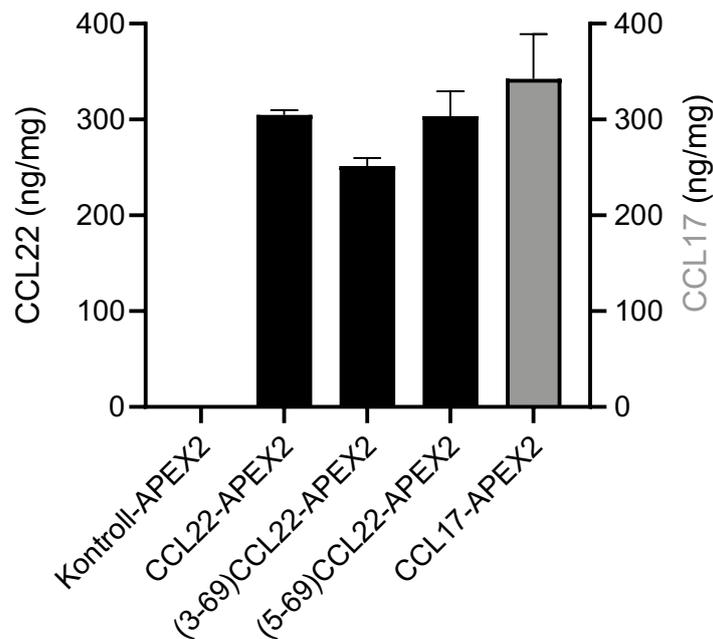
### 3.1.2 Expression der Fusionsproteine

Durch stabile Transfektion und Selektion der Expi293F wurden fünf Produktionszelllinien generiert, die je ein Konstrukt sezernierten. Durch FLAG-Westernblots mit konditioniertem Expi293F-Medium wurde die Expression und Sekretion der Fusionsproteine überprüft. Dabei wurde der im Fusionsprotein enthaltene FLAG-*tag* genutzt, um die Fusionsproteine im Zellüberstand zu detektieren. Abbildung 4 zeigt einen FLAG-Westernblot, auf dem die erwarteten Molekülgrößen und Unterschiede der Bandenhöhen zu sehen sind. Die Bandenintensität weist auf eine vergleichbare Sekretion der Produktionszelllinien hin. Die Bandenhöhe ist durch die unterschiedliche Aminosäurezahl der Fusionsproteine bedingt.



**Abbildung 4: FLAG-Westernblot des Zellüberstandes der Expi293-Zelllinien.** Konditioniertes Medium der fünf Produktionszelllinien wurde per SDS-PAGE aufgetrennt und ein FLAG-Westernblot durchgeführt. Die Ladungskontrolle zeigt einen Membranausschnitt mit unspezifischer Proteinfärbung mittels Trichlorethanol.

Da der FLAG-Westernblot über die Bandenintensität nur eine semiquantitative Aussage über die Sekretionsmenge der Fusionsproteine macht, wurde zur genauen Bestimmung der Konzentration der APEX2-Fusionsprotein im Zellüberstand, mit einem CCL22 bzw. CCL17 ELISA die Konzentration der jeweiligen Fusionsproteine quantifiziert. Die ELISA-Methode ist laut Hersteller auch geeignet, um die trunkierten Isoformen von CCL22 zu detektieren. Abbildung 5 zeigt das Ergebnis einer Messung.

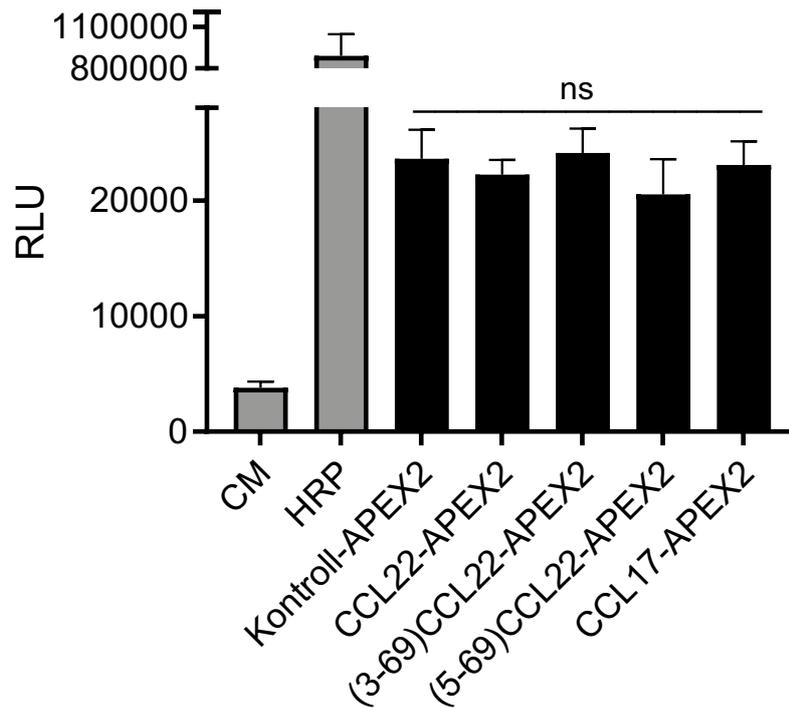


**Abbildung 5: CCL22 bzw. CCL17 ELISA von konditioniertem Medium der Expi293F Zelllinien.** Die Abbildung zeigt ein ausgewähltes Versuchsergebnis mit technischen Triplikaten. Gezeigt ist der Mittelwert, sowie die Standardabweichung (*Mean + SD*).

Nach Bestimmung der im Zellüberstand enthaltenen Konzentrationen an Fusionsprotein konnten diese durch Verdünnung mit konditioniertem Medium einer untransfizierten Expi293F-Zelllinie angeglichen werden. Da die Konzentration von Kontroll-APEX2 nicht direkt durch einen CCL22 ELISA bestimmt werden konnte, wurde die Vergleichbarkeit durch die Aussaat einer identischen Zellzahl von Expi293F und gleiche Inkubationsbedingungen erreicht. Durch FLAG-Westernblots wurde die vergleichbare Sekretion bestätigt (s. Abbildung 4)

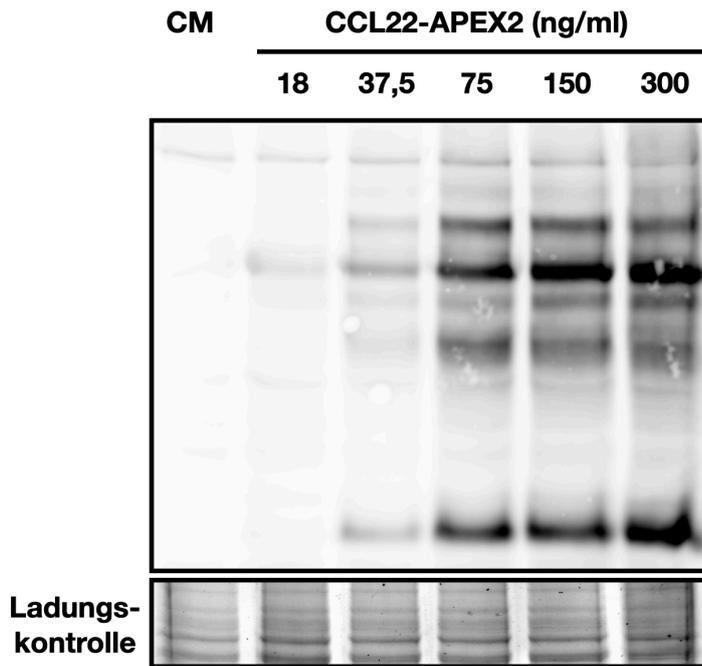
### 3.1.3 Funktionelle Validierung der Fusionsproteine

Als Folge der Fusion von zwei Proteinen kann es durch Interaktion der verlängerten Aminosäurekette zu Fehlfaltungen der einzelnen Bestandteile kommen. Dadurch können Proteine ihre ursprüngliche Funktion verlieren. Um die Peroxidase-Funktion von APEX2 zu überprüfen, wurde die Fähigkeit der Fusionsproteine getestet, ein Chemilumineszenz-Substrat umzusetzen. Hierfür wurden in eine 96-well-Platte gleiche Mengen von APEX2-Proteinen pipettiert und das emittierte Licht nach Zugabe von Substrat gemessen. Abbildung 6 zeigt, dass gleiche Konzentrationen an APEX2-Fusionsprotein jeweils vergleichbare Peroxidase-Aktivität aufweisen.



**Abbildung 6: Enzymaktivität der Fusionsproteine.** Zu einer verdünnten Lösung von Expi293F-Zellüberstand wurde Chemilumineszenz-Substrat zugesetzt und das emittierte Licht in relativen Licht-Units (RLU) mittels eines Mikroplattenlesers gemessen. Als Negativkontrolle diente konditioniertes Medium untransfizierter Expi293F. Als Positivkontrolle diente hochaktive Meerrettich-Peroxidase (HRP). Der Messwert wurde nach 25 Minuten Inkubation bei RT erhoben. Abgebildet ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten, sowie die Standardabweichung (*Mean + SD*). Die statistische Testung erfolgte durch die einfaktorielle Varianzanalyse. ns = nicht signifikant

Im nächsten Schritt wurden die Fusionsproteine zur Biotinylierung von CCR4-überexprimierenden Zellen angewandt, um dabei die erforderliche Menge an einzusetzendem Fusionsprotein zu bestimmen. Hierfür wurde die B3Z-CCR4<sup>+</sup>-Zelllinie mit unterschiedlichen Konzentrationen CCL22-APEX2 inkubiert und biotinyliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das Proteinlysate im Streptavidin-HRP-Westernblot auf Biotinylierung untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Biotinylierung und diese erfolgte APEX2-konzentrationsabhängig. Aufgrund der Sättigung der Bandenintensität bei hohen Konzentrationen wurde fortan mit APEX2-Konzentrationen zwischen 25 und 150 ng/ml weiterverfahren.

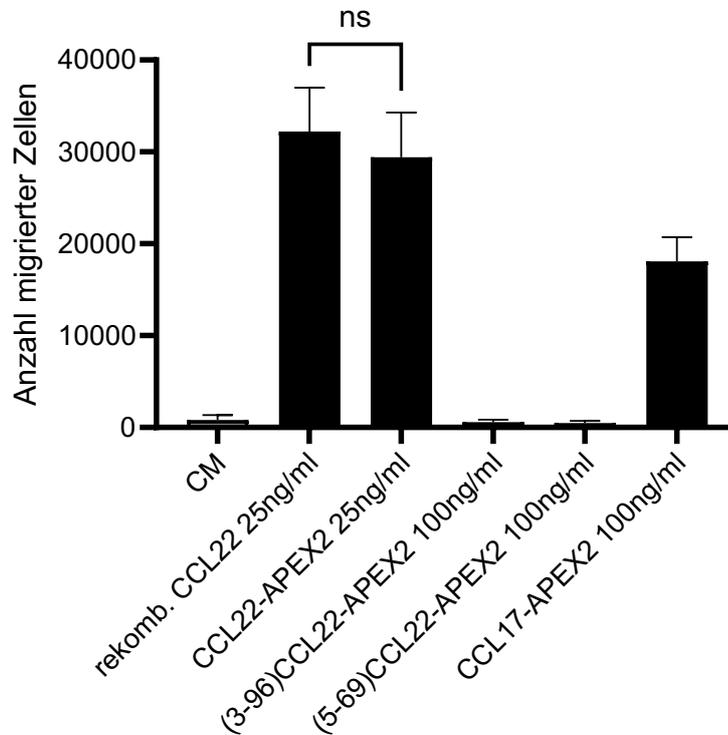


**Abbildung 7: Streptavidin-Westernblot aus biotinyliertem B3Z-CCR4<sup>+</sup> Gesamtlisat.** 500.000 B3Z-CCR4<sup>+</sup> wurden mit den angegebenen Konzentrationen CCL22-APEX2 inkubiert. Als Kontrolle diente konditioniertes Medium (CM) von untransduzierten Expi293F. Nach der Biotinylierung wurde mit dem Zelllysat ein Streptavidin-HRP-Westernblot durchgeführt. Die Ladungskontrolle zeigt einen Gel-Ausschnitt nach unspezifischer Proteinfärbung mittels Trichlorethanol.

In den bisherigen Versuchen wurde untersucht, in welchem Maße die Fusionsprodukte sezerniert wurden (Abbildung 4) und ob diese Peroxidase-Aktivität zeigten (Abbildung 6 und 8). Mit Hilfe des ELISA (Abbildung 5) war es möglich, durch Angleichen der Konzentrationen, größere Volumina der Zellüberstände zu produzieren und hochkonzentrierte *Stock*-Lösungen herzustellen. Somit entstand ein System, das dauerhaft und kostengünstig APEX2-Fusionsproteine generiert.

In einem weiteren Schritt der Validierung galt es zu überprüfen, ob die APEX2-Fusionsproteine das beschriebene Migrationsverhalten der Chemokine, von denen sie abstammen, auslösen – also funktionell aktiv sind. Hierfür wurde erneut die B3Z-CCR4<sup>+</sup> Zelllinie verwendet. Ziel des Versuchs war es, eine Aussage darüber treffen zu können, ob die APEX2-Fusion an CCL22 einen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Zellen auf einen CCL22 Stimulus hin hat. Erfreulicherweise zeigte sich keine signifikante Abweichung der Migration im Vergleich zu rekombinantem CCL22 (Abbildung 8). Die reduzierte Migration auf CCL17-APEX2 war aufgrund des mehrfach beschriebenen reduzierten Migrationsverhaltens von CCR4<sup>+</sup> Zellen auf CCL17 im Vergleich zu CCL22

zu erwarten. Es wurde keine Migration auf die trunkierten Fusionsproteine festgestellt, was ebenfalls zu erwarten war. CCL22-APEX2 ist also dual biologisch aktiv, es vermittelt die Migration von CCR4<sup>+</sup> Zellen und hat potente Peroxidaseaktivität.



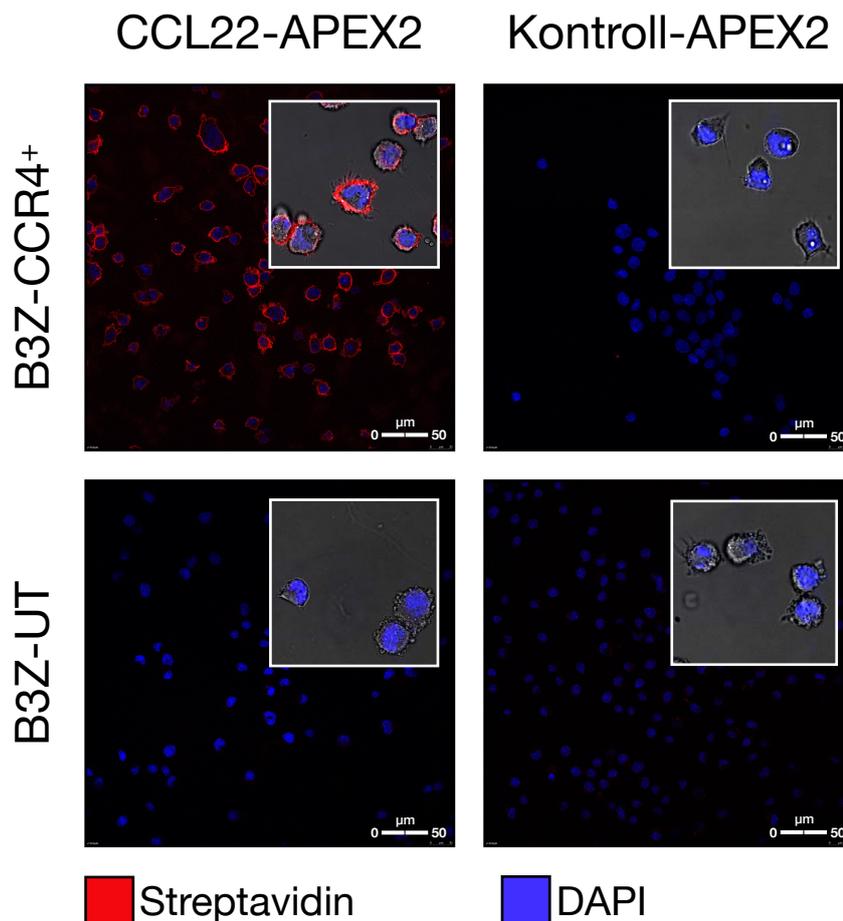
#### Abbildung 8: Migration von B3Z-CCR4<sup>+</sup> auf APEX2-Fusionsproteine.

Es wurden je 100.000 B3Z-CCR4<sup>+</sup> in Migrationsplatten mit unterschiedlichen Chemokin- bzw. Fusionsprotein-Gradienten ausgesät. Die Konzentration der Chemokine in der unteren Kammer ist jeweils angegeben. Die Negativkontrolle bestand aus konditioniertem Medium der untransduzierten Expi293F-Zelllinie (CM). Die Positivkontrolle enthielt rekombinantes murines CCL22 (rekomb. CCL22). Nach Inkubation über vier Stunden wurde die Anzahl an jeweils insgesamt migrierten Zellen per Durchflusszytometrie bestimmt. Zur statistischen Testung wurde der ungepaarte t-Test angewandt (ns = nicht signifikant). Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (*Mean + SD*).

### 3.2 Spezifität der Biotinylierung von CCR4

Für eine hohe Spezifität des *Proximity Labelings* ist es wichtig, dass die Biotinphenolradikale (BP-Radikale) nur in unmittelbarer Umgebung von APEX2 wirken. Über BP-Radikale ist beschrieben, dass diese im Bereich von zehn bis hin zu wenigen

hundert Nanometer diffundieren können, bevor sie kovalente Bindungen eingehen (Rees *et al.* 2017). Diesen Dimensionen zufolge ist bei Fusionsproteinen, die nicht direkt an die Zelloberfläche gelangen und sich damit nicht in unmittelbarer Nähe zu Rezeptoren befinden, mit einer geringen unspezifischen Biotinylierung zu rechnen. Durch den Vergleich der Biotinylierung durch CCL22-APEX2 an untransduzierten B3Z und CCR4-transduzierten B3Z wurde die Spezifität des Systems überprüft.

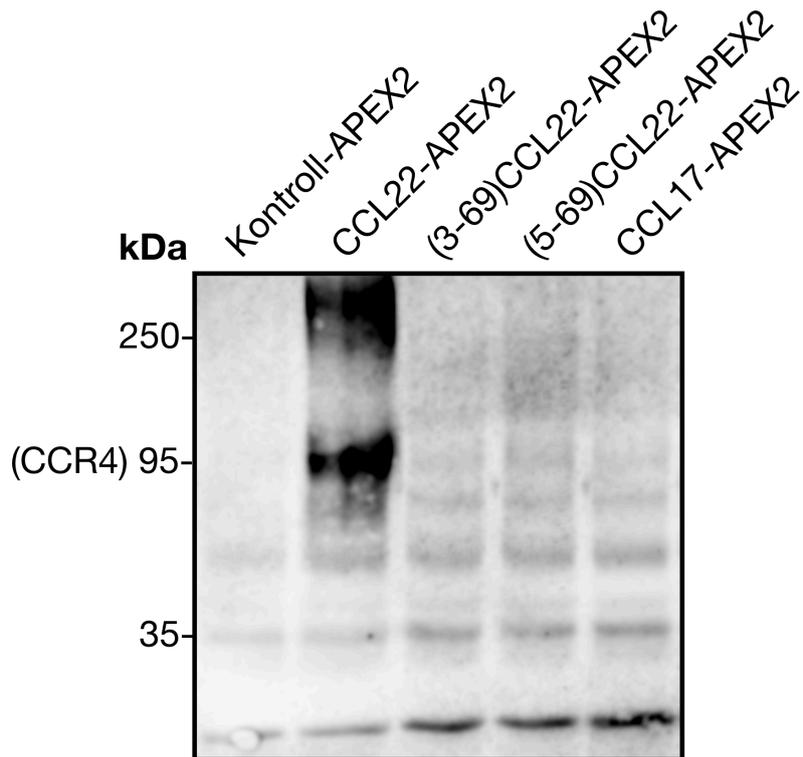


**Abbildung 9: Konfokalmikroskopie von B3Z nach Biotinylierung.** B3Z-CCR4<sup>+</sup> und untransduzierte B3Z (UT) wurden durch CCL22-APEX2 und Kontroll-APEX2 inkubiert und anschließend biotinyliert. Nach Fixation wurde mit DAPI und Streptavidin, welches an biotinyliertes Protein bindet, gefärbt. Abgebildet sind jeweils eine 40-fache und 64-fache Vergrößerung aus unabhängigen Versuchen.

Die gleiche Anzahl untransduzierter und CCR4-überexprimierender B3Z wurde getrennt voneinander im 12-well ausgesät. Nach Zugabe von Kontroll-APEX2 oder CCL22-APEX2 wurden die Zellen für weitere 5 Minuten inkubiert, um eine Bindung der Fusionsproteine an den Oberflächenrezeptor CCR4 zu ermöglichen. Nach Zugabe von

BP und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches beides in die Zellen diffundiert, lief die Biotinylierung für drei Minuten ab. Die Zellen wurden daraufhin nicht lysiert, sondern mittels Streptavidin-PE und DAPI gefärbt. Nur in der Kondition CCR4<sup>+</sup> B3Z mit CCL22-APEX2 tritt eine sichtbare Biotinylierung auf, die die Zellen kreisförmig umgibt. In den Vergrößerungsaufnahmen, in denen zusätzlich zum DAPI- und Streptavidin-Signal eine Durchlichtaufnahme zu sehen ist, wird die Lokalisation der Biotinylierung an der Zellmembran deutlich, an der auch der Membran-gekoppelte Rezeptor CCR4 zu erwarten ist. In den übrigen Konditionen ist mikroskopisch keine Biotinylierung nachweisbar (Abbildung 9). Diese Ergebnisse zeigen, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit spezifisch CCR4 durch CCL22-APEX2 gebunden und detektiert wird.

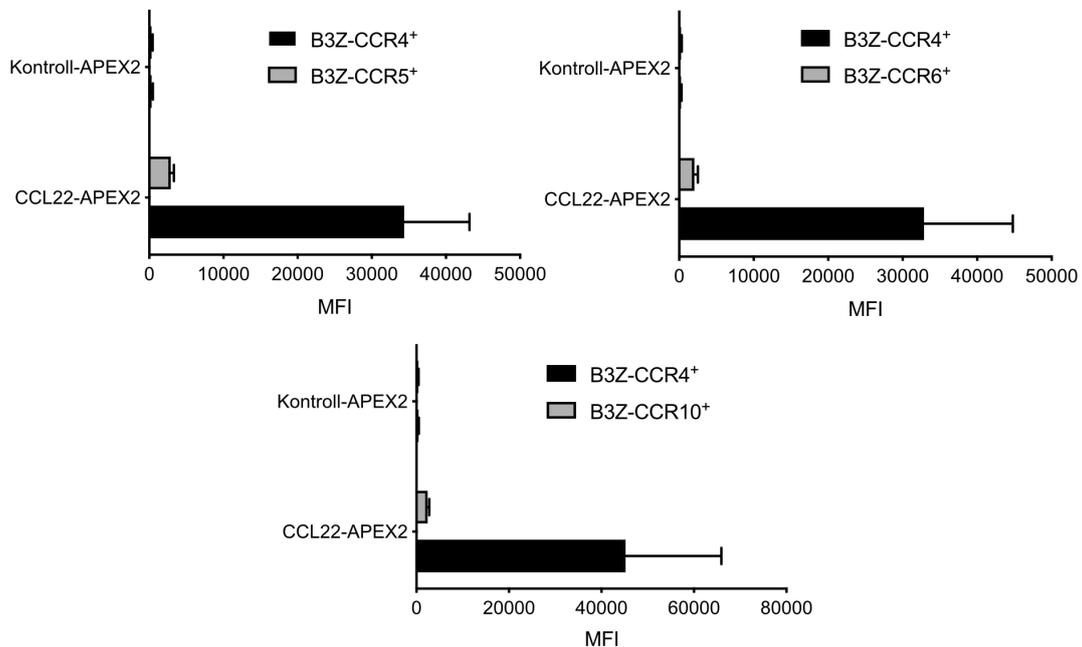
Um einen weiteren noch direkteren Nachweis für die spezifische Biotinylierung zu erhalten, wurde in einem nächsten Versuch analog zum Ansatz aus Abbildung 9 vorgegangen. Anstelle die Zellen nach der Biotinylierung zu fixieren und zu färben, wurden diese hier durch RIPA-Puffer lysiert. Anschließend konnten die biotinylierten Proteine durch einen Streptavidin-Pulldown isoliert und über eine SDS-PAGE aufgetrennt werden. Ziel des Versuchs war es, den so isolierten Rezeptor CCR4 über Westernblot nachzuweisen. Nachdem mehrere kommerzielle CCR4-Antikörper – auch mit Zellen aus CCR4<sup>-/-</sup> Mäusen – keine spezifische Bindung aufzeigten, wurde CCR4 mit einem HA-*tag* gekoppelt und mit B3Z-CCR4<sup>+</sup>-HA Zellen das Protein über einen HA-WB nachgewiesen.



**Abbildung 10: HA-Westernblot nach Streptavidin-Pulldown von biotinyliertem B3Z-CCR4-HA Lysat.** B3Z wurden mit den Fusionsproteinen inkubiert; anschließend biotinyliert und lysiert. Durch einen Streptavidin-Pulldown wurde das biotinylierte Protein gebunden und per SDS-PAGE aufgetrennt. CCR4 wurde über einen gekoppelten HA-Antikörper nachgewiesen. Eine Wiederholung des Versuchs mit CCR4-GFP transduzierten B3Z bestätigte die Laufhöhe für CCR4 (nicht dargestellt).

Dabei zeigte sich nur bei Verwendung von CCL22-APEX2 ein deutliches Signal im HA-Westernblot (Abbildung 10). Dies zeigt die spezifische Biotinylierung von CCR4 durch CCL22-APEX2. Zu beachten ist das geringe unspezifische Signal, das in allen Konditionen gleich verteilt ist und v.a. Proteine < 95 kDa betrifft. Eine Erklärung hierfür sind endogen biotinylierte Proteine wie Histone oder Carboxylasen. Die Bandenhöhe von 95 kDa für CCR4 wurde in einem unabhängigen, analogen Versuch mit CCR4-GFP transduzierten B3Z und GFP-Westernblot bestätigt (nicht dargestellt). Wodurch das Signal im Bereich von 250 kDa ausgelöst ist, ließ sich nicht eindeutig klären. Eine mögliche Erklärung wäre die Akkumulation von Protein oder ungenügender Denaturierung durch SDS, wodurch es zu einer mangelhaften Auftrennung im Gel kommt.

In einem nächsten Schritt wurde die Spezifität der Biotinylierung weiter untersucht und der Frage nach einem möglichen *Bystander*-Effekt nachgegangen. Konkret sollte untersucht werden, ob die Biotinylierung mit CCL22-APEX2 in einem dichten Zellgemisch isoliert CCR4-positive Zellen betrifft, oder ob durch unspezifische Radikale auch andere Zellen betroffen sind. Um dies zu untersuchen, wurden mehrere Zellgemische erstellt, die jeweils eine gleiche Anzahl B3Z-CCR4<sup>+</sup> und B3Z, die einen anderen Chemokinrezeptor überexprimierten, enthielten. Nach Zugabe von CCL22-APEX2 oder Kontroll-APEX2 erfolgte die Biotinylierung. Anschließend wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf Chemokinrezeptorexpression und Biotinylierung untersucht (Abbildung 11).



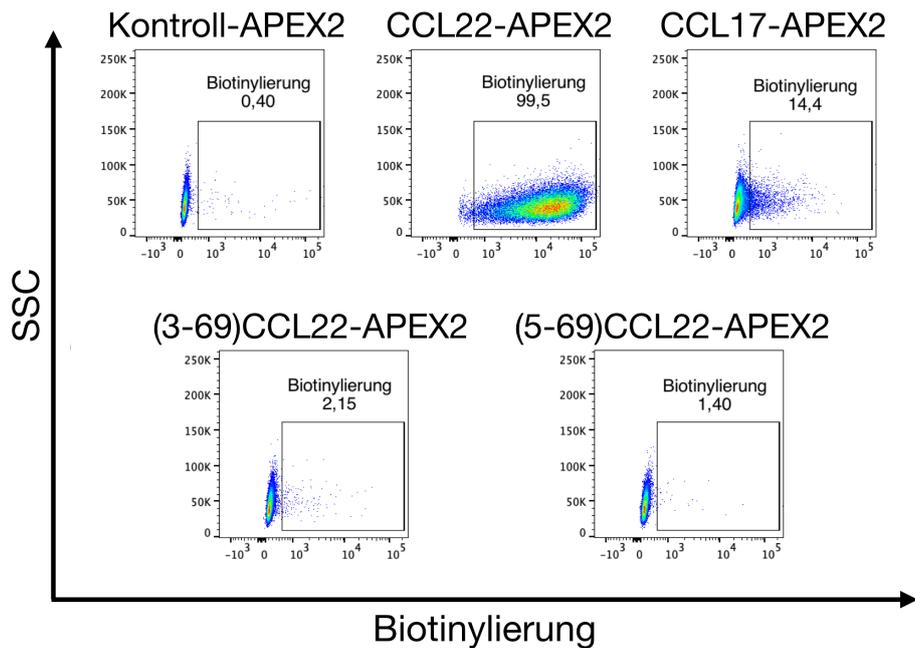
**Abbildung 11: Biotinylierung eines B3Z-Zellgemischs.** Ein Zellgemisch aus gleichen Anteilen zweier B3Z-Zelllinien (insgesamt  $10^6$  Zellen / ml), die jeweils einen unterschiedlichen Chemokin-Rezeptor überexprimierten, wurden mit CCL22-APEX2 und Kontroll-APEX2 biotinyliert. Durch FACS wurde anschließend der Grad der Biotinylierung über die *mean fluorescence intensity* (MFI) bestimmt. Abgebildet ist der Mittelwert aus drei Messungen, sowie sein Standardfehler (Mean + SEM).

Hierbei zeigte sich, dass die Biotinylierung durch APEX2-CCL22 in einem sehr dichten Zellgemisch spezifisch CCR4<sup>+</sup> Zellen betrifft und dabei kaum auf andere Zellpopulationen übergeht. Kontroll-APEX2 löste keine Biotinylierung aus. Der Versuch zeigt, dass die hohe Spezifität des *Proximity Labelings* durch die räumlich eng begrenzte

Biotinylierung und Kurzlebigkeit der Biotinphenol-Radikale hervorgerufen wird. Eine ausgeprägte unspezifische Biotinylierung benachbarter Zellen im Sinne eines *Bystander*-Effektes konnte damit ausgeschlossen werden.

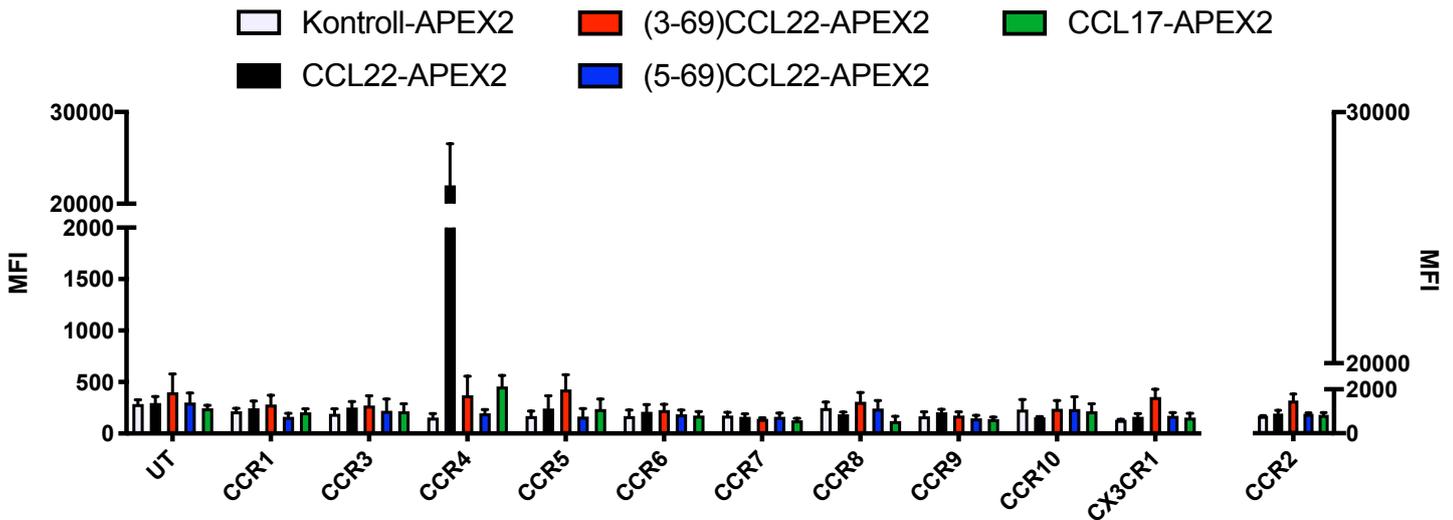
### **3.3 Bestimmung der Bindungsfähigkeiten von Chemokinen über *Proximity Labeling***

Aufgrund der komplexen und in Teilen noch unverstandenen Rezeptorinteraktion von Chemokinen wurde in dieser Arbeit das *APEX2 Proximity Labeling* angewandt, um Chemokinrezeptoren auf ihr Bindungsverhalten hin zu untersuchen. Ziel war es zum einen die Methode zu validieren, indem die gut untersuchten Bindungseigenschaften von CCL22, seinen Abkömmlingen und CCL17 hin zu CCR4 nachgebildet werden; zum andern konnte auf diesem Weg der bisher ungeklärten Frage nach einem weiteren funktionellen Rezeptor für CCL22 oder seiner Abkömmlinge nachgegangen werden. Mit Hilfe einer Zelllinien-Sammlung, die in großen Teilen durch die Arbeitsgruppe von Prof. Sebastian Kobold (Abteilung für Klinische Pharmakologie der Universität München, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde, konnten alle vorliegenden CC-Chemokin-Rezeptoren auf Ihre Bindungsfähigkeit zu den fünf Fusionsproteinen hin untersucht werden. Dazu wurden die jeweiligen B3Z-Zelllinien im 6-well ausgesät und mit jeweils einem der fünf Fusionsproteine inkubiert. Nach Ablauf der Biotinylierung konnte mittels Durchflusszytometrie die Biotinylierung quantifiziert werden (Abbildung 12 und 13). Die isolierte Betrachtung von CCR4 zeigt, wie mittels *Proximity Labeling* die bisherigen Erkenntnisse zum Bindungsverhalten dieses Rezeptors im Detail nachgestellt werden konnten. Während das Kontroll-Konstrukt minimale Biotinylierung hervorruft, lässt sich diese bei > 99,5% der CCR4<sup>+</sup> B3Z nach Inkubation mit CCL22-APEX2 nachweisen. CCL17-APEX2 führt bei der verwendeten Konzentration zu einer geringeren Biotinylierung der Zellen, die sich dennoch deutlich von der, durch die trunkierten CCL22-Fusionsproteine (3-69)CCL22- und (5-69)CCL22-APEX2 unterscheidet und den vorherbeschriebenen Affinitätsunterschied zwischen CCL22 und CCL17 beschreibt (Abbildung 12). Dies stellt den zentralen Versuch zur Verdeutlichung der Funktionalität und Anwendbarkeit des extrazellulären Proximity Labelings an Chemokinrezeptoren dar.



**Abbildung 12: Biotinylierungsmuster der APEX2-Konstrukte auf B3Z-CCR4<sup>+</sup>.** B3Z-CCR4<sup>+</sup> wurden mit den angegebenen APEX2-Fusionsproteinen inkubiert und anschließend biotinyliert. Mit Streptavidin wurde eine Oberflächenfärbung durchgeführt und so die Biotinylierung in Prozent zur Ausgangspopulation durch FACS nachgewiesen. Das Seitwärtsstreulicht (SSC) beschreibt mit dem Vorwärtsstreulicht (nicht dargestellt) die Zellmorphologie.

Mit der Gewissheit ein valides System zur Charakterisierung von Chemokin-Rezeptor-Interaktionen aufgebaut zu haben, gingen wir mit identischem Versuchsaufbau der Frage nach einem weiteren Rezeptor für die untersuchten Chemokine nach. Hierfür wurden mehrere B3Z-Zelllinien verwendet, die jeweils einen Chemokinrezeptor überexprimierten und mit allen fünf Fusionsproteinen inkubiert. Hierbei konnten wir kein Bindungspaar ausmachen, das eine ähnlich deutliche Bindung wie CCL22-APEX2 zu CCR4 zeigte (Abbildung 13). (3-69)CCL22-APEX2 zeigt bei CX3CR1 und CCR2 die höchste MFI, weshalb das Migrationsverhalten der jeweiligen B3Z auf (3-69)CCL22-APEX2 weiter untersucht wurde. Hier wurde keine signifikante, gerichtete Migration festgestellt (nicht dargestellt). Zusammenfassend kann auch dieser Versuch als Bestätigung der Spezifität des Systems angesehen werden, da bis zum heutigen Zeitpunkt kein weiterer Rezeptor für CCL22 oder seine Abkömmlinge nachgewiesen werden konnte, was durch unser Rezeptor-Screening bestätigt wurde.



**Abbildung 13: Chemokinrezeptor-Screening durch Biotinylierung mit APEX2-Fusionsproteinen.** B3Z-Zellen wurden mit je einem Chemokinrezeptor transduziert und durch APEX2-Fusionsproteine biotinyliert. Nach Oberflächenfärbung mit Streptavidin wurde die *mean fluorescence intensity* (MFI) der Ausgangspopulation für Biotinylierung durch FACS bestimmt. Als Kontrolle dienten untransduzierte B3Z-Zellen (UT). Die Klonierung der Zelllinie B3Z-CCR2<sup>+</sup> erfolgte zeitlich versetzt und konnte daher nicht unter identischen FACS-Einstellungen durchgeführt werden. Die Darstellung erfolgt daher separiert. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (*Mean + SEM*).

## 4. Diskussion

### 4.1 Zusammensetzung der Fusionsproteine

Zu jeder Zeit finden Bindungen zwischen Chemokinen und deren Rezeptoren im Körper statt. Da Zellen jedoch oftmals mit einer Vielzahl von Rezeptoren ausgestattet sind, lässt sich nicht ohne Weiteres erkennen, an welchen Rezeptor ein Chemokin bindet. Durch die Fusion eines Chemokins mit einem weiteren Protein, das in der Lage ist, den gebundenen Rezeptor zu markieren, kann dieser Herausforderung begegnet werden. Ziel dieser Arbeit war es im Sinne eines *Proof of Concept* erstmalig APEX2 mit Chemokinen zu fusionieren, um deren bekannte Rezeptorinteraktion nachzuweisen. Hierzu wurden insgesamt fünf Fusionsproteine aus jeweils einem Chemokin und APEX2 neu generiert. Neben den Konstrukten mit murinem CCL22, CCL17, sowie den trunkierten Formen (3-69)CCL22 und (5-69)CCL22 wurde noch ein Kontrollkonstrukt verwendet, das lediglich die Signalsequenz zur Sekretion und APEX2 enthielt. Die Fusionsproteine wurden nach Transfektion von Produktionszelllinien sekretiert und konnten somit aus dem Zellüberstand gewonnen werden.

APEX2 ist als sogenanntes *Labeling* Enzym speziell für den Zweck der intrazellulären Anwendung entwickelt und weiterentwickelt worden (Lam *et al.* 2015). Im Gegensatz zu dem Vorläuferprotein APEX zeichnet sich APEX2 durch verbesserte Kinetik, Thermostabilität, eine stärkere Häm-Bindung und insbesondere eine erhöhte Resistenz gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Autoinaktivierung aus (Lam *et al.* 2015). Es konnte bereits gezeigt werden, dass APEX2 geeignet ist, um auf engstem Raum hochspezifisch Protein-Protein Interaktionen nachzuweisen (Han *et al.* 2020, Paek *et al.* 2017, Rhee *et al.* 2013).

Zum Zeitpunkt der hier beschriebenen Versuche war die Anwendung von APEX2 auf den Intrazellulärraum beschränkt. Charest-Morin *et al.* haben unterdessen APEX2 mit Parathormon gekoppelt und das Enzym so erstmals extrazellulär angewandt (Charest-Morin *et al.* 2017). Weiter verglichen Charest-Morin *et al.* wie sich HRP als Alternative für diese Funktion eignet. HRP ist wie APEX2 eine Peroxidase und wies in den Versuchen von Charest-Morin *et al.* eine noch höhere Aktivität und Spezifität bei der extrazellulären Anwendung auf. Dies ist im Einklang mit Ergebnissen von Lam *et al.*, die auch zeigten, dass HRP im Vergleich zu APEX2 eine noch stärkere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Resistenz und höhere katalytische Aktivität aufweist (Lam *et al.* 2015). Generell ist die Aktivität eines Enzyms abhängig von den jeweiligen Rahmenbedingungen und erreicht unter optimalen Bedingungen ihr Maximum. Aufgrund essenzieller Disulfidbrücken und zweier Calcium-

Bindungsstellen ist HRP im reduzierenden Milieu des Intrazellularraumes inaktiv (Hopkins *et al.* 2000, Martell *et al.* 2012, Škulj *et al.* 2024). Die Stärke von APEX2 kommt darin zu tragen unter eben diesen Bedingungen weiter aktiv zu sein (Lam *et al.* 2015, Patterson *et al.* 1995, Škulj *et al.* 2024). Ein weiterer Vorteil im Vergleich zu HRP besteht in der relativ geringen Molekülmasse. So besitzt APEX2 mit 28 kDa eine um etwa 40% kleiner Masse als HRP (Martell *et al.* 2012, Škulj *et al.* 2024). Aufgrund des selbst nur etwa 10 kDa schweren CCL22 müssen bei der Fusion sterische Wechselwirkungen beachtet werden. Dennoch ist anzumerken, dass die Aktivität von APEX2 bei extrazellulärer Anwendung aufgrund der geänderten pH- und Elektrolytverhältnisse reduziert sein kann. HRP ist in diesem Kontext besser untersucht und sollte als alternatives Fusionsprotein bei rein extrazellulärer Anwendung aufgrund der höheren katalytischen Aktivität in Betracht gezogen werden (Škulj *et al.* 2024).

Ein entscheidender Faktor bei der Konstruktion von Fusionsproteinen ist die mögliche Auswirkung der Fusion auf die Proteinfunktion. Bei der Fusion zweier Proteine wird die Aminosäurekette des einen Proteins um die des jeweiligen anderen verlängert. Da die Aminosäuren gegenseitig wechselwirken, kann so die Funktionalität der Proteine beeinträchtigt werden. In unserem Fall wirkt ein zwischengeschalteter Linker durch räumliche Trennung beider Proteine dem entgegen. Sowohl die fortbestehende Peroxidase-Aktivität von APEX2, als auch die chemotaktische Funktionalität der Chemokine wurden in den durchgeführten Versuchen überprüft (Abbildung 6 und 8). Wir konnten zeigen, dass die chemotaktische Aktivität von CCL22-APEX2 im Vergleich zu rekombinantem CCL22 auf CCR4<sup>+</sup> B3Z nicht verringert ist (Abbildung 8). Letztlich lassen sich so Abweichungen der Molekülfunktion im Vergleich zu murinem CCL22 aber nicht gänzlich ausschließen. Durch weiterführende Untersuchungen, wie der Messung des Calcium-Influx in B3Z, könnte man sich dieser Fragestellung weiter annähern. Außerdem könnte im Rahmen weiterer Versuchsreihen die ausgelöste Rezeptorinternalisierung der Fusionsproteine verglichen werden, da diese für CCL22 und CCL17 bereits gut untersucht ist (Mariani *et al.* 2004). Ajram *et al.* konnten zeigen, wie sich CCL22, CCL17 und (3-69)CCL22 untereinander als kompetitive Hemmer verhalten und unterschiedliche Rezeptorinternalisierungen bewirken (Ajram *et al.* 2014). Falls sich dieses Verhalten mit den Fusionsproteinen bestätigen lässt, spräche dies für eine hohe Funktionalität.

Es ist bekannt, dass posttranslationale Modifikationen von Chemokinen und Chemokinrezeptoren große Auswirkung auf die Funktionalität beider Proteingruppen haben können. Die Bindungseigenschaften von Chemokinen können durch

posttranslationale Proteolyse, Nitration, Citrullinierung oder Glykosylierung verändert sein (Vanheule *et al.* 2018). Als Konsequenz ergeben sich komplexe Bindungseigenschaften, die von veränderter Bindungsstärke über Signalverlust, bis hin zu geänderten Rezeptorinteraktionen reichen (Loos *et al.* 2008, Mortier *et al.* 2008, Yoshida *et al.* 2014). Ebenso können Chemokinrezeptoren über Phosphorylierung, Glykosylierung und Sulfatierung modifiziert sein, was sich auf die Chemokininteraktion auswirkt. Veldkamp *et al.* konnten zeigen, dass die Sulfatierung von CXCR4 Voraussetzung für eine starke Bindung mit CXCL12 ist (Veldkamp *et al.* 2006). Im Menschen wurde weiter für CCR2, CXCR3 und CX3CR1 Sulfatierung nachgewiesen. Auch für CCR4 wurde aufgrund der freien Tyrosinreste eine mögliche Sulfatierung vorhergesagt (Liu *et al.* 2008). Hauser *et al.* zeigten, dass sich Lymphozyten-Subpopulationen in Bezug auf die Sialylierung von CCR7 unterscheiden, was Änderungen im Rezeptorverhalten auslöst (Hauser *et al.* 2016). Vor diesem Hintergrund sind falsch-positive oder falsch-negative Bindungen durch Modifikation der Fusionsproteine denkbar. Für die hier untersuchten Interaktionspartner CCL22, CCL17 und CCR4 sind jedoch außer der Trunkierung durch DPP4 keine der o.g. posttranslationalen Modifikationen *in vivo* beschrieben.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass mögliche posttranslationale Modifikationen bei Untersuchungen einer Chemokin-Rezeptor Achse im Zellmodell berücksichtigt werden sollten. Durch die hier gezeigten gründlichen Validierungsversuche ist ein vergleichbares Bindungsverhalten der Fusionsproteine gewährleistet, wodurch Rückschlüsse auf die Eigenschaften der abstammenden Chemokine zulässig sind.

## 4.2 Spezifität der Fusionsproteine

In dieser Arbeit wurde die Anwendung des APEX2 *Proximity Labelings* als *Screening*-Methode zur Charakterisierung von Chemokin-Rezeptor-Interaktionen untersucht. Da hierbei eine Vielzahl von Chemokinrezeptoren untersucht wird, ist eine hohe Spezifität notwendige Voraussetzung einer solchen Anwendung.

Die Spezifität des *Proximity Labelings* wurde in dieser Arbeit anhand der CCL22-CCL17-CCR4-Achse über Konfokalmikroskopie (Abbildung 9), Westernblot (Abbildung 10) und FACS (Abbildung 11,12) untersucht. Im Besonderen deutet der Versuch, bei dem unterschiedliche Zelltypen gemischt und anschließend mit CCL22-APEX2 und dem Kontrollkonstrukt biotinyliert wurden, auf eine hohe Spezifität der Fusionsproteine hin (Abbildung 11). Obwohl sich hier Zellen auf engstem Raum befanden, war die

unspezifische Biotinylierung minimal. Eine mögliche Erklärung für die Biotinylierung von untransduzierten Zellen durch CCL22-APEX2 ist endogenes CCR4, das auch durch die Kontroll-Zelllinien exprimiert wurde. Die Anreicherung von CCR4-HA und CCR4-GFP nach Biotinylierung und anschließendem Streptavidin-*Pulldown* bestätigt, dass es sich bei dem durch CCL22-APEX2 biotinylierten Protein um CCR4 handelt (Abbildung 10). Dennoch ist zu berücksichtigen, dass trotz selektiver Bindung der Fusionsproteine mit einer gewissen Rate an unspezifisch biotinyliertem Protein zu rechnen ist, da die entstehenden Biotinphenol-Radikale in einem Radius von zehn bis hin zu wenigen hundert Nanometern wirken (Rees *et al.* 2017). Auch das Kontroll-Konstrukt, in dem APEX2 nicht an ein Chemokin gebunden ist, sondern frei vorliegt, generiert Biotinphenol-Radikale, die Bindungen eingehen können. Die Zellkompartiment-abhängige Spezifität des APEX2-*Labelings* konnte bereits für mehrere Zellen wie beispielsweise Neuronen oder Hefezellen gezeigt werden (Dumrongprechachan *et al.* 2021, Singer-Krüger *et al.* 2020).

Weiter ist denkbar, dass es nach Bindung von CCL22-APEX2 zur Internalisierung der Fusionsproteine kommt. Ariotti *et al.* konnten zeigen, dass APEX seine Aktivität auch in Endosomen beibehält (Ariotti *et al.* 2015). So ist eine Biotinylierung von intrazellulärem Protein möglich, welches jedoch nicht direkt mit CCL22 interagiert. Daneben bestehen endogen biotinylierte Proteine wie beispielsweise Carboxylasen oder Histone. Diese falsch-positiv Rate ist in der Auswertung von Versuchen mit biotinyliertem Protein zu berücksichtigen (Kothapalli *et al.* 2005, Praul *et al.* 1998). Wir gehen davon aus, dass diese endogen-biotinylierten Proteine mit den unspezifischen Banden im Streptavidin-*Pulldown* Versuch korrelieren (Abbildung 10).

In unserer Versuchsreihe, bei der aus einem B3Z-Zellgemisch isoliert B3Z-CCR4<sup>+</sup> biotinyliert werden sollten, fällt ein geringer Grad biotinylierter, nicht-CCR4-überexprimierender B3Z auf (Abbildung 11). Aus Vorversuchen ist jedoch eine geringe Expression von CCR4 durch untransduzierte B3Z bekannt (Versuche nicht abgebildet). Vor diesem Hintergrund ist eine Erklärungsmöglichkeit für die scheinbar unspezifische Biotinylierung durch CCL22-APEX2 die spezifische Biotinylierung von endogenem CCR4. Die Spezifität der Fusionsproteine könnte daher mittels CCR4-Knockout B3Z genauer untersucht werden, deren Generierung aber aufwändig wäre.

Als Nachweis dafür, dass die Fusionsproteine spezifisch das Protein CCR4 biotinylieren, diente ein Streptavidin-*Pulldown*, der nach Biotinylierung und Lyse von B3Z-CCR4<sup>+</sup> durchgeführt wurde. Hierbei wurde CCR4 auf Proteinebene durch CCL22-APEX2 spezifisch angereichert. Es zeigt sich jedoch keine klar erkennbare CCR4-Bande in der

CCL17-APEX2-Kondition (Abbildung 10). Zu erwarten wäre eine im Vergleich zur CCL22-Kondition schwächere, aber dennoch sichtbare Bande. Eine mögliche Erklärung ist die deutlich niedrigere Menge angereicherter Proteins aufgrund der geringeren Biotinylierung, die wir auch durch FACS zeigen konnten (Abbildung 12). Eine Versuchsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen von CCL17-APEX2 könnte an dieser Stelle für Klärung sorgen. Alternativ könnte der Nachweis von CCR4 nach Lyse und Streptavidin-Pulldown über Massenspektrometrie erfolgen. Der Nachweis biotinylierten Proteins nach *APEX-Labeling* ist eine gut etablierte Methode und wurde beispielsweise von Letian *et al.* angewandt, um PD-L1-assozierte Proteine zu identifizieren (Letian *et al.* 2023).

In dieser Arbeit wurde maßgeblich die CCL22-CCL17-CCR4 Achse untersucht. Wie einleitend beschrieben, binden CCL17 und CCL22 jedoch auch an den atypischen Chemokinrezeptor ACKR2. Daher wäre es interessant, die Expression und Biotinylierung von ACKR2 auf B3Z und primären Zellen zu untersuchen, um so die Spezifität der Fusionsproteine genauer zu bestimmen. Aufgrund der weit verbreiteten Expression von ACKR2 könnten hierzu eine Vielzahl von Zelltypen verwendet werden. So wurde die Expression von ACKR2 bereits für Trophoblastenzellen, Immunzellen wie B-Zellen, DCs und Mastzellen, sowie Endothelzellen beschrieben (Hansell *et al.* 2011, Hansell *et al.* 2020, Madigan *et al.* 2010, Nibbs *et al.* 2001). Nach Inkubation einer ACKR2-überexprimierende Zelllinie mit (3-69)CCL22-APEX2 und (5-69)CCL22-APEX2 erwarten wir keine Biotinylierung, da die trunkierten Moleküle laut Literatur nicht an ACKR2 binden (Bonecchi *et al.* 2004). Durch diese Versuchsreihe könnte die Spezifität noch tiefergehend untersucht werden.

Unsere Validierungsversuche stellen eine hohe Spezifität der Fusionsproteine bei der hier untersuchten Rezeptorachse sicher und ermöglichen die Beantwortung spezifischer Fragestellungen zur CCL22-CCL17-CCR4-Achse. Durch die verwandte Struktur von Chemokinen erwarten wir bei zukünftigen weiteren Fusionsproteinen mit analogem Aufbau eine vergleichbar hohe Spezifität.

### **4.3 Proof of Concept anhand der CCL22-CCL17-CCR4-Achse und Interpretation des Rezeptor-Screenings**

Zur Untersuchung der Anwendbarkeit des *Proximity Labelings* erwies sich die CCL22-CCL17-CCR4-Achse aufgrund ihrer gründlich erforschten, facettenreichen Chemokin-Rezeptor-Interaktionen und ihrer hohen klinischen Bedeutung als besonders geeignet.

Diese Chemokinachse wurde speziell für die Einführung des *Proximity Labelings* ausgewählt, da CCL22 im Vergleich zu CCL17 als dominanter, hochaffiner Ligand bekannt ist und dieser Unterschied mit Hilfe der neuen Methode nachgewiesen werden sollte. Die verkürzten Konstrukte (3-69)CCL22 und (5-69)CCL22, die keine nachgewiesene Bindung an CCR4 aufweisen, eignen sich darüber hinaus als Kontrollen zur Untersuchung der Spezifität der Fusionsproteine. Das übergeordnete Ziel bestand darin, diese unterschiedlichen Bindungseigenschaften über die neuartige Methodik nachzuweisen. Angesichts der hohen klinischen Relevanz der Chemokinachse im Kontext von Autoimmunität und Malignität bestand zudem die Möglichkeit, im Rahmen eines Rezeptor-*Screenings* einen bislang wiederholt diskutierten, jedoch unbekannteren potenziellen weiteren Rezeptor für CCL22 oder seine verkürzten Formen zu identifizieren. Dies könnte vielversprechende Perspektiven für mögliche weitere therapeutische Ansätze eröffnen. Hierzu wurde eine Versuchsreihe entworfen, bei der eine Vielzahl möglicher Chemokinrezeptoren auf ihre Bindung zu den Fusionsproteinen hin getestet werden kann.

Unsere Versuchsergebnisse der Migration von B3Z-CCR4<sup>+</sup> entlang Gradienten der fünf Fusionsproteine weisen präzise die Bindungseigenschaften der Rezeptorachse und der Ursprungschemokine nach. Dabei zeigt sich gerichtete Migration durch CCL22-APEX2 und – in geringerem Maße – durch CCL17-APEX2, während die verkürzten Konstrukte keine Migration auslösen. Hierbei unterscheidet sich das Migrationsverhalten der Zellen bei Gradienten rekombinanten CCL22s und gleich konzentrierten CCL22-APEX2 nicht (Abbildung 8). Dies stellt einen bedeutenden Hinweis auf unveränderte Bindungseigenschaften der Fusionsproteine dar. Der Nachweis dieser subtilen Unterschiede im Bindungsverhalten dient der Validierung des *Proximity Labelings* und bestärkt die Annahme einer sehr sensitiven und spezifischen Methodik.

Den zentralen Versuch dieser Arbeit stellt die Quantifizierung der Biotinylierung von B3Z-CCR4<sup>+</sup> durch alle fünf Fusionsproteine dar (Abbildung 12). Bei diesen Versuchen zeigt sich im Durchflusszytometer eine deutlich stärkere Biotinylierung der CCR4-überexprimierenden Zellen nach Inkubation mit CCL22-APEX2 als mit CCL17-APEX2. Im Gegensatz dazu führt die Inkubation der Zellen mit den verkürzten Konstrukten (3-69)CCL22-APEX2 und (5-69)CCL22-APEX2 im Vergleich zum Kontrollkonstrukt kaum zu einer messbaren Biotinylierung. CCL22-APEX2 zeigt sich in unseren Versuchen als dominanter Ligand verglichen mit CCL17-APEX2, was auch durch ein stärkeres Migrationsverhalten der Zellen bestätigt wurde und durch eine niedrigere Affinität von CCL17 begründet werden kann (Abbildung 8). Diese Ergebnisse sind kongruent mit dem bestehenden Wissen über beide Moleküle. Bereits 1999 konnten Struyf et al. zeigen,

dass CCL22 als deutlich potenterer Ligand Calciuminflux in CCR4<sup>+</sup> Zellen auslöste (Struyf *et al.* 1998). Dies stützen weitere Untersuchungen von Mariani *et al.*, bei denen die Internalisierung von CCR4 durch CCL22 um ein Vielfaches potenter war als durch CCL17. Die Autoren schlussfolgerten, dass CCL22 den dominanten Liganden darstellt und beschrieben ein sequentielles Wirken beider Moleküle bei der Lymphozytenmigration (Mariani *et al.* 2004). In heutigen Übersichtsarbeiten werden CCL22 und CCL17 weiterhin als einzige Liganden von CCR4 beschrieben (Hughes *et al.* 2018, Ozga *et al.* 2021). Unsere übereinstimmenden Ergebnisse mit dem heutigen Kenntnisstand über die CCR4-Chemokinachse dienen als *Proof of Concept* dieser Anwendung des *Proximity Labelings* und bestätigen dessen Funktionalität.

Für die beiden verkürzten Formen von CCL22 konnten wir keine spezifische Bindung an CCR4 im Durchflusszytometer nachweisen. Ebenso zeigte sich keine Migration der CCR4<sup>+</sup>-Zelllinie anhand ihrer Chemokingradienten. Unsere Ergebnisse stützen die weit verbreitete These eines negativen Feedback-Mechanismus, bei dem CCL22 durch die Dipeptidylpeptidase IV (DPP4) trunziert und inaktiviert wird. Durch mehrfache Trunkierung der Exopeptidase entstehen um jeweils zwei Aminosäuren verkürzte Abkömmlinge (3-69)CCL22 und (5-69)CCL2, die dadurch ihre biologische Aktivität verlieren oder verändern. Bereits 1999 beschrieben Proost *et al.* diesen Vorgang und zeigten, den Verlust der CCR4 abhängigen Migration nach Trunkierung (Proost *et al.* 1999). Die Reproduktion dieser Bindungseigenschaften diente der weiteren Validierung des APEX2 *Proximity Labelings* und verdeutlicht die Funktionalität der Methodik. Es blieb die Frage nach der vorbeschriebenen möglichen CCR4-unabhängigen Migration durch die verkürzten Moleküle. Dieser Fragestellung sind wir im Rahmen des Rezeptor-*Screenings* nachgegangen.

Im durchgeführten Rezeptor-*Screening* wurde auf eine Zell-Bibliothek zurückgegriffen, die aus mehreren B3Z-Zelllinien besteht, die je einen Chemokinrezeptor überexprimieren. Mittels dieses *Screening*-Verfahrens ließen sich in kurzer Zeit alle bekannten CC-Chemokinrezeptoren und CXCR3 hinsichtlich ihrer Bindung mit Fusionsproteinen untersuchen. Wir konnten darin weder für CCL22 noch für die trunzierten Formen einen weiteren reaktiven Rezeptor identifizieren. Bis heute steht zur Diskussion, ob es für CCL22 oder seine Derivate einen weiteren, bisher unbekanntem Rezeptor gibt (Röhrle *et al.* 2020). Diese Vermutung beruht unter anderem auf der Beobachtung, dass (3-69)CCL22, welches in Versuchen von Struyf *et al.* keine Bindung zu CCR4 aufwies, dennoch einen antiviralen Effekt beibehielt (Struyf *et al.* 1998). Zusätzlich wurde beobachtet, dass humane Monozyten in gleichem Maße auf CCL22 und (3-69)CCL22 migrierten. Die Forschenden postulierten daher mindestens einen

weiteren, bisher unbekanntem Rezeptor, der sowohl CCL22, als auch (3-69)CCL22 bindet. In unseren Versuchen wurden lediglich murine Fusionsproteine und Chemokinrezeptoren untersucht, wobei die Daten von Struyf et al. anhand von humanen Monozyten entstanden sind. Interessant wären daher Migrationsversuche humaner mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) anhand humaner Fusionsproteine. Insgesamt kann das Rezeptor-*Screening* als erfolgreicher Versuch gewertet werden, der die Spezifität der Konstrukte unterstreicht, indem keine relevante Biotinylierung bei anderen Chemokinrezeptoren aufgetreten ist, was dem heutigen Wissenstand über die untersuchte Rezeptorachse entspricht.

In die anhaltende Diskussion über einen weiteren Rezeptor für CCL22 oder seine Abkömmlinge müssen auch neue Erkenntnisse über die Biologie von Chemokinrezeptoren wie CCR4 einfließen. Diese lassen die Möglichkeit einer zusätzlichen Zustandsform von CCR4 mit jeweils selektiven Bindungseigenschaften als hochwahrscheinlich erscheinen (Viney et al. 2014). Dies stünde im Einklang damit, dass die Interaktion von Chemokinen und ihren Rezeptoren zellspezifisch und deutlich vielschichtiger und komplexer sein können als lange angenommen und stellt eine mögliche Erklärung für die zellspezifische Migration auf CCL22 und seine Derivate dar (Kleist et al. 2016, Sanchez et al. 2019).

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse des *Proximity Labelings* anhand der CCL22-CCL17-CCR4-Achse und des Rezeptor-*Screenings* für eine hochspezifische und sensitive Funktionsweise des Systems und bilden eine Grundlage für zukünftige Anwendungen dieser Art.

#### **4.4 Stärken sowie Limitationen des APEX2 *Proximity Labelings***

Für die Suche neuer Rezeptoren von Liganden steht eine Vielzahl bereits gut etablierter Methoden zur Auswahl. Diese bringen jeweils unterschiedliche Vor- und Nachteile mit sich, weshalb die Wahl von der genau zu beantwortenden Fragestellung abhängig ist. Es gibt immer noch Chemokine, deren Rezeptoren unbekannt sind oder bei denen weitere Rezeptoren vermutet werden. In solchen Fragestellungen liegt der zentrale Vorteil der Anwendung im Vergleich zu vielen bisher bestehenden Methoden. Es können bei bekanntem Liganden auch zuvor unbekannte Rezeptoren identifiziert werden. Alternative Verfahren wie der einleitend beschriebene Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) sind zur Suche bisher unbekannter Rezeptoren eher ungeeignet, da hier der Rezeptor selbst Fluorochrom-gekoppelt werden muss. Charest-Morin et al. zeigten

beispielsweise durch Fusion von APEX mit Parathormon die Markierung des dazugehörigen Parathormon-Rezeptors (Charest-Morin *et al.* 2017). Bei unserer Anwendung des APEX2 *Proximity Labelings* können ausgehend von APEX2-fusionierten Chemokinen deren funktionelle Rezeptoren mit Hilfe einer kovalenten Biotinylierung identifiziert werden. Voraussetzung dazu ist es, dass die Chemokine ihr Bindungsverhalten trotz Fusion mit APEX2 beibehalten, was wir in unserem Fall zeigen konnten (Abbildung 8).

Zusätzlich vorteilhaft ist die Sensitivität der Methode mit der Möglichkeit zwischen feinen Abweichungen im Bindungsverhalten unterscheiden zu können. Die differente Affinität von CCL22 und CCL17 zu CCR4 konnten wir mittels FACS nachweisen (Abbildung 12). Ebenso bietet die Anwendung den großen Vorteil als *Screening*-Methode im Hochdurchsatzverfahren eine Vielzahl an Rezeptoren zu ihrem Bindungsverhalten zu untersuchen. In unserem *Screening*, bei dem alle CC-Rezeptoren auf ihre Bindung zu den fünf Chemokinen untersucht wurden, konnte außer CCR4 kein neuer Rezeptor identifiziert werden (Abbildung 13). Gleichzeitig verdeutlicht dieser Versuch die Spezifität des Systems, da keine falsch-positiven Ergebnisse auftraten.

Ein wichtiges Merkmal der APEX2-Methode ist die Vielfalt an verfügbaren Analysemethoden zur Untersuchung von Proteininteraktionen durch kovalente Biotinylierung. Dadurch ist eine Analyse mittels FACS, Konfokalmikroskopie, Westernblot und sogar Massenspektrometrie möglich. Markmiller *et al.* konnten durch APEX *Proximity Labeling* und anschließende Massenspektrometrie im Intrazellularraum ~ 150 neuartige Bestandteile von Stressgranula aufzeigen, während Rhee *et al.* mittels Immunhistochemie und Massenspektrometrie neue Proteininteraktionen innerhalb der Mitochondrienmembran nachwiesen (Markmiller *et al.* 2018, Rhee *et al.* 2013).

Idealerweise wird die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor möglichst wenig beeinflusst. Hier liegt eine Stärke der einleitend beschriebenen Co-Immunpräzipitation, bei der die Bindungspartner nicht gentechnisch verändert werden müssen. Leider bringen die hier anschließend notwendige Lyse und die Voraussetzung passender Antikörper entscheidende Nachteile mit sich, die zum Ausschluss des Verfahrens für unsere Fragestellung führen.

Ein Vorteil des APEX2-basierten *Screenings* im Vergleich zu etablierten Verfahren wie Migrationsversuchen oder Messung des Calciumeinstroms besteht darin, dass hier die Ligandenbindung unabhängig des ausgelösten Signalweges untersucht wird. Gerade vor dem Hintergrund des *biased signalings* ist zu beachten, dass Chemokine mehr als reine Migration auslösen können und die einzelnen Signalwege auch vom jeweiligen

Zelltyp abhängig sein können (Corbisier *et al.* 2015). Beispielsweise ist es bekannt, dass CXCR4 über Heterodimere mit CXCR7 Calciumsignalwege vermittelt, während die Bindung von CXCL12 an CXCR4 allein nicht Calcium-vermittelt abläuft (Doijen *et al.* 2017). Daher bietet die isolierte Calciumstrom-Messung das Risiko Proteininteraktionen zu übersehen.

Wichtigste Voraussetzung zur Anwendung des APEX2 *Proximity Labelings* ist die Klonierung eines modifizierten Liganden. Es ist wichtig zu betonen, dass sich die Versuchsergebnisse folglich zunächst auf die Interaktion dieses modifizierten Moleküls beziehen. Um Aussagen über das ursprüngliche Chemokin treffen zu können, sind Validierungsversuche mit rekombinanten Proteinen unverzichtbar. Zwar konnten wir für die von uns untersuchten Fusionsproteine keine Veränderung der Bindungseigenschaften nachweisen, aber diese Art der Vorversuche sind auch für zukünftige Fusionsproteine notwendig.

In dieser Arbeit wurde weitgehend mit transduzierten Zelllinien gearbeitet. Ein wichtiger nächster Schritt ist es, mit dem System auch endogen exprimierte Chemokinrezeptoren nachzuweisen. Hierbei sind mehrere mögliche Hürden zu beachten. Durch geringere Expression von endogenen Rezeptoren können Abweichungen vom Versuchsprotokoll notwendig sein. Die jeweilige Konzentration an eingesetztem APEX2, sowie die Inkubationszeiten sollten für jede Anwendung neu evaluiert und gegebenenfalls angepasst werden. Hierzu passend wurden für einzelne Anwendungen des APEX2 *Proximity Labeling* bereits mehrere optimierte Protokolle veröffentlicht (Ahamed *et al.* 2022, Peterson *et al.* 2021, Tan *et al.* 2020, Xue *et al.* 2017). Die Handhabung primärer Zellen in Suspension bringt zusätzliche Hürden mit sich. Die Notwendigkeit zusätzlicher Zentrifugationsschritte beeinflusst die Vitalität und somit die auszuwertende Zellzahl. Zu berücksichtigen ist außerdem, dass primäre Zellen eine abweichende Dynamik der Rezeptorinternalisierung aufweisen können, was Einfluss auf die zu wählenden Inkubationszeiten hat. Durch Berücksichtigen der erwähnten Punkte ist es unser Ziel, zukünftig das APEX2 *Proximity Labeling* konsistent auch an primären Zellen anzuwenden. Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Anwendung des APEX2 *Proximity Labelings* zur Untersuchung von Chemokin-Rezeptor-Interaktionen auf Zelllinien beschränkt, was genutzt werden kann, um grundlegende Erkenntnisse zum Bindungsverhalten von Rezeptoren und Liganden zu erzielen.

## 4.5 Ausblick über mögliche weitere Anwendungsgebiete

Die hier gezeigte Anwendung des APEX2 *Proximity Labelings* dient als *Proof of Concept* zur Charakterisierung von Chemokin-Rezeptor Interaktionen. Unsere Arbeiten bauen auf einer Vielzahl an intrazellulären Anwendungen auf und zeigen erstmalig den Einsatz dieser Methode anhand von Chemokinrezeptoren. Denkbar ist es, das in dieser Arbeit gezeigte Vorgehen auch auf andere Chemokin-Rezeptor-Achsen zu übertragen, um beispielsweise die bisher unbekanntenen Rezeptoren von CXCL14 und CXCL17 zu identifizieren. Vor jeder neuen Anwendung müssen allerdings die hier beschriebenen Validierungsuntersuchungen durchgeführt werden.

Die APEX2 vermittelte Biotinylierung eines Proteins stellt eine kovalente Bindung dar. Mittels Streptavidin-*Pulldown* kann biotinyliertes Protein isoliert und aufgereinigt werden. Im Anschluss ist es denkbar, über Massenspektrometrie das Protein zu identifizieren, welches mit den Fusionsproteinen interagiert hat. So könnten auch komplizierte Zustandsformen wie Homo- oder Heterodimerisierungen, sowie posttranslationale Modifikationen von Chemokinrezeptoren identifiziert werden, die eine bisher unterschätzte Rolle zu spielen scheinen und das Bindungs- sowie Signalverhalten stark verändern können (Kleist *et al.* 2016).

Daneben ist es denkbar, das APEX2 *Proximity Labeling* als zusätzliche Methode zur Validierung von Antikörpern zu verwenden. Bei der Untersuchung eines Chemokinrezeptor-blockierenden Antikörpers wie anti-CCR4 ist eine verminderte Biotinylierung durch CCL22-APEX2 zu erwarten. Dadurch wäre es möglich, zukünftig die Wirkung von Chemokin- oder Chemokinrezeptor-Antikörpern anhand der veränderten Biotinylierung zu untersuchen. Dies ist auch klinisch von wichtiger Bedeutung, da bereits drei Chemokinrezeptor-gerichtete Therapien zugelassen sind und weitere erwartet werden (Lai *et al.* 2021, Sato *et al.* 2023).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das APEX2 *Proximity Labeling* System nach vorangegangenen Klonierungs- und Etablierungsarbeiten auch anhand von Chemokin-Rezeptor-Achsen vielseitig einsetzbar ist. Es kann neben bestehenden Verfahren einen bedeutenden Beitrag als *Screening-* und *Analyse-Methode* zur Charakterisierung von Chemokinbindungen leisten. Den Forschenden sollten jedoch die Grenzen der Methode bekannt sein, und die Ergebnisse sollten stets im Zusammenhang weiterer Untersuchungen diskutiert werden.

## 5. Zusammenfassung

Chemokine spielen bei der Steuerung des angeborenen und adaptiven Immunsystems eine zentrale Rolle. Gemeinsam bilden Chemokine und ihre Rezeptoren ein komplexes Netzwerk mit einer Vielzahl möglicher Signalwege. Veränderungen dieser Interaktionen treten bei einer Vielzahl von Erkrankungen auf und sind vor allem in der Tumorummunologie von kritischer Bedeutung. Es gibt daher zahlreiche Ansätze einer therapeutischen Blockade von Chemokinen oder deren Rezeptoren. Bis heute allerdings sind manche Interaktionen noch nicht verstanden und es gibt Chemokine, deren Rezeptoren weiterhin unbekannt sind. Zur Aufklärung dieser offenen Fragen stehen mehrere Untersuchungsmethoden zur Verfügung, wobei jede Technik spezifische Vorzüge und Limitationen aufweist. Die Herausforderung besteht darin, neue Ansätze zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Chemokinen und Rezeptoren zu entwickeln, die es ermöglichen, deren Bindungsverhalten mit hohem Durchsatz und Präzision zu analysieren.

Eine neuartige Methode zur Charakterisierung von Proteininteraktionen stellt das sogenannte APEX2 Proximity Labeling dar. Hierbei wird das Enzym APEX2 mit einem Protein fusioniert, um dessen Interaktionspartner identifizieren zu können. Diese Methode wurde für die Charakterisierung intrazellulärer Signalwege entwickelt und zunächst auch nur hierfür eingesetzt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das APEX2 Proximity Labeling so zu adaptieren, dass es die Charakterisierung extrazellulärer Chemokin-Rezeptor-Interaktionen ermöglicht.

In dieser Arbeit konnten mehrere Fusionsproteine aus APEX2 und dem Chemokin CCL22 generiert und im Hinblick auf ihre Bindungseigenschaften an den bislang bekannten Rezeptor CCR4 untersucht werden. Die Fusionsproteine waren funktionell aktiv und induzierten Migration von CCR4<sup>+</sup> Zellen ebenso gut wie das native Protein, was den Schluss zulässt, dass die Fusion die Bindungseigenschaften nicht beeinträchtigt hat. Die Funktionalität von APEX2 wurde durch die hochspezifische Biotinylierung von extrazellulärem CCR4 nachgewiesen, was durch Westernblot, konfokale Mikroskopie und Durchflusszytometrie bestätigt werden konnte. Darüber hinaus wurde die Robustheit des Systems demonstriert, indem aus einem heterogenen Zellgemisch selektiv CCR4-positive Zellen biotinyliert wurden. Dies zeigt, dass die Methode auch extrazellulär zur Identifizierung von Chemokinrezeptoren einsetzbar ist. Abschließend wurde ein Rezeptor-Screening über sämtliche CC-Rezeptoren durchgeführt und CCL22 als Bindungspartner von CCR4 bestätigt. Weitere

Bindungspartner wurden nicht identifiziert. Der zentrale Vorteil der Methode ist es, Proteininteraktionen ausgehend von nur einem Interaktionspartner zu identifizieren und vielfältige Auswertungsmöglichkeiten mit hohem Durchsatz zu bieten.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die Methode des Proximity Labelings auch im Extrazellulärraum zur Untersuchung von Chemokinrezeptoren anwendbar ist. Es konnte dabei bestätigt werden, dass das Chemokin CCL22 im murinen System exklusiv an CCR4 bindet. Damit dient diese Arbeit als Machbarkeitsnachweis für die Nutzung von APEX2-Fusionsproteinen zur Identifizierung von Chemokin-Rezeptor-Wechselwirkungen. Dieses Verständnis ist in hohem Maße relevant für die Entwicklung von Substanzen, die therapeutisch in diese Signalwege eingreifen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Ahamed M, Jaisinghani N, Li M, Winkeler I, Silva S, Previti ML, Seeliger JC. Optimized APEX2 peroxidase-mediated proximity labeling in fast- and slow-growing mycobacteria.  
*Methods Enzymol* 2022; 664:267-89.
2. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood.  
*J Exp Med* 1997; 185:111-20.
3. Ajram L, Begg M, Slack R, Cryan J, Hall D, Hodgson S, Ford A, Barnes A, Swieboda D, Mousnier A, Solari R. Internalization of the chemokine receptor CCR4 can be evoked by orthosteric and allosteric receptor antagonists.  
*Eur J Pharmacol* 2014; 729:75-85.
4. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism.  
*Annu Rev Immunol* 2007; 25:787-820.
5. Annunziato F, Romagnani P, Cosmi L, Beltrame C, Steiner BH, Lazzeri E, Raport CJ, Galli G, Manetti R, Mavilia C, Vanini V, Chantry D, Maggi E, Romagnani S. Macrophage-derived chemokine and EBI1-ligand chemokine attract human thymocytes in different stage of development and are produced by distinct subsets of medullary epithelial cells: possible implications for negative selection.  
*J Immunol* 2000; 165:238-46.
6. Antonsson B, De Lys P, Dechavanne V, Chevalet L, Boschert U. In vivo processing of CXCL12 $\alpha$ /SDF-1 $\alpha$  after intravenous and subcutaneous administration to mice.  
*Proteomics* 2010; 10:4342-51.
7. Arimont M, Hoffmann C, de Graaf C, Leurs R. Chemokine Receptor Crystal Structures: What Can Be Learned from Them?  
*Mol Pharmacol* 2019; 96:765-77.
8. Arimont M, Sun SL, Leurs R, Smit M, de Esch IJP, de Graaf C. Structural Analysis of Chemokine Receptor-Ligand Interactions.  
*J Med Chem* 2017; 60:4735-79.
9. Ariotti N, Hall TE, Rae J, Ferguson C, McMahon KA, Martel N, Webb RE, Webb RI, Teasdale RD, Parton RG. Modular Detection of GFP-Labeled Proteins for Rapid Screening by Electron Microscopy in Cells and Organisms.  
*Dev Cell* 2015; 35:513-25.
10. Bachelierie F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M, Luster AD, Mantovani A, Matsushima K,

- Murphy PM, Nibbs R, Nomiya H, Power CA, Proudfoot AE, Rosenkilde MM, Rot A, Sozzani S, Thelen M, Yoshie O, Zlotnik A.  
International Union of Basic and Clinical Pharmacology. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors.  
*Pharmacol Rev* 2014; 66:1-79.
11. Bajar BT, Wang ES, Zhang S, Lin MZ, Chu J.  
A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs.  
*Sensors (Basel, Switzerland)* 2016; 16:1488.
12. Barreira da Silva R, Laird ME, Yatim N, Fiette L, Ingersoll MA, Albert ML.  
Dipeptidylpeptidase 4 inhibition enhances lymphocyte trafficking, improving both naturally occurring tumor immunity and immunotherapy.  
*Nat Immunol* 2015; 16:850-8.
13. Bennett LD, Fox JM, Signoret N.  
Mechanisms regulating chemokine receptor activity.  
*Immunology* 2011; 134:246-56.
14. Berger EA, Murphy PM, Farber JM.  
Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease.  
*Annu Rev Immunol* 1999; 17:657-700.
15. Bonecchi R, Locati M, Galliera E, Vulcano M, Sironi M, Fra AM, Gobbi M, Vecchi A, Sozzani S, Haribabu B, Van Damme J, Mantovani A.  
Differential recognition and scavenging of native and truncated macrophage-derived chemokine (macrophage-derived chemokine/CC chemokine ligand 22) by the D6 decoy receptor.  
*J Immunol* 2004; 172:4972-6.
16. Bronger H, Magdolen V, Goettig P, Dreyer T.  
Proteolytic chemokine cleavage as a regulator of lymphocytic infiltration in solid tumors.  
*Cancer Metastasis Rev* 2019; 38:417-30.
17. Broxmeyer HE.  
Chemokines in hematopoiesis.  
*Curr Opin Hematol* 2008; 15:49-58.
18. Cambien B, Karimjee BF, Richard-Fiardo P, Bziouech H, Barthel R, Millet MA, Martini V, Birnbaum D, Scoazec JY, Abello J, Al Saati T, Johnson MG, Sullivan TJ, Medina JC, Collins TL, Schmid-Alliana A, Schmid-Antomarchi H.  
Organ-specific inhibition of metastatic colon carcinoma by CXCR3 antagonism.  
*Br J Cancer* 2009; 100:1755-64.
19. Cao L, Hu X, Zhang J, Huang G, Zhang Y.  
The role of the CCL22-CCR4 axis in the metastasis of gastric cancer cells into omental milky spots.  
*J Transl Med* 2014; 12:267.
20. Charest-Morin X, Poubelle PE, Marceau F.  
Production and evaluation of parathyroid hormone receptor1 ligands with intrinsic or assembled peroxidase domains.  
*Sci Rep* 2017; 7:13099.

21. Charest-Morin X, Poubelle PE, Marceau F.  
Production and evaluation of parathyroid hormone receptor(1) ligands with intrinsic or assembled peroxidase domains.  
*Sci Rep* 2017; 7:13099.
22. Charo IF, Ransohoff RM.  
The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation.  
*N Engl J Med* 2006; 354:610-21.
23. Chheda ZS, Sharma RK, Jala VR, Luster AD, Haribabu B.  
Chemoattractant Receptors BLT1 and CXCR3 Regulate Antitumor Immunity by Facilitating CD8+ T Cell Migration into Tumors.  
*J Immunol* 2016; 197:2016-26.
24. Chow MT, Ozga AJ, Servis RL, Frederick DT, Lo JA, Fisher DE, Freeman GJ, Boland GM, Luster AD.  
Intratumoral Activity of the CXCR3 Chemokine System Is Required for the Efficacy of Anti-PD-1 Therapy.  
*Immunity* 2019; 50:1498-512.e5.
25. Christopherson KW, 2nd, Hangoc G, Broxmeyer HE.  
Cell surface peptidase CD26/dipeptidylpeptidase IV regulates CXCL12/stromal cell-derived factor-1 alpha-mediated chemotaxis of human cord blood CD34+ progenitor cells.  
*J Immunol* 2002; 169:7000-8.
26. Corbisier J, Galès C, Huszagh A, Parmentier M, Springael JY.  
Biased signaling at chemokine receptors.  
*J Biol Chem* 2015; 290:9542-54.
27. Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Baggiolini M, Sykes BD, Clark-Lewis I.  
Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1.  
*Embo j* 1997; 16:6996-7007.
28. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W.  
Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival.  
*Nat Med* 2004; 10:942-9.
29. Curnock AP, Logan MK, Ward SG.  
Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases.  
*Immunology* 2002; 105:125-36.
30. Dai J, Almazan TH, Hong EK, Khodadoust MS, Arai S, Weng WK, Kim YH.  
Potential Association of Anti-CCR4 Antibody Mogamulizumab and Graft-vs-Host Disease in Patients With Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome.  
*JAMA Dermatol* 2018; 154:728-30.
31. Daly C, Rollins BJ.

Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies.

*Microcirculation* 2003; 10:247-57.

32. Daugherty BL, Siciliano SJ, Springer MS. Radiolabeled chemokine binding assays. *Chemokine Protocols: Springer*; 2000:129-34.

33. de Jong LA, Uges DR, Franke JP, Bischoff R.

Receptor-ligand binding assays: technologies and applications.

*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 829:1-25.

34. Dingar D, Kalkat M, Chan PK, Srikumar T, Bailey SD, Tu WB, Coyaud E, Ponzielli R, Kolyar M, Jurisica I, Huang A, Lupien M, Penn LZ, Raught B.

BioID identifies novel c-MYC interacting partners in cultured cells and xenograft tumors.

*J Proteomics* 2015; 118:95-111.

35. Dixit N, Simon SI.

Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest.

*Front Immunol* 2012; 3:188-.

36. Doijen J, Van Loy T, De Haes W, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L, Schols D.

Signaling properties of the human chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 by cellular electric impedance measurements.

*PLoS One* 2017; 12:e0185354.

37. Dumrongprechachan V, Salisbury RB, Soto G, Kumar M, MacDonald ML, Kozorovitskiy Y.

Cell-type and subcellular compartment-specific APEX2 proximity labeling reveals activity-dependent nuclear proteome dynamics in the striatum.

*Nat Commun* 2021; 12:4855.

38. Dyer DP, Medina-Ruiz L, Bartolini R, Schuette F, Hughes CE, Pallas K, Vidler F, Macleod MKL, Kelly CJ, Lee KM, Hansell CAH, Graham GJ.

Chemokine Receptor Redundancy and Specificity Are Context Dependent.

*Immunity* 2019; 50:378-89.e5.

39. Erdmann I, Marter K, Kobler O, Niehues S, Abele J, Müller A, Bussmann J, Storkebaum E, Ziv T, Thomas U, Dieterich DC.

Cell-selective labelling of proteomes in *Drosophila melanogaster*.

*Nat Commun* 2015; 6:7521.

40. Fätkenheuer G, Pozniak AL, Johnson MA, Plettenberg A, Staszewski S, Hoepelman AI, Saag MS, Goebel FD, Rockstroh JK, Dezube BJ, Jenkins TM, Medhurst C, Sullivan JF, Ridgway C, Abel S, James IT, Youle M, van der Ryst E. Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1.

*Nat Med* 2005; 11:1170-2.

41. Faustino L, da Fonseca DM, Takenaka MC, Mirotti L, Florsheim EB, Guerreschi MG, Silva JS, Basso AS, Russo M.

Regulatory T cells migrate to airways via CCR4 and attenuate the severity of airway allergic inflammation.

*J Immunol* 2013; 190:2614-21.

42. Flanagan CA.

GPCR-radioligand binding assays.

*Methods Cell Biol* 2016; 132:191-215.

43. Flomenberg N, Devine SM, Dipersio JF, Liesveld JL, McCarty JM, Rowley SD, Vesole DH, Badel K, Calandra G.

The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone.

*Blood* 2005; 106:1867-74.

44. Förster T.

Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz.

*Annalen der Physik* 1948; 437:55-75.

45. Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, Zhang Z, Yang H, Zhang H, Zhou C, Yao J, Jin L, Wang H, Yang Y, Fu YX, Wang FS.

Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients.

*Gastroenterology* 2007; 132:2328-39.

46. Galli G, Chantry D, Annunziato F, Romagnani P, Cosmi L, Lazzeri E, Manetti R, Maggi E, Gray PW, Romagnani S.

Macrophage-derived chemokine production by activated human T cells in vitro and in vivo: preferential association with the production of type 2 cytokines.

*Eur J Immunol* 2000; 30:204-10.

47. Galon J, Bruni D.

Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies.

*Nat Rev Drug Discov* 2019; 18:197-218.

48. Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I.

Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes.

*Cell Calcium* 2000; 27:97-106.

49. Gerrits H, van Ingen Schenau DS, Bakker NE, van Disseldorp AJ, Strik A, Hermens LS, Koenen TB, Krajnc-Franken MA, Gossen JA.

Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice.

*Genesis* 2008; 46:235-45.

50. Ghia P, Transidico P, Veiga JP, Schaniel C, Sallusto F, Matsushima K, Sallan SE, Rolink AG, Mantovani A, Nadler LM, Cardoso AA.

Chemoattractants MDC and TARC are secreted by malignant B-cell precursors following CD40 ligation and support the migration of leukemia-specific T cells.

*Blood* 2001; 98:533-40.

51. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, Biota C, Doffin AC, Durand I, Olive D, Perez S, Pasqual N, Faure C, Ray-Coquard I, Puisieux A, Caux C, Blay JY, Ménétrier-Caux C.

Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome.

*Cancer Res* 2009; 69:2000-9.

52. Godiska R, Chantry D, Raport CJ, Sozzani S, Allavena P, Leviten D, Mantovani A, Gray PW.

Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells.

*J Exp Med* 1997; 185:1595-604.

53. Guan E, Wang J, Roderiquez G, Norcross MA.

Natural truncation of the chemokine MIP-1 beta /CCL4 affects receptor specificity but not anti-HIV-1 activity.

*J Biol Chem* 2002; 277:32348-52.

54. Guo L, Feng K, Wang YC, Mei JJ, Ning RT, Zheng HW, Wang JJ, Worthen GS, Wang X, Song J, Li QH, Liu LD.

Critical role of CXCL4 in the lung pathogenesis of influenza (H1N1) respiratory infection.

*Mucosal Immunol* 2017; 10:1529-41.

55. Gupta P, Sharma PK, Mir H, Singh R, Singh N, Kloecker GH, Lillard JW, Jr., Singh S.

CCR9/CCL25 expression in non-small cell lung cancer correlates with aggressive disease and mediates key steps of metastasis.

*Oncotarget* 2014; 5:10170-9.

56. Ha H, Debnath B, Neamati N.

Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases.

*Theranostics* 2017; 7:1543-88.

57. Han S, Zhao BS, Myers SA, Carr SA, He C, Ting AY.

RNA-protein interaction mapping via MS2- or Cas13-based APEX targeting.

*Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117:22068-79.

58. Hansell CA, Schiering C, Kinstrie R, Ford L, Bordon Y, McInnes IB, Goodyear CS, Nibbs RJ.

Universal expression and dual function of the atypical chemokine receptor D6 on innate-like B cells in mice.

*Blood* 2011; 117:5413-24.

59. Hansell CAH, Love S, Pinggen M, Wilson GJ, MacLeod M, Graham GJ.

Analysis of lung stromal expression of the atypical chemokine receptor ACKR2 reveals unanticipated expression in murine blood endothelial cells.

*Eur J Immunol* 2020; 50:666-75.

60. Hauser MA, Kindinger I, Laufer JM, Späte AK, Bucher D, Vanes SL, Krueger WA, Wittmann V, Legler DF.

Distinct CCR7 glycosylation pattern shapes receptor signaling and endocytosis to modulate chemotactic responses.

*J Leukoc Biol* 2016; 99:993-1007.

61. Heiseke AF, Faul AC, Lehr HA, Förster I, Schmid RM, Krug AB, Reindl W.

CCL17 promotes intestinal inflammation in mice and counteracts regulatory T cell-mediated protection from colitis.

*Gastroenterology* 2012; 142:335-45.

62. Hong M, Puaux AL, Huang C, Loumagne L, Tow C, Mackay C, Kato M, Prévost-Blondel A, Avril MF, Nardin A, Abastado JP.  
Chemotherapy induces intratumoral expression of chemokines in cutaneous melanoma, favoring T-cell infiltration and tumor control.  
*Cancer Res* 2011; 71:6997-7009.
63. Hopkins C, Gibson A, Stinchcombe J, Futter C.  
Chimeric molecules employing horseradish peroxidase as reporter enzyme for protein localization in the electron microscope.  
*Methods Enzymol* 2000; 327:35-45.
64. Horikawa T, Nakayama T, Hikita I, Yamada H, Fujisawa R, Bito T, Harada S, Fukunaga A, Chantry D, Gray PW, Morita A, Suzuki R, Tezuka T, Ichihashi M, Yoshie O.  
IFN-gamma-inducible expression of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 and macrophage-derived chemokine/CCL22 in epidermal keratinocytes and their roles in atopic dermatitis.  
*Int Immunol* 2002; 14:767-73.
65. Hughes CE, Nibbs RJB.  
A guide to chemokines and their receptors.  
*Febs j* 2018; 285:2944-71.
66. Ifuku H, Kusumoto S, Tanaka Y, Totani H, Ishida T, Okada M, Murakami S, Mizokami M, Ueda R, Iida S.  
Fatal reactivation of hepatitis B virus infection in a patient with adult T-cell leukemia-lymphoma receiving the anti-CC chemokine receptor 4 antibody mogamulizumab.  
*Hepatol Res* 2015; 45:1363-7.
67. Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J, Gray PW, Matsushima K, Yoshie O.  
Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine.  
*Int Immunol* 1999; 11:81-8.
68. Inngjerdingen M, Damaj B, Maghazachi AA.  
Human NK cells express CC chemokine receptors 4 and 8 and respond to thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine, and I-309.  
*J Immunol* 2000; 164:4048-54.
69. Ishida T, Ishii T, Inagaki A, Yano H, Komatsu H, Iida S, Inagaki H, Ueda R.  
Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege.  
*Cancer Res* 2006; 66:5716-22.
70. Johnson EL, Singh R, Singh S, Johnson-Holiday CM, Grizzle WE, Partridge EE, Lillard JW, Jr.  
CCL25-CCR9 interaction modulates ovarian cancer cell migration, metalloproteinase expression, and invasion.  
*World J Surg Oncol* 2010; 8:62.
71. Jørgensen AS, Rosenkilde MM, Hjortø GM.

Biased signaling of G protein-coupled receptors - From a chemokine receptor CCR7 perspective.

*Gen Comp Endocrinol* 2018; 258:4-14.

72. Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Mitsui H, Tada Y, Saeki H, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K.

Serum macrophage-derived chemokine (MDC) levels are closely related with the disease activity of atopic dermatitis.

*Clin Exp Immunol* 2002; 127:270-3.

73. Kanazawa N, Nakamura T, Tashiro K, Muramatsu M, Morita K, Yoneda K, Inaba K, Imamura S, Honjo T.

Fractalkine and macrophage-derived chemokine: T cell-attracting chemokines expressed in T cell area dendritic cells.

*Eur J Immunol* 1999; 29:1925-32.

74. Kawada K, Hosogi H, Sonoshita M, Sakashita H, Manabe T, Shimahara Y, Sakai Y, Takabayashi A, Oshima M, Taketo MM.

Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes.

*Oncogene* 2007; 26:4679-88.

75. Kleist AB, Getschman AE, Ziarek JJ, Nevins AM, Gauthier PA, Chevigné A, Szpakowska M, Volkman BF.

New paradigms in chemokine receptor signal transduction: Moving beyond the two-site model.

*Biochem Pharmacol* 2016; 114:53-68.

76. Kothapalli N, Camporeale G, Kueh A, Chew YC, Oommen AM, Griffin JB, Zempleni J.

Biological functions of biotinylated histones.

*J Nutr Biochem* 2005; 16:446-8.

77. Kuehnemuth B, Piseddu I, Wiedemann GM, Lauseker M, Kuhn C, Hofmann S, Schmoeckel E, Endres S, Mayr D, Jeschke U, Anz D.

CCL1 is a major regulatory T cell attracting factor in human breast cancer.

*BMC Cancer* 2018; 18:1278.

78. Laemmli UK.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

*Nature* 1970; 227:680-5.

79. Lai WY, Mueller A.

Latest update on chemokine receptors as therapeutic targets.

*Biochem Soc Trans* 2021; 49:1385-95.

80. Lam SS, Martell JD, Kamer KJ, Deerinck TJ, Ellisman MH, Mootha VK, Ting AY.

Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling.

*Nat Methods* 2015; 12:51-4.

81. Lederman MM, Penn-Nicholson A, Cho M, Mosier D.

Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment.

*Jama* 2006; 296:815-26.

82. Letian A, Lemma EY, Cavaliere P, Dephoure N, Altorki NK, McGraw TE.

Proximity proteome mapping reveals PD-L1-dependent pathways disrupted by anti-PD-L1 antibody specifically in EGFR-mutant lung cancer cells.

*Cell Commun Signal* 2023; 21:58.

83. Li JY, Ou ZL, Yu SJ, Gu XL, Yang C, Chen AX, Di GH, Shen ZZ, Shao ZM.  
The chemokine receptor CCR4 promotes tumor growth and lung metastasis in breast cancer.

*Breast Cancer Res Treat* 2012; 131:837-48.

84. Li YQ, Liu FF, Zhang XM, Guo XJ, Ren MJ, Fu L.

Tumor secretion of CCL22 activates intratumoral Treg infiltration and is independent prognostic predictor of breast cancer.

*PLoS One* 2013; 8:e76379.

85. Lin JS, Lai EM.

Protein-Protein Interactions: Co-Immunoprecipitation.

*Methods Mol Biol* 2017; 1615:211-9.

86. Liu J, Louie S, Hsu W, Yu KM, Nicholas HB, Jr., Rosenquist GL.

Tyrosine sulfation is prevalent in human chemokine receptors important in lung disease.

*Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 38:738-43.

87. Liu L, Doijen J, D'Huys T, Verhaegen Y, Dehaen W, De Jonghe S, Schols D, Van Loy T.

Biological characterization of ligands targeting the human CC chemokine receptor 8 (CCR8) reveals the biased signaling properties of small molecule agonists.

*Biochem Pharmacol* 2021; 188:114565.

88. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC.

Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma.

*J Immunol* 2002; 169:2756-61.

89. Loos T, Mortier A, Gouwy M, Ronsse I, Put W, Lenaerts JP, Van Damme J, Proost P.

Citrullination of CXCL10 and CXCL11 by peptidylarginine deiminase: a naturally occurring posttranslational modification of chemokines and new dimension of immunoregulation.

*Blood* 2008; 112:2648-56.

90. Lu M, Wang Z, Wang Y, Ren B.

CRISPR-Guided Proximity Labeling of RNA-Protein Interactions.

*Genes (Basel)* 2022; 13.

91. Madigan J, Freeman DJ, Menzies F, Forrow S, Nelson SM, Young A, Sharkey A, Moffett A, Graham GJ, Greer IA, Rot A, Nibbs RJ.

Chemokine scavenger D6 is expressed by trophoblasts and aids the survival of mouse embryos transferred into allogeneic recipients.

*J Immunol* 2010; 184:3202-12.

92. Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP.

Radioligand binding assays and their analysis.

*Methods Mol Biol* 2012; 897:31-77.

93. Mailloux AW, Clark AM, Young MR.

NK depletion results in increased CCL22 secretion and Treg levels in Lewis lung carcinoma via the accumulation of CCL22-secreting CD11b+CD11c+ cells.

*Int J Cancer* 2010; 127:2598-611.

94. Mantovani A.

The chemokine system: redundancy for robust outputs.

*Immunol Today* 1999; 20:254-7.

95. Mantovani A, Gray PA, Van Damme J, Sozzani S.

Macrophage-derived chemokine (MDC).

*J Leukoc Biol* 2000; 68:400-4.

96. Maolake A, Izumi K, Shigehara K, Natsagdorj A, Iwamoto H, Kadomoto S, Takezawa Y, Machioka K, Narimoto K, Namiki M, Lin WJ, Wufuer G, Mizokami A. Tumor-associated macrophages promote prostate cancer migration through activation of the CCL22-CCR4 axis.

*Oncotarget* 2017; 8:9739-51.

97. Mariani M, Lang R, Binda E, Panina-Bordignon P, D'Ambrosio D.

Dominance of CCL22 over CCL17 in induction of chemokine receptor CCR4 desensitization and internalization on human Th2 cells.

*Eur J Immunol* 2004; 34:231-40.

98. Markmiller S, Soltanieh S, Server KL, Mak R, Jin W, Fang MY, Luo EC, Krach F, Yang D, Sen A, Fulzele A, Wozniak JM, Gonzalez DJ, Kankel MW, Gao FB, Bennett EJ, Lécuyer E, Yeo GW.

Context-Dependent and Disease-Specific Diversity in Protein Interactions within Stress Granules.

*Cell* 2018; 172:590-604.e13.

99. Marosvölgyi M, Eilert J-C.

Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration mithilfe eines FRET-Sensors.

*BIOspektrum* 2013; 19:285-7.

100. Martell JD, Deerinck TJ, Sancak Y, Poulos TL, Mootha VK, Sosinsky GE, Ellisman MH, Ting AY.

Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy.

*Nat Biotechnol* 2012; 30:1143-8.

101. Martinez de la Torre Y, Buracchi C, Borroni EM, Dupor J, Bonecchi R, Nebuloni M, Pasqualini F, Doni A, Lauri E, Agostinis C, Bulla R, Cook DN, Haribabu B, Meroni P, Rukavina D, Vago L, Tedesco F, Vecchi A, Lira SA, Locati M, Mantovani A.

Protection against inflammation- and autoantibody-caused fetal loss by the chemokine decoy receptor D6.

*Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:2319-24.

102. Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Evanoff HL, Kunkel SL.

Pivotal role of the CC chemokine, macrophage-derived chemokine, in the innate immune response.

*J Immunol* 2000; 164:5362-8.

103. McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 2002; 100:1160-7.
104. Miao M, De Clercq E, Li G. Clinical significance of chemokine receptor antagonists. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2020; 16:11-30.
105. Miller MC, Mayo KH. Chemokines from a Structural Perspective. *Int J Mol Sci* 2017; 18.
106. Mishra RK, Shum AK, Plataniias LC, Miller RJ, Schiltz GE. Discovery and characterization of novel small-molecule CXCR4 receptor agonists and antagonists. *Sci Rep* 2016; 6:30155.
107. Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, Fujii H. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. *Int J Cancer* 2008; 122:2286-93.
108. Montane J, Bischoff L, Soukhatcheva G, Dai DL, Hardenberg G, Levings MK, Orban PC, Kieffer TJ, Tan R, Verchere CB. Prevention of murine autoimmune diabetes by CCL22-mediated Treg recruitment to the pancreatic islets. *J Clin Invest* 2011; 121:3024-8.
109. Moore DC, Elmes JB, Shibu PA, Larck C, Park SI. Mogamulizumab: An Anti-CC Chemokine Receptor 4 Antibody for T-Cell Lymphomas. *Ann Pharmacother* 2020; 54:371-9.
110. Mortier A, Gouwy M, Van Damme J, Proost P, Struyf S. CD26/dipeptidylpeptidase IV-chemokine interactions: double-edged regulation of inflammation and tumor biology. *J Leukoc Biol* 2016; 99:955-69.
111. Mortier A, Van Damme J, Proost P. Regulation of chemokine activity by posttranslational modification. *Pharmacol Ther* 2008; 120:197-217.
112. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 2004; 25:75-84.
113. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410:50-6.
114. Murakami T, Cardones AR, Hwang ST. Chemokine receptors and melanoma metastasis.

*J Dermatol Sci* 2004; 36:71-8.

115. Murdoch C, Finn A.

Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases.

*Blood* 2000; 95:3032-43.

116. Murphy KM, Travers P, Walport M. Janeway Immunologie. Springer Berlin Heidelberg; 2014.

117. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W.

Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy.

*Nat Rev Immunol* 2017; 17:559-72.

118. Nibbs RJ, Kriehuber E, Ponath PD, Parent D, Qin S, Campbell JD, Henderson A, Kerjaschki D, Maurer D, Graham GJ, Rot A.

The beta-chemokine receptor D6 is expressed by lymphatic endothelium and a subset of vascular tumors.

*Am J Pathol* 2001; 158:867-77.

119. Ozga AJ, Chow MT, Luster AD.

Chemokines and the immune response to cancer.

*Immunity* 2021; 54:859-74.

120. Paek J, Kalocsay M, Staus DP, Wingler L, Pascolutti R, Paulo JA, Gygi SP, Kruse AC.

Multidimensional Tracking of GPCR Signaling via Peroxidase-Catalyzed Proximity Labeling.

*Cell* 2017; 169:338-49.e11.

121. Pantelidou C, Sonzogni O, De Oliveria Taveira M, Mehta AK, Kothari A, Wang D, Visal T, Li MK, Pinto J, Castrillon JA, Cheney EM, Bouwman P, Jonkers J, Rottenberg S, Guerriero JL, Wulf GM, Shapiro GI.

PARP Inhibitor Efficacy Depends on CD8(+) T-cell Recruitment via Intratumoral STING Pathway Activation in BRCA-Deficient Models of Triple-Negative Breast Cancer.

*Cancer Discov* 2019; 9:722-37.

122. Parra J, Portilla J, Pulido F, Sánchez-de la Rosa R, Alonso-Villaverde C, Berenguer J, Blanco JL, Domingo P, Dronza F, Galera C, Gutiérrez F, Kindelán JM, Knobel H, Leal M, López-Aldeguer J, Mariño A, Miralles C, Moltó J, Ortega E, Oteo JA. Clinical utility of maraviroc.

*Clin Drug Investig* 2011; 31:527-42.

123. Patterson WR, Poulos TL.

Crystal structure of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase.

*Biochemistry* 1995; 34:4331-41.

124. Peng W, Liu C, Xu C, Lou Y, Chen J, Yang Y, Yagita H, Overwijk WW, Lizée G, Radvanyi L, Hwu P.

PD-1 blockade enhances T-cell migration to tumors by elevating IFN- $\gamma$  inducible chemokines.

*Cancer Res* 2012; 72:5209-18.

125. Peterson CWH, Deol KK, To M, Olzmann JA.

Optimized protocol for the identification of lipid droplet proteomes using proximity labeling proteomics in cultured human cells.

*STAR Protoc* 2021; 2:100579.

126. Plescia CB, David EA, Patra D, Sengupta R, Amiar S, Su Y, Stahelin RV. SARS-CoV-2 viral budding and entry can be modeled using BSL-2 level virus-like particles.

*J Biol Chem* 2020; 296:100103.

127. Praul CA, Brubaker KD, Leach RM, Gay CV.

Detection of endogenous biotin-containing proteins in bone and cartilage cells with streptavidin systems.

*Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247:312-4.

128. Proost P, Schutyser E, Menten P, Struyf S, Wuyts A, Opdenakker G, Detheux M, Parmentier M, Durinx C, Lambeir AM, Neyts J, Liekens S, Maudgal PC, Billiau A, Van Damme J.

Amino-terminal truncation of CXCR3 agonists impairs receptor signaling and lymphocyte chemotaxis, while preserving antiangiogenic properties.

*Blood* 2001; 98:3554-61.

129. Proost P, Struyf S, Schols D, Opdenakker G, Sozzani S, Allavena P, Mantovani A, Augustyns K, Bal G, Haemers A, Lambeir AM, Scharpé S, Van Damme J, De Meester I.

Truncation of macrophage-derived chemokine by CD26/ dipeptidyl-peptidase IV beyond its predicted cleavage site affects chemotactic activity and CC chemokine receptor 4 interaction.

*J Biol Chem* 1999; 274:3988-93.

130. Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, Borlat F, Wells TN, Kosco-Vilbois MH.

Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines.

*Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:1885-90.

131. Rapp M, Grassmann S, Chaloupka M, Layritz P, Kruger S, Ormanns S, Rataj F, Janssen KP, Endres S, Anz D, Kobold S.

C-C chemokine receptor type-4 transduction of T cells enhances interaction with dendritic cells, tumor infiltration and therapeutic efficacy of adoptive T cell transfer.

*Oncolmunology* 2016; 5:e1105428.

132. Rapp M, Wintergerst MWM, Kunz WG, Vetter VK, Knott MML, Lisowski D, Haubner S, Moder S, Thaler R, Eiber S, Meyer B, Rohrlé N, Piseddu I, Grassmann S, Layritz P, Kuhnemuth B, Stutte S, Bourquin C, von Andrian UH, Endres S, Anz D.

CCL22 controls immunity by promoting regulatory T cell communication with dendritic cells in lymph nodes.

*J Exp Med* 2019; 216:1170-81.

133. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J.

The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis.

*Leukemia* 2006; 20:1915-24.

134. Rees JS, Li XW, Perrett S, Lilley KS, Jackson AP.

Selective Proteomic Proximity Labeling Assay Using Tyramide (SPPLAT): A Quantitative Method for the Proteomic Analysis of Localized Membrane-Bound Protein Clusters.

*Curr Protoc Protein Sci* 2017; 88:19 27 1-19 27 18.

135. Rhee HW, Zou P, Udeshi ND, Martell JD, Mootha VK, Carr SA, Ting AY. Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging.

*Science* 2013; 339:1328-31.

136. Richter JR, Sutton JM, Belizaire RM, Friend LA, Schuster RM, Johannigman TA, Miller SG, Lentsch AB, Pritts TA.

Macrophage-derived chemokine (CCL22) is a novel mediator of lung inflammation following hemorrhage and resuscitation.

*Shock* 2014; 42:525-31.

137. Richter R, Jochheim-Richter A, Ciuculescu F, Kollar K, Seifried E, Forssmann U, Verzijl D, Smit MJ, Blanchet X, von Hundelshausen P, Weber C, Forssmann WG, Henschler R.

Identification and characterization of circulating variants of CXCL12 from human plasma: effects on chemotaxis and mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells.

*Stem Cells Dev* 2014; 23:1959-74.

138. Röhrle N, Knott MML, Anz D.

CCL22 Signaling in the Tumor Environment.

*Adv Exp Med Biol* 2020; 1231:79-96.

139. Sanchez J, Z EH, Lane JR, Liu X, Bridgford JL, Payne RJ, Canals M, Stone MJ. Evaluation and extension of the two-site, two-step model for binding and activation of the chemokine receptor CCR1.

*J Biol Chem* 2019; 294:3464-75.

140. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A.

CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression.

*Cancer* 2003; 98:1089-99.

141. Sato T, Yamauchi J, Yagishita N, Araya N, Takao N, Ohta Y, Inoue E, Takahashi M, Yamagishi M, Suzuki Y, Uchimaru K, Matsumoto N, Hasegawa Y, Yamano Y.

Long-term safety and efficacy of mogamulizumab (anti-CCR4) for treating virus-associated myelopathy.

*Brain* 2023; 146:3181-91.

142. Schaniel C, Pardali E, Sallusto F, Speletas M, Ruedl C, Shimizu T, Seidl T, Andersson J, Melchers F, Rolink AG, Sideras P.

Activated murine B lymphocytes and dendritic cells produce a novel CC chemokine which acts selectively on activated T cells.

*J Exp Med* 1998; 188:451-63.

143. Schaniel C, Sallusto F, Ruedl C, Sideras P, Melchers F, Rolink AG.

Three chemokines with potential functions in T lymphocyte-independent and -dependent B lymphocyte stimulation.

*Eur J Immunol* 1999; 29:2934-47.

144. Sibley DR. *G Protein-Coupled Receptor-Protein Interactions*. 1. Auflage, Wiley-VCH Verlag, 2005.
145. Sierra F, Biben C, Martínez-Muñoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, Woehl B, Leung H, Groom J, Batten M, Harvey RP, Martínez AC, Mackay CR, Mackay F. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:14759-64.
146. Singer-Krüger B, Fröhlich T, Franz-Wachtel M, Nalpas N, Macek B, Jansen RP. APEX2-mediated proximity labeling resolves protein networks in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Febs j* 2020; 287:325-44.
147. Singh S, Singh UP, Stiles JK, Grizzle WE, Lillard JW, Jr. Expression and functional role of CCR9 in prostate cancer cell migration and invasion. *Clin Cancer Res* 2004; 10:8743-50.
148. Sistigu A, Yamazaki T, Vacchelli E, Chaba K, Enot DP, Adam J, Vitale I, Goubar A, Baracco EE, Remédios C, Fend L, Hannani D, Aymeric L, Ma Y, Niso-Santano M, Kepp O, Schultze JL, Tüting T, Belardelli F, Bracci L, La Sorsa V, Ziccheddu G, Sestili P, Urbani F, Delorenzi M, Lacroix-Triki M, Quidville V, Conforti R, Spano JP, Pusztaí L, Poirier-Colame V, Delaloge S, Penault-Llorca F, Ladoire S, Arnould L, Cyrta J, Dessoliers MC, Eggermont A, Bianchi ME, Pittet M, Engblom C, Pfirschke C, Prévigne X, Uzè G, Schreiber RD, Chow MT, Smyth MJ, Proietti E, André F, Kroemer G, Zitvogel L. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat Med* 2014; 20:1301-9.
149. Škulj S, Kožić M, Barišić A, Vega A, Biarnés X, Piantanida I, Barisic I, Bertoša B. Comparison of two peroxidases with high potential for biotechnology applications - HRP vs. APEX2. *Comput Struct Biotechnol J* 2024; 23:742-51.
150. Soehnlein O, Drechsler M, Döring Y, Lievens D, Hartwig H, Kemmerich K, Ortega-Gómez A, Mandl M, Vijayan S, Projahn D, Garlich CD, Koenen RR, Hristov M, Lutgens E, Zernecke A, Weber C. Distinct functions of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes. *EMBO Mol Med* 2013; 5:471-81.
151. Sozzani S, Molino M, Locati M, Luini W, Cerletti C, Vecchi A, Mantovani A. Receptor-activated calcium influx in human monocytes exposed to monocyte chemoattractant protein-1 and related cytokines. *J Immunol* 1993; 150:1544-53.
152. Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16:593-609.
153. Struyf S, Proost P, Schols D, De Clercq E, Opdenakker G, Lenaerts JP, Detheux M, Parmentier M, De Meester I, Scharpé S, Van Damme J.

CD26/dipeptidyl-peptidase IV down-regulates the eosinophil chemotactic potency, but not the anti-HIV activity of human eotaxin by affecting its interaction with CC chemokine receptor 3.

*J Immunol* 1999; 162:4903-9.

154. Struyf S, Proost P, Sozzani S, Mantovani A, Wuyts A, De Clercq E, Schols D, Van Damme J.

Enhanced anti-HIV-1 activity and altered chemotactic potency of NH<sub>2</sub>-terminally processed macrophage-derived chemokine (MDC) imply an additional MDC receptor.

*J Immunol* 1998; 161:2672-5.

155. Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, Ezoe S, Kanakura Y, Sato E, Fukumori Y, Karbach J, Jäger E, Sakaguchi S.

Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans.

*Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:17945-50.

156. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T.

The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract.

*Nature* 1998; 393:591-4.

157. Tan B, Peng S, Yatim S, Gunaratne J, Hunziker W, Ludwig A.

An Optimized Protocol for Proximity Biotinylation in Confluent Epithelial Cell Cultures Using the Peroxidase APEX2.

*STAR Protoc* 2020; 1:100074.

158. Traeger T, Kessler W, Assfalg V, Cziupka K, Koerner P, Dassow C, Breitbach K, Mikulcak M, Steinmetz I, Pfeffer K, Heidecke CD, Maier S.

Detrimental role of CC chemokine receptor 4 in murine polymicrobial sepsis.

*Infect Immun* 2008; 76:5285-93.

159. Trivedi PJ, Adams DH.

Chemokines and Chemokine Receptors as Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease; Pitfalls and Promise.

*J Crohns Colitis* 2018; 12:S641-s52.

160. Uezu A, Kanak DJ, Bradshaw TW, Soderblom EJ, Catavero CM, Burette AC, Weinberg RJ, Soderling SH.

Identification of an elaborate complex mediating postsynaptic inhibition.

*Science* 2016; 353:1123-9.

161. V'kovski P, Steiner S, Thiel V. Proximity Labeling for the Identification of Coronavirus–Host Protein Interactions. In: Maier HJ, Bickerton E, eds. Coronaviruses: Methods and Protocols. New York, NY: Springer US; 2020:187-204.

162. Van Damme J, Struyf S, Wuyts A, Van Coillie E, Menten P, Schols D, Sozzani S, De Meester I, Proost P.

The role of CD26/DPP IV in chemokine processing.

*Chem Immunol* 1999; 72:42-56.

163. Van Hout A, D'Huys T, Oeyen M, Schols D, Van Loy T.

Comparison of cell-based assays for the identification and evaluation of competitive CXCR4 inhibitors.

*PLoS One* 2017; 12:e0176057.

164. Vanheule V, Metzemaekers M, Janssens R, Struyf S, Proost P.

How post-translational modifications influence the biological activity of chemokines. *Cytokine* 2018; 109:29-51.

165. Veldkamp CT, Seibert C, Peterson FC, Sakmar TP, Volkman BF.

Recognition of a CXCR4 sulfotyrosine by the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12).

*J Mol Biol* 2006; 359:1400-9.

166. Vestergaard C, Bang K, Gesser B, Yoneyama H, Matsushima K, Larsen CG.

A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin.

*J Invest Dermatol* 2000; 115:640-6.

167. Vijayanand P, Durkin K, Hartmann G, Morjaria J, Seumois G, Staples KJ, Hall D, Bessant C, Bartholomew M, Howarth PH, Friedmann PS, Djukanovic R.

Chemokine receptor 4 plays a key role in T cell recruitment into the airways of asthmatic patients.

*J Immunol* 2010; 184:4568-74.

168. Viney JM, Andrew DP, Phillips RM, Meiser A, Patel P, Lennartz-Walker M, Cousins DJ, Barton NP, Hall DA, Pease JE.

Distinct conformations of the chemokine receptor CCR4 with implications for its targeting in allergy.

*J Immunol* 2014; 192:3419-27.

169. Vitali C, Mingozzi F, Broggi A, Barresi S, Zolezzi F, Bayry J, Raimondi G, Zanoni I, Granucci F.

Migratory, and not lymphoid-resident, dendritic cells maintain peripheral self-tolerance and prevent autoimmunity via induction of iTreg cells.

*Blood* 2012; 120:1237-45.

170. Vulcano M, Albanesi C, Stoppacciaro A, Bagnati R, D'Amico G, Struyf S, Transidico P, Bonecchi R, Del Prete A, Allavena P, Ruco LP, Chiabrando C, Girolomoni G, Mantovani A, Sozzani S.

Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo.

*Eur J Immunol* 2001; 31:812-22.

171. Wågsäter D, Dienus O, Löfgren S, Hugander A, Dimberg J.

Quantification of the chemokines CCL17 and CCL22 in human colorectal adenocarcinomas.

*Mol Med Rep* 2008; 1:211-7.

172. Walser TC, Rifat S, Ma X, Kundu N, Ward C, Goloubeva O, Johnson MG, Medina JC, Collins TL, Fulton AM.

Antagonism of CXCR3 inhibits lung metastasis in a murine model of metastatic breast cancer.

*Cancer Res* 2006; 66:7701-7.

173. Wang D, Yang L, Yue D, Cao L, Li L, Wang D, Ping Y, Shen Z, Zheng Y, Wang L, Zhang Y.  
Macrophage-derived CCL22 promotes an immunosuppressive tumor microenvironment via IL-8 in malignant pleural effusion.  
*Cancer Lett* 2019; 452:244-53.
174. Wendel M, Galani IE, Suri-Payer E, Cerwenka A.  
Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands.  
*Cancer Res* 2008; 68:8437-45.
175. Wertel I, Surówka J, Polak G, Barczyński B, Bednarek W, Jakubowicz-Gil J, Bojarska-Junak A, Kotarski J.  
Macrophage-derived chemokine CCL22 and regulatory T cells in ovarian cancer patients.  
*Tumour Biol* 2015; 36:4811-7.
176. Wiedemann GM, Knott MM, Vetter VK, Rapp M, Haubner S, Fessler J, Kühnemuth B, Layritz P, Thaler R, Kruger S, Ormanns S, Mayr D, Endres S, Anz D.  
Cancer cell-derived IL-1 $\alpha$  induces CCL22 and the recruitment of regulatory T cells.  
*OncImmunology* 2016; 5:e1175794.
177. Wiedemann GM, Knott MM, Vetter VK, Rapp M, Haubner S, Fessler J, Kühnemuth B, Layritz P, Thaler R, Kruger S, Ormanns S, Mayr D, Endres S, Anz D.  
Cancer cell-derived IL-1 $\alpha$  induces CCL22 and the recruitment of regulatory T cells.  
*OncImmunology* 2016; 5:e1175794.
178. Wolf M, Albrecht S, Märki C.  
Proteolytic processing of chemokines: implications in physiological and pathological conditions.  
*Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40:1185-98.
179. Xue M, Hou J, Wang L, Cheng D, Lu J, Zheng L, Xu T.  
Optimizing the fragment complementation of APEX2 for detection of specific protein-protein interactions in live cells.  
*Sci Rep* 2017; 7:12039.
180. Yamashita U, Kuroda E.  
Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production.  
*Crit Rev Immunol* 2002; 22:105-14.
181. Yanai M, Sato K, Aoki N, Takiyama Y, Oikawa K, Kobayashi H, Kimura S, Harabuchi Y, Tateno M.  
The role of CCL22/macrophage-derived chemokine in allergic rhinitis.  
*Clin Immunol* 2007; 125:291-8.
182. Yeni P, Lamarca A, Berger D, Cimoch P, Lazzarin A, Salvato P, Smail FM, Teofilo E, Madison SJ, Nichols WG, Adkison KK, Bonny T, Millard J, McCarty D.  
Antiviral activity and safety of aplaviroc, a CCR5 antagonist, in combination with lopinavir/ritonavir in HIV-infected, therapy-naïve patients: results of the EPIC study (CCR100136).  
*HIV Med* 2009; 10:116-24.

183. Yoshida K, Korchynskiy O, Tak PP, Isozaki T, Ruth JH, Campbell PL, Baeten DL, Gerlag DM, Amin MA, Koch AE.

Citrullination of epithelial neutrophil-activating peptide 78/CXCL5 results in conversion from a non-monocyte-recruiting chemokine to a monocyte-recruiting chemokine.

*Arthritis Rheumatol* 2014; 66:2716-27.

184. Yoshie O, Matsushima K.

CCR4 and its ligands: from bench to bedside.

*Int Immunol* 2015; 27:11-20.

185. Zlotnik A, Burkhardt AM, Homey B.

Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis.

*Nat Rev Immunol* 2011; 11:597-606.

186. Zlotnik A, Yoshie O.

The chemokine superfamily revisited.

*Immunity* 2012; 36:705-16.

## 7. Verzeichnis der Abkürzungen

Tabelle 17 **Abkürzungsverzeichnis**

Abkürzung	Formulierung
APEX2	<i>Ascorbate peroxidase 2</i>
BioID	Mutierte Variante (R118G) der Biotin Ligase BirA aus <i>Escherichia coli</i>
BP	Biotinphenol
BSA	Bovines Serum-Albumin
CCL	CC-Chemokin Ligand
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat)
CM	Konditioniertes Medium
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>

FACS	<i>Flourescence-activated cell sorter</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FRET	<i>Flourescence Resonance Energy Transfer</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
LB-Medium	<i>Lysogeny broth medium</i>
MDC	<i>Macrophage-derived chemokine</i>
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
Min	Minute(n)
Mio	Million(en)
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NEAA	<i>Non-essential amino acids</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerithrin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	<i>Radioimmunprecipitation assay</i>
RLU	<i>Relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real-Time</i> Polymerase-Kettenreaktion
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SPF	<i>Specific-Pathogen-Free</i>

TARC	<i>Thymus- and activation-regulated chemokine</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	TBS-Puffer, <i>Tris-buffered saline</i>
TBST	TBS-T-Puffer, <i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TC	<i>Tissue culture treated</i>
TH	T-Helfer
Treg	Regulatorische T-Zellen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WB	Westernblot

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 <b>Eigenschaften des Förster-Resonanzenergietransfers</b> .....	12
Tabelle 2 <b>Eigenschaften des Radioliganden-Bindungstest</b> .....	13
Tabelle 3 <b>Eigenschaften der Co-Immunpräzipitation</b> .....	14
Tabelle 4 <b>Eigenschaften der Calciumeinstrom-Messung</b> .....	15
Tabelle 5 <b>Eigenschaften des APEX2 Proximity Labelings</b> .....	16
Tabelle 6 <b>Geräte</b> .....	17
Tabelle 7 <b>Verbrauchsmaterialien</b> .....	18
Tabelle 8 <b>Reagenzien</b> .....	19
Tabelle 9 <b>Kits</b> .....	21
Tabelle 10 <b>Medienzusätze</b> .....	22
Tabelle 11 <b>Zellkulturmedien</b> .....	22
Tabelle 12 <b>Zelllinien</b> .....	23
Tabelle 13 <b>FACS-Färbungen</b> .....	23
Tabelle 14 <b>Antikörper für Westernblot und Immunhistochemie</b> .....	23
Tabelle 15 <b>Software</b> .....	25
Tabelle 16 <b>Konditionen bei Versuchen mit Biotinylierung</b> .....	37
Tabelle 17 <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	86

## 9. Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Prof. Dr. Stefan Endres und Prof. Dr. David Anz für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung für Klinische Pharmakologie anzufertigen. Besonderer Dank gilt darüberhinaus Dr. Benjamin Kühnemuth für die Themenwahl, die wissenschaftliche Betreuung und die langjährige Unterstützung jeglicher Art.

Dr. Bruno Cadilha, Dr. Viktoria Bothe, Dr. Dharmendra Pandey, Clarissa Zappe, Magdalena Scheck, Dr. Julius Keyl, Dr. Raphael Kfuri Rubens und Thomas Ruzicka danke ich für den Gedankenaustausch, experimentelle Anregungen und Freude an der täglichen Zusammenarbeit.

Darüberhinaus danke ich den ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Immunregulation, insbesondere Patrick Layritz, Dr. Carolin Perleberg und Dr. Ignazio Piseddu für ihre Unterstützung und das immer freundschaftliche Miteinander.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für inspirierenden Treffen, sowie die gewonnene Zeit, die mir dieses Stipendium ermöglicht hat.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und Inge für ihre anhaltende Unterstützung, sowie Mridul und meinen Geschwistern für ihr Gehör und ihren Rückhalt.



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät  
Promotionsbüro



## Eidesstattliche Versicherung

Meyer, Bastian Felix

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Charakterisierung von Chemokin-Rezeptor-Interaktionen mittels APEX2-Fusionsproteinen**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 14.11.2024

---

Ort, Datum

Bastian Felix Meyer

---

Unterschrift Bastian Felix Meyer