

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

Untersuchung zum Einfluss des IL-12R $\beta$ 1 auf die IL-23-vermittelte  
Signaltransduktion

Dissertation

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

vorgelegt von  
Tobias Klöcker  
(2016)

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

gez.: Univ. Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Erstgutachter: Univ. Prof. Dr. Jürgen Scheller

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Phillip Lang

*Die Zukunft hat viele Namen: Für Schwache ist sie das Unerreichbare,  
für die Furchtsamen das Unbekannte, für die Mutigen die Chance.*

Victor Hugo (1802 – 1885)

## Zusammenfassung

Zytokine sind als Mediatoren der Immunantwort essentiell für den menschlichen Organismus, der sich in ständiger Auseinandersetzung mit extra- und intrazellulären Pathogenen befindet. Das Immunsystem unterliegt zahlreichen Regulationsmechanismen, die bei fehlerhafter Funktion zu schwerwiegenden Erkrankungen führen. Interleukin 23 (IL-23) stellt als Mitglied der Interleukin 12 (IL-12) Familie ein wichtiges Molekül zur Regulation von T-Zellen dar und ist mit der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen, wie multipler Sklerose, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, rheumatoider Arthritis assoziiert. Der IL-23 Rezeptorkomplex zählt zur Gruppe der Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase und setzt sich aus den Untereinheiten IL-23R und IL-12R $\beta$ 1 zusammen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der für die Signaltransduktion entscheidende Teil des IL-12R $\beta$ 1 anhand von Deletions- und Mutationsvarianten im Zellmodell näher charakterisiert werden. Die vorliegende Arbeit zeigte, dass die intrazelluläre Domäne des IL-12R $\beta$ 1 von Aminosäure 595 bis 656 entscheidend für die IL-23-abhängige Signaltransduktion ist. Das in der Literatur beschriebene und in vielen Zytokinrezeptoren hochkonserviert vorkommende Box1 Motiv stellt eine Aminosäuresequenz im cytoplasmatischen Teil des IL-12R $\beta$ 1 dar, welche als mögliche Bindungsstelle für Tyrosinkinasen postuliert wurde. Im Falle des IL-12R $\beta$ 1 wurde gezeigt, dass die Sequenz des Box1 Motivs notwendig für die Signalgebung ist. Das Box2 Motiv ist als eine dem Box1 Motiv benachbarte Sequenz beschrieben, die jedoch nicht so exakt definiert ist. Diese Arbeit zeigte, dass dieses Motiv lediglich eine Verstärkung der Signalgebung bewirkt. Anhand von Immunpräzipitationsanalysen wurde die Bindungsstelle der Tyrosinkinase Tyk2 am IL-12R $\beta$ 1 charakterisiert und als Box1 Motiv identifiziert.

Weiterhin wurde anhand von Untersuchungen gezeigt, dass die intrazelluläre Domäne des mIL-12R $\beta$ 1 durch die gp130 Proteinkette ersetzt werden kann.

## Abkürzungsverzeichnis

Chemikalien (z.B. NaCl), Enzymbezeichnungen (z.B. *Pfu*), Länder (z.B. USA), Antikörper (z.B. Anti-myc 9E10), SI-Einheiten (z.B. m, s) sowie Medien und Puffer, die im Text näher erläutert werden, befinden sich nicht im Abkürzungsverzeichnis. Für ein besseres Verständnis werden aus dem Englischen und dem Latein übernommene Begriffe nicht übersetzt und in der Arbeit kursiv hervorgehoben.

Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp (kb)	Basenpaar (Kilobasen)
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serumalbumin
CIA	Engl. <i>Collagen induced Arthritis</i>
CLC	Engl. <i>Cardiotrophin-like Cytokine</i>
CNTF	Engl. <i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
CT-1	<i>Cardiotrophin-1</i>
DMEM	Engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EAE	experimentelle autoimmune Arthritis
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

FCS	Engl. <i>Fetal Calf Serum</i>
fwd	Engl. <i>forward</i>
G-CSF	Engl. <i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GM-CSF	Engl. <i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
gp130	Glykoprotein 130
GH	Engl. <i>Growth Hormone</i>
HIL-6	Hyper-Interleukin 6
HRP	Engl. <i>Horse-Radish-Peroxidase</i>
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin 6 Rezeptor
IL-12R $\beta$ 1	Interleukin 12 Rezeptor beta 1
IL-23R	Interleukin 23 Rezeptor
Jak 1/2	Januskinase 1/2
LIF	Engl. <i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
MCP1	Engl. <i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>
mIL-12-R $\beta$ 1	muriner Interleukin 12 Rezeptor beta 1
MIP	Engl. <i>Monocyte Inhibitory Protein</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MS	multiple Sklerose
NP	Neuropoetin

OSM	Oncostatin M
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RA	rheumatoide Arthritis
rev	Engl. <i>reverse</i>
ROR $\gamma$ t	Engl. <i>Retinoic Acid Receptor-related Orphan Receptor <math>\gamma</math>-t</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sIL-6R	Löslicher ( <i>soluble</i> ) IL-6 Rezeptor
SOCS	Engl. <i>Supressor of Cytokine Signaling</i>
STAT	Engl. <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helferzelle
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
Tyk	Tyrosinkinase
UV	Ultraviolett

## Einbuchstaben-Aminosäurecode

### Neutrale Aminosäuren

A Alanin  
G Glycin  
I Isoleucin  
L Leucin  
F Phenylalanin  
P Prolin  
W Tryptophan  
V Valin

### Basische Aminosäuren

R Arginin  
H Histidin  
K Lysin

### Polare Aminosäuren

N Asparagin  
C Cystein  
Q Glutamin  
M Methionin  
S Serin  
T Threonin  
Y Tyrosin

### Saure Aminosäuren

D Asparaginsäure  
E Glutaminsäure

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	- 1 -
1.1 Die Zytokine der Interleukin 12 Familie.....	- 1 -
1.2 Interleukin 23 und sein Rezeptorkomplex .....	- 4 -
1.3 Interleukin 23 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin.....	- 8 -
1.4 Interleukin 23 steht im Zusammenhang mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Tumoren .....	- 10 -
<b>2 Ziele der Arbeit</b> .....	- 1 -
<b>3 Material und Methoden</b> .....	- 2 -
3.1 Material .....	- 2 -
3.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits .....	- 2 -
3.1.2 Puffer und Lösungen.....	- 5 -
3.1.3 Medien und Antibiotika .....	- 8 -
3.1.4 Geräte.....	- 9 -
3.1.5 Plasmide .....	- 10 -
3.1.6 Oligonukleotide.....	- 11 -
3.1.7 Bakterienstämme und Zelllinien .....	- 12 -
3.1.8 Antikörper .....	- 14 -
3.1.9 Zytokine .....	- 15 -
3.2 Methoden .....	- 15 -
3.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	- 15 -
3.2.1.1 Transformation von Bakterien .....	- 15 -
3.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA.....	- 16 -
3.2.1.3 Bestimmung der DNA mittels UV-Spektroskopie.....	- 18 -
3.2.1.4 Agarosegelelektrophorese .....	- 18 -
3.2.1.5 Restriktionsanalyse von DNA.....	- 19 -
3.2.1.6 Gelextraktion.....	- 19 -
3.2.1.7 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	- 19 -
3.2.1.8 Ligation .....	- 23 -
3.2.1.9 Sequenzierung.....	- 24 -
3.2.2 Zellbiologische Methoden.....	- 24 -
3.2.2.1 Kultivierung von Zellen .....	- 24 -
3.2.2.2 Transfektion von adhärennten Zellen.....	- 25 -
3.2.2.3 Retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen .....	- 27 -

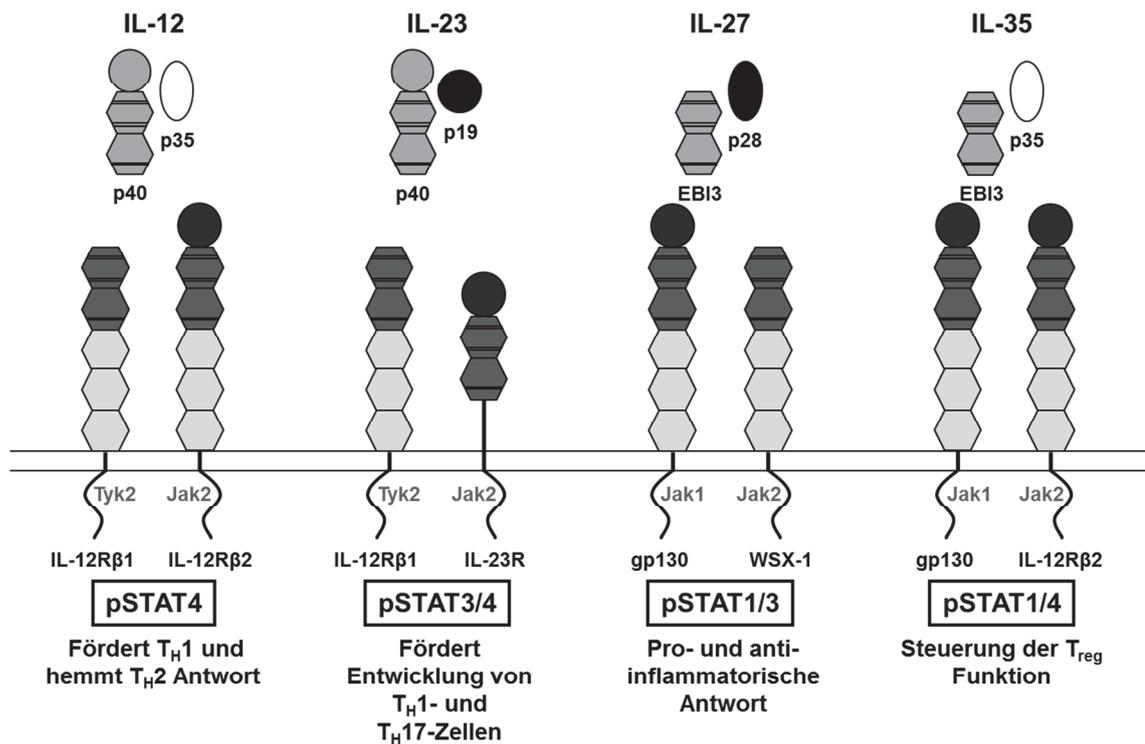
3.2.2.4 Zellproliferationsassay .....	- 28 -
3.2.2.5 Analyse der Oberflächenexpression der Zytokinrezeptoren .....	- 29 -
3.2.2.6 Stimulationsassay zur Untersuchung der STAT3 Aktivierung .....	- 29 -
3.2.3 Proteinbiochemische Methoden .....	- 30 -
3.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten .....	- 30 -
3.2.3.2 Quantifizierung von Proteinen .....	- 31 -
3.2.3.3 Co-Immunpräzipitationsassays .....	- 31 -
3.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot .....	- 31 -
<b>4 Ergebnisse</b> .....	- 35 -
4.1 Analyse der intrazellulären Domäne des IL-12R $\beta$ 1 .....	- 35 -
4.2 Klonierung der Expressionsvektoren der verschiedenen IL-12R $\beta$ 1 Varianten .....	- 36 -
4.3 Expression der IL-12R $\beta$ 1-Varianten in COS-7-Zellen .....	- 44 -
4.4 Erzeugung stabiler Ba/F3-gp130-Zellen .....	- 45 -
4.5 Analyse der IL-23-abhängigen Proliferation der generierten Ba/F3-gp130-Zelllinien .....	- 48 -
4.6 Analyse der IL-23-induzierten STAT3 Aktivierung .....	- 51 -
4.7 Analyse der Interaktion von Tyk2 und dem IL-12R $\beta$ 1 .....	- 54 -
4.8 Untersuchungen an humanen Fibrosarkomzelllinien mit Jak1-, Jak2- und Tyk2- Defizienz .....	- 55 -
4.9 Untersuchungen zur chimären Variante aus extrazellulärer mIL-12R $\beta$ 1 und intrazellulärer gp130 Rezeptorkette .....	- 56 -
<b>5 Diskussion</b> .....	- 58 -
5.1 Der IL-23 Signalweg .....	- 58 -
5.2 Die intrazelluläre Domäne des IL-12R $\beta$ 1 ist entscheidend für die IL-23-vermittelte Signalwirkung .....	- 59 -
5.3 Untersuchungen zu den putativen Box1 und Box2 Motiven und der Assoziation mit der Kinase Tyk2 im Rahmen der IL-23-vermittelten Signaltransduktion .....	- 62 -
5.4 Die Januskinase Tyk2 kann durch eine andere Kinase substituiert werden .....	- 63 -
5.5 Assoziation von Jak2 an den IL-23R .....	- 66 -
<b>6 Schlussfolgerungen</b> .....	- 69 -
<b>7 Literatur und Quellenverzeichnis</b> .....	- 70 -
<b>8 Anhang</b> .....	- 78 -

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Zytokine der Interleukin 12 Familie

Zytokine sind an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt. Als auto- und parakrine Faktoren beeinflussen sie die Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose von Zellen. Sie werden von diversen Zelltypen sezerniert und besitzen sowohl spezifische als auch überlappende Funktionen abhängig vom Typ und Entwicklungsstatus der jeweiligen Zielzelle (Tato und Cua 2008a, 2008b, 2008c, 2008d; Jones *et al.* 2011). Die strikte Regulierung dieser Funktion ist eine Voraussetzung für eine koordinierte Immunantwort. Akute und chronische Entzündungsreaktionen, Neoplasien, Krebs und Autoimmunerkrankungen basieren auch auf einer Fehlfunktion der Zytokinsignalgebung (Jones *et al.* 2011). Zytokine werden anhand ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten in verschiedene Proteinfamilien, z.B. die *Tumor Necrosis Factor-* (TNF) Familie, Interleukin 1 und verwandte Proteine und hämatopoetische Zytokine (Parham *et al.* 2002) unterteilt. Letztere zählen zu einer ausgedehnten Gruppe von Zytokinen, die strukturell durch vier  $\alpha$ -helikale Bündel charakterisiert sind und eine vielseitige Funktion im Immunsystem besitzen (Rozwarski *et al.* 1994).

Die Interleukin 12 (IL-12) Familie als eine Gruppe von hämatopoetischen Zytokinen umfasst die heterodimeren Signalstoffe Interleukin 12 (IL-12), Interleukin 23 (IL-23), Interleukin 27 (IL-27) und Interleukin 35 (IL-35) (Garbers *et al.* 2012). Sowohl im Aufbau der Zytokine als auch bei den entsprechenden Rezeptoren wird innerhalb dieser Familie ein ähnliches Repertoire an Untereinheiten verwendet. Obwohl eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen den Mitgliedern dieser Familie besteht, besitzt jeder dieser Botenstoffe unterschiedliche Effekte im Immunsystem (siehe Abb. 1) (Vignali und Kuchroo 2012). IL-12, IL-23 und IL-27 werden von aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen, u.a. dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen sezerniert, wohingegen IL-35 von regulatorischen T-Zellen exprimiert wird (Jones und Vignali 2011).



**Abb. 1: Mitglieder der IL-12 Familie.** Die heterodimeren Zytokine IL-12, IL-23, IL-27 und IL-35 teilen sich sowohl Untereinheiten zur Bildung der biologisch aktiven Zytokine als auch einzelne Rezeptorketten zur Zusammenstellung des jeweiligen funktionellen Rezeptorkomplexes. Trotz ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten sind die Zytokine der IL-12 Familie an unterschiedlichen Prozessen der Immunantwort beteiligt. Das WSXWS-Motiv der  $\beta$ -Untereinheiten der Zytokine und der Rezeptoren ist als dicke schwarze Linie gekennzeichnet. Die dünnen Linien entsprechen den konservierten Cysteinen. Die Rezeptoren besitzen keine Kinaseaktivität, sondern sind mit den Januskinasen Jak1/2 und Tyk2 assoziiert. Der IL-27 und IL-35 Rezeptorkomplex zeigt eine Bindung zu den Kinasen Jak1 und 2, wobei die IL-12 und IL-23 Signaltransduktion über Jak2 und Tyk2 vermittelt wird. Über die Phosphorylierung von *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT) Proteinen kann die Immunantwort auf Ebene der Gentranskription reguliert werden. Unterschiedliche STAT Proteine sind an der Signalgebung innerhalb der IL-12 Familie beteiligt. Hauptsächlich STAT1 spielt eine Rolle in der IL-27 und IL-35 Signalkaskade, STAT3 innerhalb der IL-23 und IL-27 Signalgebung und STAT4 im Rahmen der IL-12, IL-23 und IL-35 Signaltransduktion. Die einzelnen Zytokine zeigen spezifische Funktionen innerhalb der Immunantwort. Während IL-12 eine Differenzierung von T<sub>H</sub>1-Zellen mit Unterdrückung der T<sub>H</sub>2-Zellen bewirkt, zeigt IL-23 einen positiven Einfluss auf T<sub>H</sub>17-Zellen. IL-27 besitzt sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Aspekte, wobei IL-35 eine regulierende Funktion, vermittelt über regulatorische T-Zellen, einnimmt. (verändert nach Jones und Vignali 2011; Vignali und Kuchroo 2012).

Als vorwiegend pro-inflammatorische Zytokine sind IL-12 und IL-23 an der Differenzierung von Subpopulationen der T-Helfer-Zellen, T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>17, beteiligt (Langrish *et al.* 2004; O'Shea und Paul 2002). IL-27 wurde zunächst als ein weiteres

pro-inflammatorisches Mitglied der IL-12 Familie beschrieben. Detaillierte Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass es nicht nur für pro-inflammatorische Vorgänge verantwortlich ist, sondern vielmehr eine immunregulatorische Funktion einnimmt (Wojno und Hunter 2012). Als letztes und jüngstes Mitglied der IL-12 Familie ist IL-35 ein potenter Inhibitor der T-Zell-Differenzierung (Collison und Vignali 2008). Somit herrscht ein funktionelles Gleichgewicht innerhalb der IL-12 Familie mit jeweils zwei pro-inflammatorischen (IL-12, IL-23) und zwei inhibitorischen Vertretern (IL-27, IL-35) (Vignali und Kuchroo 2012).

Die heterodimeren Zytokine der IL-12 Familie bestehen aus zwei verschiedenen Untereinheiten. Die  $\alpha$ -Untereinheiten (p19, p28, p35) zeigen strukturelle Ähnlichkeit zu den Zytokinen der IL-6 Familie. Zusammen mit den  $\beta$ -Untereinheiten (p40, Ebi3), die eine strukturelle Homologie zu den nicht signal-transduzierenden  $\alpha$ -Rezeptoren der IL-6 Zytokinfamilie (IL-6R $\alpha$ , IL-11R $\alpha$ , CNTF $\alpha$ ) besitzen, bilden sie die physiologisch aktiven Mitglieder der IL-12 Familie (Jones und Vignali 2011). Durch unterschiedliche Paarungen von einem begrenzten Pool an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten sind zum jetzigen Zeitpunkt vier verschiedenen Zytokine innerhalb dieser Familie bekannt. Der nicht signalgebende  $\alpha$ -Rezeptor p40 ist im Zusammenspiel mit den p35 oder p19 Proteinketten an der Bildung von IL-12 (p35/p40) (Kobayashi *et al.* 1989) bzw. IL-23 (p19/p40) (Oppmann *et al.* 2000) beteiligt. IL-27 besteht aus der  $\beta$ -Untereinheit Ebi3 und p28 (Pflanz *et al.* 2002). Das jüngste Mitglied der IL-12 Familie ist IL-35, das aus den nicht kovalent gebunden Untereinheiten p35 und Ebi3 aufgebaut ist (Collison *et al.* 2007). Im Gegensatz zu IL-12 und IL-23 sind die Komponenten für IL-27 und IL-35 nicht über Disulfidbrücken miteinander verbunden und werden in deutlich geringeren Mengen, dies gilt besonders für IL-35, sekretiert (Vignali 2012).

Auf Seiten der Rezeptoren besteht innerhalb der IL-12 Familie ebenfalls ein dimerer Aufbau mit der Beteiligung von gleichen Rezeptoruntereinheiten in verschiedenen Zytokinrezeptorkomplexen. Der IL-12 Rezeptor  $\beta$ 2 (IL-12R $\beta$ 2) ist Teil des IL-12 und IL-35 Rezeptorkomplexes. Während sich IL-12 und IL-23 den IL-12 Rezeptor  $\beta$ 1 (IL-12R $\beta$ 1) teilen, bildet die IL-6-Familien-Rezeptorkette gp130 bei IL-27- und IL-35 eine Untereinheit des jeweiligen Rezeptors (Jones und Vignali 2011; Vignali und Kuchroo 2012). Einmalig vorkommende Untereinheiten sind der IL-27R (WSX-1) für IL-27 und der IL-23R für IL-23 (siehe Abb. 1). IL-27 und IL-35 stellen Verbindungen zur IL-6

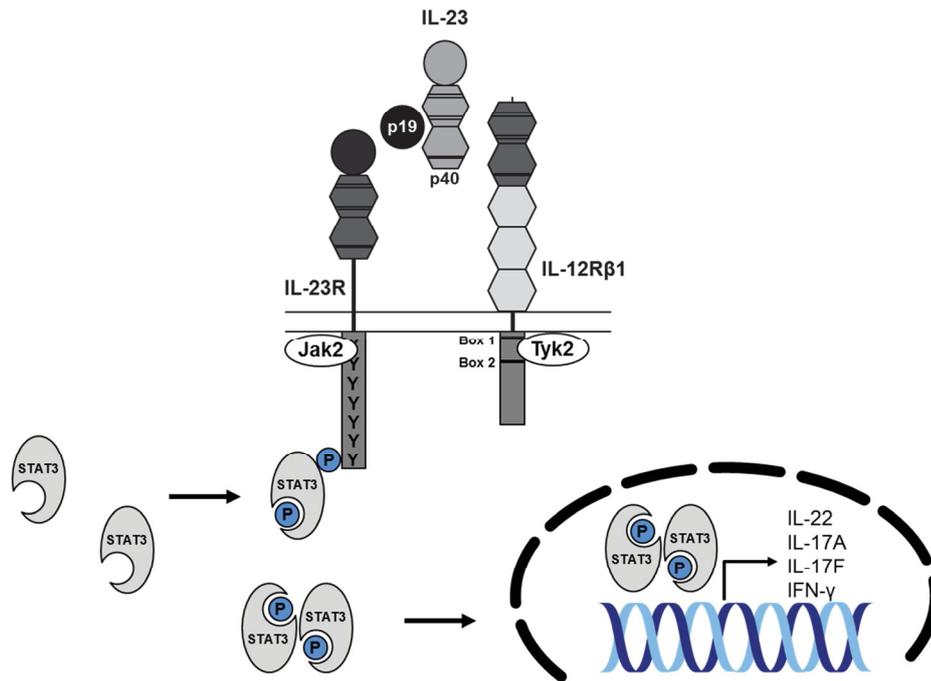
Familie dar, da der gp130 Rezeptor von beiden Zytokinfamilien als Rezeptor verwendet wird (Garbers *et al.* 2012). Innerhalb dieser Zytokinfamilie spielt IL-23 eine entscheidende Rolle auf Grund seiner diversen physiologischen als auch pathologischen Funktionen im menschlichen Organismus.

## 1.2 Interleukin 23 und sein Rezeptorkomplex

Interleukin 23 (IL-23) wurde im Jahre 2000 von Oppmann und Mitarbeitern bei der Suche nach weiteren Mitgliedern der IL-6 Familie anhand von Sequenzvergleichen entdeckt. Hierbei wurde der Faktor p19 identifiziert, der nur im Komplex mit der p40 Untereinheit eine biologische Aktivität aufwies (Oppmann *et al.* 2000).

Dieses heterodimere Zytokin ist aus den über eine Disulfidbrücke kovalent gebundenen Untereinheiten p40 und p19 zusammengesetzt. Der lösliche  $\alpha$ -Rezeptor p40 ist ebenfalls am Aufbau von IL-12 beteiligt, während p19 ein einzigartiger Baustein von IL-23 ist (Oppmann *et al.* 2000). Der IL-23 Rezeptorkomplex zeigt ebenfalls einen heterodimeren Aufbau bestehend aus dem Interleukin 23 Rezeptor (IL-23R) und dem Interleukin 12 Rezeptor  $\beta$ 1 (IL-12R $\beta$ 1), welcher auch an der IL-12 Signaltransduktion beteiligt ist (siehe Abb. 1) (Parham *et al.* 2002).

Der IL-23R gehört zur Gruppe der Typ-1 Transmembranproteine, die durch einen extrazellulär liegenden N-Terminus und das einmalige Durchqueren der Membran gekennzeichnet sind. Der extrazelluläre Teil des IL-23 Rezeptors besteht aus einer N-terminalen Ig-ähnlichen Domäne, zwei Fibronectin Typ III (FNIII) Domänen und einer 39 Aminosäuren langen unstrukturierten Region (Parham *et al.* 2002), die analog zum IL-6R als *stalk*-Region bezeichnet wird. Die intrazelluläre Domäne des humanen IL-23 Rezeptors weist sieben Tyrosinreste auf (siehe Abb. 2), von denen sechs ebenfalls konserviert im murinen IL-23R vorliegen. Drei mögliche *Src homology 2* (SH2) Bindemotive wurden innerhalb des IL-23R postuliert (Parham *et al.* 2002). Die  $Y_{m416/h397}$ EDI Sequenz soll für die Interaktion mit der Tyrosin Phosphatase SHP2 (Case *et al.* 1994), das  $Y_{m626/h611}$ FPQ Motiv für die Bindung von STAT1/3 (Heinrich *et al.* 1998; Wiederkehr-Adam *et al.* 2003) und  $GY_{m504/h484}$ KPQIS für die Assoziation mit STAT4 verantwortlich sein (Naeger *et al.* 1999; Yao *et al.* 1999).



**Abb. 2: Der Jak/STAT Signalweg.** Die Aktivierung des IL-23 Rezeptorkomplexes führt über die assoziierten Kinasen zu einer Phosphorylierung von STAT3. Phosphorylierte und somit aktivierte STAT3 Moleküle migrieren als Homodimere in den Zellkern und aktivieren als Transkriptionsfaktoren bestimmte Zielgene (IL-22, IL-17, IFN- $\gamma$ ) (verändert nach Langrish *et al.* 2004).

Wie alle Rezeptoren der IL-12 Familie zeigt auch der IL-12R $\beta$ 1 eine strukturelle Ähnlichkeit mit der IL-6 Rezeptoruntereinheit gp130 (Jones und Vignali 2011). Er besitzt fünf Tandem Fibronectin Typ III (FNIII) Domänen, wobei die ersten beiden für die Zytokinbindung verantwortlich sind und daher als Zytokinrezeptordomänen bezeichnet werden. Der IL-12R $\beta$ 1 verfügt im Gegensatz zum IL-23 Rezeptor jedoch über keine N-terminale Ig-ähnliche Domäne (Chua *et al.* 1995). In der intrazellulären Domäne des humanen IL-12R $\beta$ 1 befindet sich kein und in der murinen Variante nur ein Tyrosin (Y635) (Chua *et al.* 1995). Zusätzlich weist diese Domäne zwei Motive auf, die in vielen Zytokinrezeptoren hoch konserviert vorliegen und als Box1 bzw. Box2 Motiv bezeichnet werden (Murakami *et al.* 1991; Ihle und Kerr 1995). Das Box1 Motiv umfasst 6-10 Aminosäuren in unmittelbarer Nähe der Transmembrandomäne (ca. 10 AS entfernt) und ist durch eine prolinreiche Sequenz charakterisiert. Die Konsensussequenz für das Box1 Motiv bei Zytokinrezeptoren lautet:  $\phi\phi P X(I/V) P X P(E/K)$ , wobei  $\phi$  für eine hydrophobe Aminosäure steht (Usacheva *et al.* 2002). Eine weitere, jedoch nicht exakt definierte Region, stellt das Box2 Motiv dar. Nach Usacheva und Mitarbeitern wird folgende Aminosäuresequenz innerhalb dieses Motives gefunden, (V/L)E(V/L)L, die

durch die Konsensussequenz  $\Phi\Phi E\Phi$  repräsentiert wird. Beide Motive sind wichtig für die Rezeptorfunktion (Ihle und Kerr 1995). Das Box1 Motiv wird für die Assoziation der entsprechenden Januskinase benötigt (Kloek *et al.* 2002). Wohingegen das Box2 Motiv für die volle Aktivierung der Kinase wichtig ist (Colosi *et al.* 1993). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass diese Motive für die Bindung und Aktivierung von assoziierten Kinasen der Jak-Familie in der Signaltransduktion von Typ 1 Interferonen entscheidend sind (Usacheva *et al.* 2002; Murakami *et al.* 1991; Colosi *et al.* 1993; Fukunaga *et al.* 1991). Inwiefern dies für den IL-12R $\beta$ 1 im Rahmen der IL-23 Signaltransduktion zutrifft ist bisher noch nicht untersucht worden. Der IL-23R besitzt kein Box1 und Box2 Motiv, trotzdem wurde eine Jak2 Bindungsstelle postuliert (Pidacheva *et al.* 2011).

Der IL-23 Rezeptorkomplex gehört zur Gruppe der Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase. Während die intrazelluläre Domäne des IL-23 Rezeptors mit der Januskinase 2 (Jak2) assoziiert ist (Parham *et al.* 2002), interagiert die Tyrosin Kinase 2 (Tyk2) mit dem IL-12R $\beta$ 1 (Zou *et al.* 1997). Die Bindung von IL-23 bewirkt die Aktivierung und somit Phosphorylierung der assoziierten Januskinasen, die wiederum Signalkaskaden initiieren, die die Aktivierung von STAT3 (Parham *et al.* 2002), Phosphoinositid 3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/AKT) (Cho *et al.* 2006; Floss *et al.* 2013) und NF- $\kappa$ B beinhalten (Cho *et al.* 2006). In neuesten Studien wurde neben den erwähnten Signalwegen die zusätzliche Beteiligung von Erk1/2 an der IL-23 Signaltransduktion belegt (Floss *et al.* 2013).

Die zwei Familien der Jak und STAT Proteine sind an Signalwegen von diversen Zytokinen beteiligt (Darnell *et al.* 1994). Die Familie der Januskinasen umfasst vier verschiedene Proteine (Jak1-3, Tyk2), die mit der intrazellulären Domäne verschiedenster Zytokinrezeptoren assoziiert sind. *Signal Transducer and Activators of Transcription* (STAT) Proteine werden durch Januskinasen aktiviert und wirken als Transkriptionsfaktoren auf die Proliferation und Differenzierung von Zellen (Becerra-Díaz *et al.* 2011). *Src homology 2* (SH2) Domänen als Vermittler von Proteininteraktionen dienen nach Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste sowohl der Bindung von STAT-Molekülen an die intrazelluläre Domäne des Rezeptors als auch deren Dimerisierung mit anderen Mitgliedern dieser Familie (Schindler 2002).

Nach Aktivierung des IL-23 Rezeptors werden, vermittelt über die Januskinasen, STAT1, STAT3, STAT4 und STAT5 in die aktive phosphorylierte Form überführt. Während STAT4 im Gegensatz zur IL-12 Signaltransduktion in vergleichbar geringem Ausmaß eine Rolle spielt, ist STAT3 der entscheidende Transkriptionsfaktor in der Signalgebung von IL-23 (Floss *et al.* 2013). Die phosphorylierten und somit aktivierten STAT3 Proteine gelangen als Dimer in den Zellkern, um als Transkriptionsfaktoren bestimmte Zielgene zu aktivieren (Becerra-Díaz *et al.* 2011) (siehe Abb. 2).

Neueste Untersuchungen geben detaillierte Einsicht in die Kinetik der IL-23-abhängigen STAT3 Aktivierung: Anhand von Ba/F3-gp130 Zellen, die sowohl durch das Designerzytokin Hyper-IL-6 (HIL-6) (Fischer *et al.* 1997) als auch IL-23 Stimulation aktiviert werden, konnte der Zusammenhang zwischen der Zeit nach IL-23 Stimulus und Phosphorylierung von STAT3 näher charakterisiert werden. Die Induktion von pSTAT3 nach IL-23 Stimulus erfolgt langsam mit einem Scheitelpunkt bei 60 min, ist jedoch verlängert im Vergleich zu HIL-6 mit einer maximalen Aktivierung bereits nach 5-10 min und dem Abfall nach 60 min. IL-23 ist demnach in der Lage, eine Langzeitaktivierung von STAT3 in dem erwähnten Zellmodell zu induzieren. Diese Tatsache kann dadurch erklärt werden, dass der IL-23R dem Einfluss eines negativen *Feedbacks* durch *Suppressor of Cytokine Signaling* (SOCS) Proteinen nicht unterlegen ist (Floss *et al.* 2013).

Die Studie von Floss *et al.* im Jahr 2013 verdeutlichte, dass die Aktivierung von STAT3 Proteinen durch IL-23 sowohl über SH2-Domänen, welche mit bestimmten Tyrosinen des IL-23R interagieren, als auch über ein Phosphotyrosin-unabhängiges Motiv vermittelt wird. Die Tyrosine Y504 und Y626 im murinen und Y484 bzw. Y611 im humanen IL-23R spielen eine entscheidende Rolle für die Aktivierung von STAT3. Die für eine SH2 Bindungsdomäne ungewöhnliche Sequenz Y<sub>542</sub>PNFQ stellt sich als ein weiterer Mediator für die STAT3 Aktivierung heraus. Weiterhin ist ein 17 Aminosäuren Motiv im C-Terminus des murinen Rezeptors verantwortlich für eine SH2-unabhängige Phosphorylierung von STAT3 (Floss *et al.* 2013).

Genaue Analysen des intrazellulären Teils des IL-12Rβ1 im Rahmen der IL-23 Signaltransduktion fehlen bisher. In der Literatur gibt es widersprüchliche Auffassungen über die Funktion des IL-12Rβ1. Collison *et al.* beschrieben, dass der IL-12Rβ1 nur für die hoch affine Bindung mit dem Zytokin verantwortlich sei (Collison

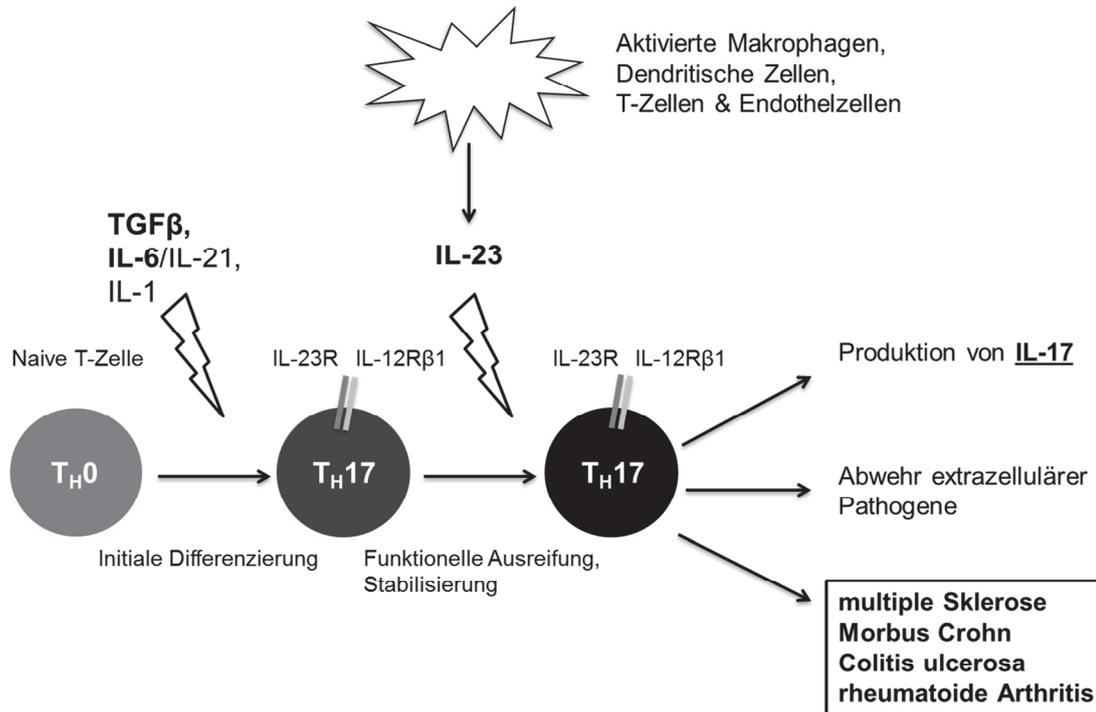
und Vignali 2008). Im Gegensatz dazu zeigten Russell und Mitarbeiter, dass die IL-12p40-Homodimer-abhängige Chemotaxis von Makrophagen und virale Entzündungen der Atemwege durch den IL-12R $\beta$ 1 vermittelt werden (Russell et al. 2003).

### **1.3 Interleukin 23 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin**

Im Rahmen der Immunantwort wird IL-23 vorwiegend von dendritischen Zellen nach Aktivierung des *Toll-like* Rezeptors (Re und Strominger 2001; Napolitani et al. 2005; Carmody et al. 2007) und von aktivierten pro-inflammatorischen Makrophagen vom Typ 1 sezerniert (Verreck et al. 2004). Diese Zellen stellen eine zentrale Komponente des Immunsystems dar, indem durch Interpretation verschiedenster Signale aus der Umwelt eine physiologische Balance zwischen Toleranz, Ignoranz und Immunität gewährleistet wird (Langrish et al. 2004).

Zelllinien mit Expression des IL-23R sind CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub> 17-Zellen,  $\gamma\delta$  T-Zellen, invariante und natürliche Killer-T-Zellen mit dem Rezeptor-Protein p46 (iNKT, NKp46), Makrophagen, dendritische Zellen und *innate lymphoid cells* (ILC), wobei letztere auf Grund einer nur sehr geringen Expression des IL-23 Rezeptors beinahe unbeeinflusst durch IL-23-Stimulation bleiben (Awasthi und Kuchroo 2009; Cua und Tato 2010).

Als ein pro-inflammatorisches Zytokin greift IL-23 in die Entwicklung und Reifung von T-Zellen ein. Zusammen mit IL-6 und TGF- $\beta$  bewirkt es die Differenzierung naiver T-Zellen in die Subpopulation der IL-17 produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Helfer (T<sub>H</sub>17) Zellen (siehe Abb. 3) (McGeachy et al. 2009). Dabei ist IL-23 für die funktionelle Reifung von T<sub>H</sub>17 Zellen durch Erhalt des inflammatorischen Phänotyps und die Stabilisierung durch Unterdrückung von Faktoren, die andere Differenzierungsschritte einleiten, essentiell (Zúñiga et al. 2013).



**Abb. 3: Die Funktion von IL-23 im Immunsystem.** TGFβ und IL-6 dienen der initialen Ausbildung des T<sub>H</sub>17 Phänotyps, wobei IL-23 für die finale Differenzierung und die Aufrechterhaltung des T<sub>H</sub>17-Zellstatus essentiell ist. T<sub>H</sub>17-Zellen sind an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und an der Abwehr extrazellulärer Pathogene beteiligt.

Der erste Schritt der Differenzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen liegt in der IL-6-abhängigen Aktivierung von STAT3 (Yang et al. 2007) und dessen Steigerung der Expression von Genen, die spezifisch für den T<sub>H</sub>17-Zellstatus sind. Dazu zählen der Transkriptionsfaktor *Retinoic Acid Receptor-related Orphan Receptor γ-t* (RORγt) sowie die Gene für IL-17 und den IL-23R (Durant et al. 2010). TGF-β spielt eine konzentrationsabhängige Rolle in der T- Zelldifferenzierung: Geringe Mengen fördern die Differenzierung in T<sub>H</sub>17-Zellen, höheren Dosen etablieren den Phänotyp der regulatorischen T-Zelle (T<sub>reg</sub>) (Zúñiga et al. 2013).

Unausweichlich ist die Anwesenheit von IL-23, um die Expression der T<sub>H</sub>17-abhängigen Genen wie *RORγt*, *IL17* und *IL23R* zu stabilisieren und Effektoren wie IL-22, *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) und IFN-γ zu induzieren. Die Potenz von IL-23 wird dadurch verstärkt, dass es in der Lage ist, durch verschiedene Signalwege (STAT3, ROR-γt, T-bet) seine eigene Expression und Signalgebung zu verstärken (Zúñiga et al. 2013).

Humane T<sub>H</sub>17-Zellen unterscheidet sich von der murinen Variante durch die Expression des T<sub>H</sub>1 bezogenen Transkriptionsfaktor T-bet, die durch IL-12 bewirkte Differenzierung in T<sub>H</sub>1 Zellen und die Entbehrlichkeit von TGF- $\beta$  für die weitere Entwicklung (Annunziato und Romagnani 2011).

T<sub>H</sub>17-Zellen spielen eine wichtige Rolle beim Schutz des Organismus gegen diverse Bakterien und Pilze, insbesondere auf der menschlichen Schleimhaut. Dies beinhaltet die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und die Stimulation von Epithelzellen zur Produktion von Defensinen, einer Familie von antibiotischen, antiviralen und cytotoxischen Peptiden (Huang *et al.* 2004; Ye *et al.* 2001). T<sub>H</sub>17-Zellen sind weiterhin an zahlreichen inflammatorischen Signalwegen beteiligt, indem sie die Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF), Chemokinen (z.B. IL-8, CXCL1, CXCL8, *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP1), *Monocyte Inhibitor Protein* (MIP) -3 $\alpha$ ), Cyclooxygenase-2 und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) steigern (Ye *et al.* 2001; Bamba *et al.* 2003).

## **1.4 Interleukin 23 steht im Zusammenhang mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Tumoren**

Neben der beschriebenen physiologischen Funktion von IL-23 besteht ein pathogenetischer Zusammenhang mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Sowohl in Tiermodellen als auch in Patientenproben konnte die Assoziation der IL-23-vermittelten Immunantwort mit autoimmunbedingten Prozessen gezeigt werden. In verschiedenen Mausmodellen konnte bei Defizienz von IL-23(p19) oder dem IL-23R eine Resistenz gegen sowohl entzündliche als auch autoimmunbedingte Erkrankungen, z.B. die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) (Cua *et al.* 2003), die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) und entzündliche Darmerkrankungen (Hue *et al.* 2006) gezeigt werden. Am Menschen konnte ein Zusammenhang von IL-23 bedingter Signaltransduktion mit multipler Sklerose (MS) (Vaknin-Dembinsky *et al.* 2006; Wen *et al.* 2012), rheumatoider Arthritis (RA) (Rasmussen *et al.* 2010), ankylosierender Spondylitis, Psoriasis (Wilson *et al.* 2007; Ryan *et al.* 2012) und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa) (Liu *et al.* 2011) belegt werden. Neben IL-23 spielen Effektoren, die sich stromabwärts der induzierten Immunantwort befinden, eine entscheidende Rolle in der Autoimmunität eines

Organismus. IL-17 als Produkt der durch IL-23 stimulierten T<sub>H</sub>17-Zellen konnte ebenfalls bei Erkrankungen, wie multipler Sklerose (Matusevicius *et al.* 1999), rheumatoider Arthritis (Ziolkowska *et al.* 2000) und Psoriasis (Teunissen *et al.* 1998) nachgewiesen werden. IL-17 produzierende T-Zellen konnten zusätzlich in der Synovial-Flüssigkeit von Patienten mit Lyme Arthritis identifiziert werden, womit diesen Zellen eine Schlüsselrolle in der durch Infektion ausgelösten Immunopathogenese zukommt (Infante-Duarte *et al.* 2000).

Da der IL-23 Signalweg eine wichtige Schnittstelle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen ist, wird mittels moderner Therapeutika versucht, in dieses System effizient einzugreifen. Antikörper stellen hierbei eine Gruppe von spezifischen Therapeutika dar, welche gezielt mit Proteinen interagieren und deren Funktion beeinträchtigen können. Das bekannteste Mitglied derartiger Medikamente ist der monoklonale IgG Antikörper Ustekinumab, welcher gegen die p40 Untereinheit von IL-12 und IL-23 gerichtet ist und somit gleichermaßen die IL-12- und IL-23-Signalgebung hemmt. Die Effektivität dieses Wirkstoffes wurde in zwei Pivot-Studien an Psoriasis Patienten belegt (Leonardi *et al.* 2008; Papp *et al.* 2008; Krulig und Gordon 2010). Des Weiteren zeigte die Behandlung mit Ustekinumab Effekte an Patienten mit moderatem bis schwerem Morbus Crohn Leiden (Sandborn *et al.* 2008). Trotz des vielversprechenden Erfolges ist ein möglicher Zusammenhang dieses Medikamentes mit ernsthaften Infektionen und Malignomen zu erwähnen (Elliott *et al.* 2009). Ein weiterer monoklonaler Antikörper mit dem gleichen Wirkungsprinzip ist Briakinumab (Lima *et al.* 2009). Neben anfänglichen Erfolgen in der Behandlung von Psoriasis waren höhere Infektionsraten, insbesondere Infektionen der oberen Atemwege, negativ zu vermerken (Gandhi *et al.* 2010). Guselkumab ist ein gegen IL-23p19 gerichteter monoklonaler Antikörper, der Erfolge in Studien an Patienten mit moderater bis schwerer Psoriasis zeigte und somit die IL-23-abhängige Ausprägung des Phänotyps belegte (Sofen *et al.* 2014).

Zusätzlich existieren antikörperunabhängige Strategien, die eine aktive Immunisierung gegen IL-23p19 anstreben oder die Inhibition eines Transkriptionsfaktors für IL-12 und IL-23 mittels Apilimod (Duvallat *et al.* 2011). Apilimod wurde von einem neuartigen Triazinderivat entwickelt, das in einem Hochdurchsatz-IL-12-Inhibitor-Screening identifiziert wurde. Mit diesem Wirkstoff wird die Synthese von IL-12 und IL-23

gleichermaßen supprimiert (Wada *et al.* 2012). In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass Apilimod die Lipidkinase *PIKfyve* hemmt und somit die Regulation der *Toll-like*-Rezeptor-vermittelte Zytokinexpression beeinflusst (Cai *et al.* 2013).

Triptolide als pflanzliche Arzneimittel in der chinesischen Medizin zeigen durch Inhibition von p40 auf Transkriptionsebene ebenfalls Wirkung gegen IL-23-vermittelte Autoimmunerkrankungen (Zhang und Ma 2010).

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Pathogenität von IL-23 stellt der Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren dar. Chronische Entzündungen sind stets mit einer höheren Inzidenz von Neoplasien verbunden, wobei immunregulatorische Mechanismen von Tumor und Entzündung strikte Gemeinsamkeiten aufweisen (Balkwill und Mantovani 2001). Besonders im Fall von IL-23 konnte gezeigt werden, dass ein konkreter Zusammenhang zwischen Tumorinzidenz und Größe unter IL-23 Einfluss vorliegt. Ein wichtiger Aspekt liegt in der durch IL-23 verminderten Einwanderung von zytotoxischen T-Zellen in das transformierte Gewebe, sodass die protektive Infiltration des Tumors von Seiten des Immunsystem vermindert ist (Langowski *et al.* 2006; Ngiow *et al.* 2013). Im Gegensatz dazu stellte sich in Untersuchungen heraus, dass IL-23 eine Tumor-protective Wirkung gegen Zellen der B-akuten lymphatischen Leukämie zeigt (Cocco *et al.* 2010). Dieses kontroverse Erscheinungsbild von IL-23 verdeutlicht, dass die Biologie dieses Zytokins noch nicht vollständig aufgedeckt und verstanden ist.

## 2 Ziele der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der intrazellulären Domäne des IL-12R $\beta$ 1 auf die IL-23-vermittelte Signaltransduktion untersucht werden. Initiale Studien der AG Scheller zeigten, dass Deletionen des intrazellulären Bereiches des IL-12R $\beta$ 1 zu einer Unterbrechung der Signaltransduktion führen. Auf Grundlage dieser Ergebnisse soll eine detaillierte Charakterisierung der intrazellulären Domäne des IL-12R $\beta$ 1 erfolgen. Zusätzlich soll die Tyk2 Bindung an den IL-12R $\beta$ 1 näher untersucht werden.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wird anhand verschiedener Deletions- und Mutationsvarianten des IL-12R $\beta$ 1 auf Zellebene untersucht, inwiefern die IL-23-abhängige Signaltransduktion von der intrazellulären Domäne der Rezeptoruntereinheit abhängig ist. Zusätzlich sollen die für die Signalgebung entscheidenden Strukturen des zytosolischen Bereichs identifiziert werden. Für diese Untersuchungen werden zwei verschiedene Zellsysteme, Ba/F3-gp130 und HeLa-Zellen, verwendet. Zunächst sollen die cDNAs der verschiedenen Rezeptorvarianten in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert werden. Anschließend werden diese zusammen mit dem Plasmid für den IL-23R zur Co-Transfektion von HeLa-Zellen verwendet. Nach Stimulation dieser Zellen erfolgt der Nachweis der Aktivierung von STAT3 mittels Western Blot. Zusätzlich werden die cDNAs der Rezeptorvarianten in den retroviralen Expressionsvektor pMOWS überführt. Nach retroviraler Transduktion von Ba/F3-gp130-IL-23R Zellen werden stabile Ba/F3-Zelllinien selektiert. Der Nachweis der Oberflächenexpression der IL-23 Rezeptoren soll mittels Durchflusszytometrie erfolgen. Selektierte Zelllinien werden im Hinblick auf die Proliferation in Gegenwart von IL-23 sowie die Aktivierung von STAT3 analysiert. Abschließend soll die Assoziation der Janus Kinase Tyk2 an ausgewählte Rezeptorvarianten näher untersucht werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits

##### *Chemikalien*

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind in Tabelle 1 gelistet.

**Tabelle 1: Auflistung der eingesetzten Chemikalien**

<b>Chemikalie/ Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Agarose-Gelelektrophorese</b>	
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Loading-Dye Solution (6x)	Thermo Scientific, St.Leon-Rot, Deutschland
Express DNA Ladder 100-5000bp	Thermo Scientific, St.Leon-Rot, Deutschland
DNA-Größenstandard GeneRuler™ 1 kb DNA-Ladder	Thermo Scientific, St.Leon-Rot, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>SDS-PAGE/ Western Blot</b>	
Acrylamid-Mix 30%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Proteingrößenstandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, St.Leon-Rot, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
BSA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

---

### Fortsetzung

Streptavidin-HRP Lösung	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris	Bethesda Research Laboratories, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
<b>Zellkultur</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
KCl	VWR International BVBA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trypan Blue Dye, 0,4%	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
TurboFect Transfektionsreagenz	Thermo Scientific, St.Leon-Rot, Deutschland
<b>Ba/F3 Stimulationstest (Zelllysate)</b>	
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Holding GmbH, Mannheim, Deutschland
NaCl	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
NP-40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<b>Immunpräzipitation</b>	
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaF	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

---

### Fortsetzung

Brij 97	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
---------	---

### Sonstige Chemikalien

Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycerin (99%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland

---

### *Verbrauchsmaterial*

Für die Doktorarbeit wurden Verbrauchsmaterialien verwendet, die in Tabelle 2 aufgelistet sind.

**Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterial	Hersteller
PVDF-Membran	VWR International BVBA, Darmstadt, Deutschland
Einwegpipetten	Corning incorporated, New York, USA
Einwegpipettenspitzen	StarLab, Hamburg, Deutschland
Extra Thick Blotting Paper	BioRad, Hercules, USA
Petrischale 10 cm (Adhärente Zellen)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Petrischale 10 cm (Bakterien, Suspensionszellen)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschale 6-well-Platte	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale 96-well-Platte	TPP, Trasadingen, Schweiz

---

*Kits*

Die im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Kits**

<b>Kits</b>	<b>Hersteller</b>
ECL Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
NucleoBond Xtra Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Qia quick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Nucleo Spin Extra Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

### 3.1.2 Puffer und Lösungen

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Puffer verwendet. Alle Lösungen wurden in destilliertem Wasser (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) angesetzt und bei Bedarf autoklaviert (20 min, 120°C, 2 bar).

**Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten Puffer und Lösungen**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
S1-Puffer für DNA-Minipräparation	1 M Tris-HCl 0,5 M EDTA 4 M NaOH 10% SDS 1:1000 RNase
S2-Puffer für DNA-Minipräparation	0,2 M NaOH 1% SDS
S3-Puffer für DNA-Minipräparation	3 M Kaliumacetat 11,5% Essigsäure
TAE-Puffer	0,4 M Tris-HCl pH 8,8 0,01 M EDTA 0,2 M Essigsäure
DNA Ladepuffer (6x)	0,25% Bromphenolblau 0,2 M EDTA

<b>Fortsetzung</b>	30% Glycerin
Lämmli Puffer (5x)	1 M Tris-HCl pH 8,8 50% Glycerol 20% SDS 10% $\beta$ -Mercaptoethanol Bromphenolblau
BSA-Lösung 5%	5% BSA in TBS-T
Magermilchpulverlösung 5%	5% Magermilchpulver in TBS-T (0,5%)
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl pH 8,25 152 mM Glycerin
Sammelgelpuffer	500 mM Tris-HCl pH 6,8 0,4% SDS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4% SDS
Transferpuffer	250 mM Tris-HCl pH 8,0 2 M Glycerin 0,01% SDS 5% Methanol
<i>Stripping</i> Puffer	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 2% SDS 0,1% $\beta$ -Mercaptoethanol
<i>Mild Lysis</i> Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 1% TritonX-100 Complete Protease Inhibitor (1 Tablette auf 50 ml Puffer)
<i>Lysis Buffer</i> Phospho-Stat 3	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1% NP-40 1% Triton X-100 1 x Complete Protease Inhibitor Tablette (1 Tablette auf 50 ml Puffer) 1 mM NaF 1 mM $\text{Na}_3\text{VO}_4$

---

### Fortsetzung

IP-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA 150 mM NaCl 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 10 mM NaF 1 mM PMSF 1% Brij 97 Complete Protease Inhibitor (1 Tablette für 50ml Puffer)
FACS-Puffer	1% BSA in PBS
Calciumchloridlösung	50 mM Calciumchlorid
PBS	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 137 mM NaCl pH 7,4
TBS	200 mM Tris pH 7,5 5 M NaCl
TBS-T	200 mM Tris pH 7,5 5 M NaCl 0,5% Tween 20

---

### 3.1.3 Medien und Antibiotika

#### *Medien*

Die in Tabelle 5 aufgeführten Medien wurden zur Kultivierung von eukaryotischen Zellen oder Bakterien verwendet.

**Tabelle 5: Zusammenstellung der verwendeten Medien**

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
DMEM <sup>++</sup>	<i>Dulbecco's Modified Eagle</i> Medium + 10% FCS, 60 mg/l Penicillin, 100 mg/l Streptomycin
LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)	0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 1% Trypton
LB-Agar (Luria-Bertani-Agar)	LB-Medium mit 1,5% Agar Agar

#### *Antibiotika*

In Tabelle 6 sind die im Rahmen der Arbeit verwendeten Antibiotika aufgeführt.

**Tabelle 6: Konzentrationsangaben der verwendeten Antibiotika**

<b>Antibiotikum</b>	<b>Stammkonzentration</b>	<b>Arbeitskonzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Ampicillin	100 mg/ml	200 µg/ml für Agarplatten, 100 µg/ml für Flüssigkultur	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Puromycin	1 mg/ml	1,5 µg/ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hygromycin B	100 mg/ml	1 mg/ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin G/ Streptomycin	10000 U/ml/ 10 mg/ml	60 mg/l/ 100 mg/l	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Germany
G418 (Geneticin)	50 mg/ml	400 µg/ml	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Germany

### 3.1.4 Geräte

Alle im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 7 gelistet.

**Tabelle 7: Geräteliste**

Gerät	Hersteller
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
BD FACS Canto II	Becton Dickson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Binder CO <sub>2</sub> -Inkubator 150 (E2) Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Heizbad Julabo sw21	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Heraeus Function Line T6 Trockenschrank	Thermo Fischer Scientific (Perbio Science), Bonn, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Rostock, Deutschland
Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik, Lancing, England
NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
INTAS Chemo Cam Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
INTAS iX Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Peqstar 2x Twin Block Thermal Cycler	PREQLAB Ltd., Crableck Lane, England
Pumpe für die Sterilbank	HLC Biotech, Göttingen, Deutschland
Research Pipetten	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Roller: Stuart roller mixer SRT 9D	Bibby Scientific, Staffordshire, England
Schüttler CH 4103	INFORS AG, Bottmingen, Deutschland
Spannungsquelle Westen Blot: Power Pac 300	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, USA
Scanlaf Mars Safety Class 2	Weiss Labortechnik GmbH, Heroldsberg, Deutschland
Tecan Infinite M200 PRO Reader	Tecan GmbH, Maennedorf, Schweiz

<b>Fortsetzung</b>	
TC10 Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Trans-Blot Turbo System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland
Vortexer	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Waage Precisa 100M-300C	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Zentrifuge: Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Laborfuge 400R	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland

### 3.1.5 Plasmide

In Tabelle 8 sind die zur Klonierung verwendeten Plasmide aufgeführt.

**Tabelle 8: Plasmide und deren Herkunft**

<b>Plasmid</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Resistenzgen</b>
pcDNA3.1	Invitrogen <sup>TM</sup> , Life Technologies	Amp
pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1	(Floss <i>et al.</i> 2013)	Amp
pcDNA3.1-mIL-23R	(Floss <i>et al.</i> 2013)	Amp
p409	(Althoff <i>et al.</i> 2001)	Amp
pMOWS-puro	(Ketteler <i>et al.</i> 2002)	Amp
pMOWS-hygro	(Suthaus <i>et al.</i> 2010)	Amp
p409-mIL-12R $\beta$ 1	(Floss <i>et al.</i> 2013)	Amp
p409-mIL-23R	(Floss <i>et al.</i> 2013)	Amp
p409-myc-gp130	(Sommer <i>et al.</i> 2012)	Amp
pEFmTyk2	Birgit Strobl (Universität der Veterinärmedizin, Vienna, Österreich)	Amp

### 3.1.6 Oligonukleotide

Für die Klonierung der verschiedenen Deletions- und Mutationsvarianten des murinen IL-12 Rezeptor  $\beta 1$  (mIL-12R $\beta 1$ ) wurden Oligonukleotide der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) verwendet. Eine Auflistung dieser findet sich in Tabelle 9.

**Tabelle 9: Übersicht der zur Klonierung verwendeten Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Verwendung
P582-584-586V	CCTGGCACTTGTGCCAGTC CTGGTTACAGTCTGTGGCAG CACTGCCG	Klonierung der Deletionsvariante mIL-12R $\beta 1$ P601V P603V P605V
P582-584-586V_antisense	CGGCAGTGCTGCCACAGACT GTAACCAGGACTGGGCACA AGTGCCAGG	Klonierung der Deletionsvariante mIL-12R $\beta 1$ -P601V P603V P605V
mIL-12R $\beta 1$ -D-Xho-fwd	CGCCTCGAGAGCCGGTACTC CACGACACG	<i>forward</i> Primer zur Klonierung der Deletionsvarianten $\Delta 595, \dots \Delta 695$
mIL-12R $\beta 1$ -D1-Not-rev	GACGCGCCGCACAGGGTG TAGGCAGGGGTG	<i>Reverse</i> Primer zur Klonierung der Deletionsvariante mIL-12R $\beta 1 \Delta 607$
mIL-12R $\beta 1$ -D2-Not-rev	GACGCGCCGCCTGCTTGCC CTGGCTGCCAG	<i>Reverse</i> Primer zur Klonierung der Deletionsvariante mIL-12R $\beta 1 \Delta 621$
mIL-12R $\beta 1$ -D3-Not-rev	GACGCGCCGCGGCCCTGTT TAAGCCAATGTATC	<i>Reverse</i> Primer zur Klonierung der Deletionsvariante mIL-12R $\beta 1 \Delta 595$
mIL-12R $\beta 1$ -D4-Not-rev	GACGCGCCGCTCGCGGGT ACAACACCTCCG	<i>Reverse</i> Primer zur Klonierung der Deletionsvariante mIL-12R $\beta 1 \Delta 638$
mIL-12R $\beta 1$ -D5-Not-rev	GACGCGCCGCCTGGGGCG ACTCTGTCCCGT	<i>Reverse</i> Primer zur Klonierung der Deletionsvariante mIL-12R $\beta 1 \Delta 657$
mIL-12R $\beta 1$ -D6-Not-rev	GACGCGCCGCGGCCAGGT CACCACGGGGAC	<i>Reverse</i> Primer zur Klonierung der Deletionsvariante mIL-12R $\beta 1 \Delta 699$
mIL-12R $\beta 1$ -D7-Not-rev	GACGCGCCGCAGGGTTGC ACCACTGCCAAG	<i>Reverse</i> Primer zur Klonierung der Deletionsvariante mIL-12R $\beta 1 \Delta 628$
mIL-12R $\beta 1$ -D8-Not-rev	GACGCGCCGCCACCTCCGG GAAGTCCTCAG	<i>Reverse</i> Primer zur Klonierung der Deletionsvariante mIL-12R $\beta 1 \Delta 634$
12R-SOE-B1-R	GCTGCCGGCCCTGTTAAGC CAATGTA	Klonierung der Deletionsvariante mIL-12R $\beta 1 \Delta 595-606$
12R-SOE-B1-F	ACAGGGCCGCAGCACTGC CGTGGAG	Klonierung der Deletionsvariante mIL-12R $\beta 1 \Delta 595-606$
12R-SOE-B2-R	AGGGGCGGCTCGCGGGTAC AACACCTC	Klonierung der Deletionsvariante mIL-12R $\beta 1 \Delta 638-656$

Fortsetzung		
12R-SOE-B2-F	ACCCGCGAGCCGCCCTGAG TGCGCC	Klonierung der Deletionsvariante mIL-12Rβ1Δ638-656
mIL-12Rβ1 pR3	GCGCGGCCGCGGCCTCTTGC CCCAAAGT	<i>reverse</i> Primer für die Klonierung der Deletionsvarianten mIL-12Rβ1Δ595-606 und mIL-12Rβ1Δ638-656
12R-gp130-SOE-F	TACATTGGCTTAAATAAGCG AGACCTAATTA	Klonierung der Variante mIL-12Rβ1-ET/hgp130-C
12R-gp130-SOE-R	TCTCGCTTATTTAAGCCAAT GTATCCGA	Klonierung der Variante mIL-12Rβ1-ET/hgp130-C
gp130-Not-R	TCTGCGGCCGCTGAGGCAT GTAGCCG	Klonierung der Variante mIL-12Rβ1-ET/hgp130-C

### 3.1.7 Bakterienstämme und Zelllinien

Der *Escherichia coli* Stamm *XL1 blue* (*{recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB+ lacIq lacZΔM15 Tn10 (Tetr)}*), Stratagene, La Jolla, CA, USA}) wurde sowohl für die Klonierung als auch die Amplifikation der Plasmid-DNA verwendet.

Die nachfolgend aufgeführten Zelllinien (siehe Tabelle 10) wurden in DMEM *High Glucose Medium* kultiviert. Die zur Proliferation der Ba/F3-gp130-Zelllinien benötigten Zytokine sind in Tabelle 12 aufgeführt. Durch die Zugabe von Hygromycin B (1 mg/ml) und/oder Puromycin (1,5 µg/ml) wurden transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen selektiert.

**Tabelle 10: Im Rahmen der Doktorarbeit verwendete Zelllinien.**

Zelllinie	Ursprung	Herkunft	Wachstumsbedingungen	Zellart
COS-7 (ACC-60)	Nierenzellen der grünen Meerkatze	Leibniz Institut DSMZ, Braunschweig, Deutschland	DMEM + 10% FCS + Penicillin (60 mg/l)/ Streptomycin (100 mg/l)	Adhärente Zellen
HeLa (ACC-57)	Humane Epithelzellen eines Cervixkarzinoms	Leibniz Institut DSMZ, Braunschweig, Deutschland	DMEM + 10% FCS +Penicillin (60 mg/l)/ Streptomycin(100 mg/l)	Adhärente Zellen

<b>Fortsetzung</b>				
Phoenix-Eco	Humane embryonale Nierenzellen	DKFZ, Ursula Klingmüller (Heidelberg, Deutschland) (Ketteler <i>et al.</i> 2002)	DMEM + 10% FCS +Penicillin (60 mg/l)/ Streptomycin (100 mg/l)	Adhärente Zellen
Ba/F3-gp130	Murine pro B-Zellen	Immunex (Seattle, WA, USA) (Gearing <i>et al.</i> 1994)	DMEM + 10% FCS +Penicillin (60 mg/l)/ Streptomycin (100 mg/l) +Hyper-IL-6 (10 ng/ml)	Suspensionszellen mit Oberflächen-expression des humanen gp130
2C4	Humane Fibrosarkomzellen	Heike Hermanns (University Würzburg, Germany)	DMEM + 10% FCS +Penicillin (60 mg/l)/ Streptomycin(100 mg/l) + G418 (400 µg/ml)	Adhärente Zellen
2fTGH	Humane Fibrosarkomzellen	Heike Hermanns (University Würzburg, Germany)	DMEM + 10% FCS +Penicillin (60 mg/l)/ Streptomycin(100 mg/l) + Hygromycin B (125 µg/ml)	Adhärente Zellen
U4C	Humane Fibrosarkomzellen (Jak1 defizient)	Heike Hermanns (University Würzburg, Germany)	DMEM + 10% FCS +Penicillin (60 mg/l)/ Streptomycin(100 mg/l) + G418 (400 µg/ml)	Adhärente Zellen
y2A	Humane Fibrosarkomzellen (Jak2 defizient)	Birgit Strobl (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria)	DMEM + 10% FCS +Penicillin (60 mg/l)/ Streptomycin(100 mg/l) + G418 (400 µg/ml)	Adhärente Zellen
U1A	Humane Fibrosarkomzellen (Tyk2 defizient)	Birgit Strobl (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria)	DMEM + 10% FCS +Penicillin (60 mg/l)/ Streptomycin(100 mg/l) + Hygromycin B (250 µg/ml)	Adhärente Zellen

### 3.1.8 Antikörper

In der nachfolgenden Tabelle sind die im Rahmen der Arbeit verwendeten Antikörper aufgelistet.

**Tabelle 11: Zusammenstellung der verwendeten Antikörper**

Antikörper, Ursprung	Herkunft	Stammlösung Konzentration	Verdünnung
Anti-myc 9E10, Maus	AG Scheller Hybridomüberstand	k. A.	1:50
Phospho-STAT3 Antikörper (Tyr705), Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	k. A.	1:1000
STAT3, Maus Antikörper, Maus	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	k. A.	1:1000
biotinylierter Anti-Maus IL- 12R $\beta$ 1 Antikörper, Ziege	R&D Systems, Minneapolis, USA	0,2 mg/mL	1:300
biotinylierter Anti-Maus IL- 23R Antikörper, Ziege	R&D Systems, Minneapolis, USA	0,2 mg/mL	1:20
Anti-Maus IL-12R $\beta$ 1- Phycoerythrin, Ziege	R&D System, Minneapolis, USA	50 $\mu$ g/mL	1:10
Maus IL-23 R Antikörper, Ratte	R&D Systems, Minneapolis, USA	0,5 mg/mL	1:20
Anti-Maus IgG HRP konjugiert, Ziege	Thermo Scientific, Waltham, USA	0,4 mg/mL	1:5000
Anti-Kaninchen IgG HRP konjugiert, Ziege	Thermo Scientific, Waltham, USA	0,4 mg/mL	1:5000
Alexa Fluor 647 konjugierter Fab Anti-Ratte IgG, Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland	1,6 mg/mL	1:100
murine Tyk2 Antikörper, Maus	Birgit Strobl (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria) (Prchal-Murphy <i>et al.</i> 2012)	1 $\mu$ g/mL	2 $\mu$ g/ml (empfohlene Arbeits- konzentration)

### 3.1.9 Zytokine

Die Zytokine zur Kultivierung der Ba/F3-Zelllinien sind in Tabelle 12 aufgeführt.

**Tabelle 12: Zytokine**

Zytokine	Konzentration im Zellkulturmedium
Rekombinates Hyper-IL-6 (rHIL-6)	10 ng/ml
kond. Zellkulturüberstand von CHO-K1-Zelllinie mit Hyper-IL-6 Expression (HIL-6)	0,2%
kond. Zellkulturüberstand von CHO-K1-Zelllinie mit Hyper-IL-23 Expression (HIL-23) (Floss <i>et al.</i> 2013)	0,2%

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Transformation von Bakterien

Die Übertragung von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* Zellen wird als Transformation bezeichnet. Das allgemeingültige Prinzip beruht darauf, dass die Zellwand der Bakterien entweder durch einen kurz anhaltenden Hitzeschock bei 42°C oder dem Aussetzen eines elektrischen Impulses (25  $\mu$ F, 2,5 kV, 200 Ohm) porös, und somit für die DNA durchlässig gemacht wird. Bei der Hitzeschocktransformation bewirkt die Zugabe von Calciumchlorid zusätzlich, dass die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen Plasmid-DNA und der bakteriellen Zellmembran ausgeglichen werden.

Um chemisch-kompetente Zellen herzustellen wurden zunächst 5 ml einer Übernachtskultur in 500 ml LB-Medium überführt und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 0,5-0,8 inkubiert. Nach dem Erreichen der gewünschten Bakteriendichte wurde nach Zentrifugation (4°C, 5000 rpm, 15 min) das Pellet in 140 ml eiskalter Calciumchloridlösung (50 mM)

resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach wiederholter Zentrifugation (4°C, 5000 rpm, 15 min) erfolgte die Resuspension des Zellpellets in 25 ml eiskalter Calciumchloridlösung mit 10% Glycerin. Nach letztmaliger Zentrifugation (4°C, 5000 rpm, 15 min) wurde das Pellet in 2 ml eiskalter Calciumchloridlösung mit 10% Glycerin resuspendiert. Die erhaltenen kompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigen Stickstoff überführt und bei -80°C gelagert.

Für die Hitzeschocktransformation wurde ein Aliquot der chemisch-kompetenten Zellen mit 1 µl Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsprodukt versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 1 min im Heizblock bei 42°C erhitzt. Nach weiterer Inkubation für 5 min auf Eis wurden 500 µl vorgewärmtes LB-Medium hinzugefügt und die Zellen für 60 min bei 37°C und Schütteln inkubiert. Anschließend wurde ein Aliquot der Bakterienlösung auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgebracht und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Das Vorgehen zur Erzeugung elektrisch-kompetenter Zellen unterscheidet sich lediglich dadurch, dass in den einzelnen Schritten anstatt der Calciumchloridlösung H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> eingesetzt wird.

Bei der Elektroporation wurde ein Aliquot elektrokompetenter Zellen mit 1 µl Plasmid-DNA oder 5 µl Ligationsprodukt versetzt und in eine vorgekühlte Küvetten überführt. Die anschließende Elektroporation erfolgte im Elektroporator (Eporator, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω. Nach Zufügen von 500 µl vorgewärmtem LB-Medium wurden die Ansätze in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 1 h unter ständigem Schütteln. Danach wurde ein Aliquot der Bakterienlösung auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgebracht und bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 3.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Analyse putativer *E. coli* Klone nach Transformation wurde die Plasmid-DNA mittels Mini-Präparation isoliert. Hierfür wurden 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und Schütteln inkubiert. Mittels Zentrifugation (5000 rpm, 10 min, RT) wurden die Bakterien geerntet und das erhaltene Pellet in 100 µl S1-Puffer

resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl S2-Puffer fand die alkalische Lyse der Zellen statt und wurde nach 5 min mit 150 µl S3-Puffer beendet. Durch das im Neutralisationspuffer (S3-Puffer) enthaltene Kaliumacetat fand eine Denaturierung zellulärer Proteine statt. Mittels Zentrifugation (13000 rpm, 4°C, 15 min) erfolgte die Trennung der Proteine von der in der Lösung befindlichen DNA. Zur Fällung Letzterer wurde 900 µl 100% Ethanol zugegeben und zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 15 min). Nach Verwerfen des Überstandes wurde die präzipitierte DNA durch Zugabe von 500 µl 70% Ethanol und erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 4°C, 10 min) gewaschen. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet für 5-10 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 30 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Für die Restriktionsanalyse (siehe Punkt 3.2.1.5) der erhaltenen DNA wurde 1 µl eingesetzt.

Um eine höhere Ausbeute an Plasmid-DNA zu erhalten (1000-5000 ng/µl) wurde eine Midi-Präparation mit Hilfe des NucleoBond Xtra Kit von Macherey-Nagel durchgeführt. Durch Zugabe des im Kit enthaltenden alkalischen Lysepuffers wurden die Bakterien lysiert. Nach Zufügen des Neutralisationspuffers und mehrmaligem intensiven Schwenken der Lösung konnte direkt die mitgelieferte Säule beladen werden. Während die nach Lyse entstandenen Zellfragmente im Filter zurückgehalten wurden, passierte die Plasmid-DNA den Filter und wurde mithilfe eines Silikatgranulats am unteren Ende der Säule gebunden. Als positiv geladener Anionenaustauscher ging das Granulat mit der negativ geladenen DNA eine Bindung ein. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit den entsprechenden Puffern, um die Plasmid-DNA von Verunreinigungen zu befreien. Nachdem die zurückgehaltene DNA mittels Elutionspuffer eluiert wurde, folgte die Fällung mit Isopropanol und Zentrifugation (13000 rpm, 4°C, 30 min). Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend zentrifugiert. Durch vorsichtiges Pipettieren unter Schonung des DNA-Pellets wurde dieses vom 70% Ethanol befreit und an der Luft getrocknet. Die DNA wurde nun in entsprechender Menge H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gelöst, die Konzentration der DNA am Nanodrop bestimmt (siehe Punkt 3.2.1.3) und mittels Restriktionsanalysen (siehe Punkt 3.2.1.5) kontrolliert.

### 3.2.1.3 Bestimmung der DNA mittels UV-Spektroskopie

DNA-Konzentrationen wurden im Rahmen dieser Arbeit mit dem NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) gemessen. Je nach Konzentration der Probe wurde das von einer Lichtquelle ausgesandte UV-Licht unterschiedlich stark absorbiert. Unter Berücksichtigung des Lambert-Beer'schen Gesetzes konnte ein Zusammenhang zwischen der Konzentration der DNA und der Abschwächung der Intensität des Lichtstrahls nach dem Passieren der Probe hergestellt werden. Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgte anhand der gemessenen Absorption bei 260 nm. Hierbei galt folgender Zusammenhang: Einer Extinktion von 1 entsprechen  $50 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$  doppelsträngige (ds) DNA,  $40 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$  RNA und  $33 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$  einzelsträngige (ss) DNA (Oligonukleotid bzw. cDNA).

### 3.2.1.4 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente können anhand ihrer Größe in einem Agarosegel unter Anlegen einer äußeren Spannung voneinander getrennt werden. Die negativ geladene DNA bewegt sich im elektrischen Feld in Richtung des Pluspols und passiert das Gel umso schneller, je geringer ihre Größe ist. Auf Grund dessen muss die Konzentration des Gels je nach der Größe des zu bestimmenden DNA-Fragments gewählt werden. Eine hohe Konzentration an Agarose ermöglicht die genaue Definition kleiner DNA-Abschnitte, wobei ein geringer Agarosegehalt das Augenmerk auf entsprechend größere Fragmente legt. In dieser Doktorarbeit wurden standardmäßig 1%-ige Gele zur Bestimmung von DNA-Fragmentlängen verwendet. Für die Visualisierung der DNA mit Hilfe von UV-Licht wurde 1%-ige Ethidiumbromidlösung in die noch nicht polymerisierte Agaroselösung gegeben. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare von DNA und ermöglicht so deren Detektion am UV-Tisch. Die Trennung der DNA erfolgte bei einer konstanten Spannung (70 – 100 V). Für eine Abschätzung der Fragmentgröße wurden DNA-Marker (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific, Waltham, USA) aufgetragen.

### 3.2.1.5 Restriktionsanalyse von DNA

Zur Klonierung von Plasmiden und für Restriktionsanalysen von DNA werden bakterielle Endonukleasen verwendet. Diese schneiden DNA an spezifischen, palindromischen Basensequenzen unter Spaltung der Phosphodiesterbindung. So entstehen Fragmente ohne (*blunt ends*) oder mit Überhängen an den Enden (*sticky ends*).

Restriktionsenzyme und die zur Reaktion benötigten Puffer stammten von der Firma Thermo Scientific (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland). Die Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellers der Enzyme durchgeführt. Die resultierenden DNA-Abschnitte wurden anschließend mittels Gelelektrophorese (siehe Punkt 3.2.1.4) analysiert und in Vektoren eingefügt (Ligation, siehe Punkt 3.2.1.8).

### 3.2.1.6 Gelextraktion

Durch Gelelektrophorese voneinander getrennte DNA-Fragmente wurden anschließend aus dem Gel extrahiert. Nach Ausschneiden des gewünschten DNA-Fragmentes mit einem Skalpell wurde die DNA unter Verwendung des Qiaquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration der erhaltenen DNA-Lösung wurde anschließend mittels UV-Spektroskopie bestimmt.

Das hier verwendete Kit zur Extraktion der DNA-Fragmente wurde im Rahmen der Doktorarbeit ebenfalls zur Reinigung von PCR-Fragmenten und Restriktionsansätzen verwendet.

### 3.2.1.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente, die nur in einer sehr geringen Konzentration vorliegen, werden mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) in kurzer Zeit amplifiziert. Die als *template* bezeichnete Ausgangs-DNA wird zusammen mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase, einem entsprechenden Puffer, zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer) und den Nukleotiden in einem PCR-Ansatz gemischt. Anschließend erfolgt die Amplifikation des gewünschten DNA-Fragmentes in einem Thermocycler.

Die Reaktionsschritte einer Standard-PCR lassen sich wie folgt gliedern:

- Initiale Denaturierung bei 95°C zum Auftrennen der Sekundärstruktur beider DNA-Stränge
- Mehrere Zyklen (ca. 25-30) bestehend aus:
  - Denaturierung (95°C)
  - Annealing* (Anlagerung) der spezifischen Oligonukleotide bei ca. 55-60°C
  - Elongation der Primer unter Vorlage des DNA-Gegenstranges bei 72°C
- Finale Elongation (72°C)

*PCR zur Amplifikation von Fragmenten für Klonierungen*

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde ein 50 µl Ansatz für die Klonierung verschiedener DNA-Fragmente unter Verwendung der *Pfu* Polymerase standardmäßig verwendet. Diese hitzestabile DNA-Polymerase weist eine Korrekturlesefunktion (*proof reading*) auf und ist somit in der Lage, den Einbau eines unpassenden Nukleotids zu erkennen und dieses anschließend wieder aus der DNA zu entfernen (3'→5'-Exonuklease-Aktivität).

Ein 50 µl Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 1 µl *template* DNA (ca. 0,5 pg Plasmid-DNA)
- 5 µl *Pfu* Puffer (enthält 20 mM MgSO<sub>4</sub>)
- 3 µl *forward* Primer (10 µM)
- 3 µl *reverse* Primer (10 µM)
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 0,5 µl *Pfu* Polymerase (2,5 u/µl)
- 36,5 µl H<sub>2</sub>O

Standardmäßig wurde folgendes PCR-Programm ausgeführt:

Initiale Denaturierung	95°C	5 min
Denaturierung	95°C	1 min
<i>Annealing</i>	60°C	1 min
Elongation	72°C	2 min/kb
-----		
	30 Zyklen	
-----		
Finale Elongation	72°C	10 min
Kühlung	4°C	∞

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte im Agarosegel (siehe Punkt 3.2.1.4). Die gewünschten Fragmente wurden anschließend aus dem Gel extrahiert (siehe Punkt 3.2.1.6), die DNA-Konzentration bestimmt, die Fragmentenlänge mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert und zur Ligation verwendet.

### *Colony-PCR*

Die Polymerasekettenreaktion wurde ebenfalls für die Selektion von Einzelkolonien, die auf einer Agarplatte mit Selektionsantibiotikum gewachsen waren, eingesetzt. Hierfür wurden zunächst 20 µl H<sub>2</sub>O in Reaktionsgefäße vorgelegt und ein kleiner Teil der Bakterienkolonie hinzugefügt. Das Bakterien-H<sub>2</sub>O-Gemisch wurde nun für 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden 30 µl PCR-Ansatz bestehend aus:

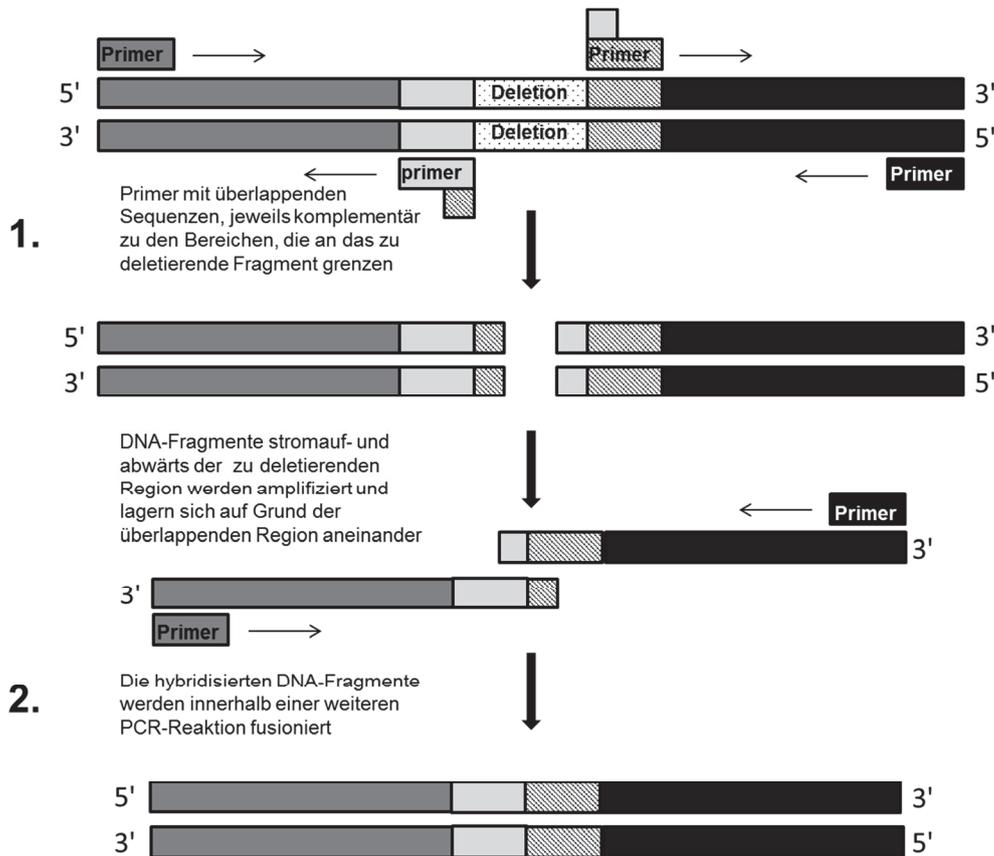
5 µl DreamTaq Puffer (enthält 20 mM MgCl<sub>2</sub>)  
4 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
2,5 µl *forward* Primer (10 µM)  
2,5 µl *reverse* Primer (10 µM)  
1 µl dNTP-Mix (10 mM)  
1 µl DreamTaq (1 U/µl)  
14 µl H<sub>2</sub>O

zugegeben und das PCR-Programm gestartet. Die PCR-Produkte wurden anschließend im Agarosegel kontrolliert (siehe Punkt 3.2.1.4).

### *SOE-PCR*

Für die Deletionsvarianten des IL-12Rβ1 Δ595-606 und Δ638-656 sowie der Variante mit intrazellulärer Domäne von gp130 wurde eine SOE-PCR (*splicing by overlapping extension-PCR*) durchgeführt.

Das Prinzip dieser Reaktion beruhte auf der Amplifikation zweier Fragmente unter der Verwendung von flankierenden Primern, die komplementär zum jeweils anderen Fragment waren. In einer nachfolgenden PCR-Reaktion mit den äußeren Primern konnten diese DNA-Abschnitte fusioniert werden (siehe Abb. 4). Für diese PCR-Variante wurde ebenfalls die *Pfu* Polymerase mit *proofreading* Aktivität verwendet.



**Abb. 4: Prinzip der SOE-PCR am Beispiel einer Deletion.** Diese spezielle Variante der PCR ermöglicht es DNA-Abschnitte einer vorgegebenen *template* DNA zu deletieren oder Fragmente miteinander zu fusionieren. Dabei werden Primer benötigt, die Überlappungen in der Sequenz mit dem späteren Fusionspartner besitzen. Lagern sich nach der ersten Reaktion beide Fragmente aneinander kann in einem zweiten Schritt unter Verwendung extern gelegener Primer das Fusionsprodukt amplifiziert werden.

### *Site-directed Mutagenesis*

Um gezielte Mutationen innerhalb einer cDNA einzufügen, wurde die *Site-directed mutagenesis* PCR eingesetzt. Hierfür wurden *sense* und *anti-sense* sequenzspezifische Oligonukleotide mit der gewünschten Mutation sowie die Phusion Polymerase (Thermo Scientific, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland), die ebenfalls *proof reading* Aktivität besitzt, verwendet. Zunächst wurden zwei PCR-Reaktionen mit dem *sense* oder *anti-sense* Primer und folgender Zusammensetzung gestartet:

1  $\mu$ l *template* DNA  
 10  $\mu$ l HF Puffer  
 0,4  $\mu$ l Primer (0,1 mM)  
 1  $\mu$ l dNTP-Mix (10 mM)  
 1  $\mu$ l *Phusion* Polymerase (2 U/ $\mu$ l)  
 36,6  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Initiale Denaturierung	98°C	4 min
Denaturierung	98°C	1 min
<i>Annealing</i>	55°C	1 min
Elongation	72°C	15-30 s/kb
----- 15 Zyklen -----		
Finale Elongation	72°C	12 min
Kühlung	4°C	$\infty$

Anschließend wurden die PCR Produkte vereinigt, nochmals 1  $\mu$ l *Phusion* Polymerase hinzugefügt und die PCR erneut gestartet. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mittels Qiaquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das *template* Plasmid wurde mittels abschließender DpnI Restriktion eliminiert. Dieses Enzym ist spezifisch für methylierte DNA und schneidet somit nur das aus *E. coli* stammende *template* Plasmid und nicht das *in vitro* generierte und somit nicht methylierte, mutierte Plasmid. Die Restriktionsspaltung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach Inaktivierung des Enzyms für 20 min bei 80°C wurden 5-10  $\mu$ l des Ansatzes direkt in *E. coli* Bakterien transformiert (siehe Punkt 3.2.1.1). Die Analyse putativer Klone erfolgte nach Isolation der Plasmid-DNA durch Sequenzierung (siehe Punkt 3.2.1.9).

### 3.2.1.8 Ligation

Das Verknüpfen von zwei DNA-Fragmenten (linearisierter Vektor und *insert* DNA) am 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatende durch Phosphodiesterbindung unter ATP-Hydrolyse wird als Ligation bezeichnet. Für die Klonierungen im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde das Einfügen eines *inserts* in den vorgesehenen Vektor durch die T4 DNA-Ligase katalysiert. Die benötigte Menge an *insert* DNA wurde anhand folgender Formel bestimmt:

$$\text{Insert [ng]} = \frac{5 \times \text{Masse Vektor [ng]} \times \text{Länge des Inserts [bp]}}{\text{Länge des Vektors [bp]}}$$

Folgender Ligationsansatz wurde standardmäßig verwendet:

- 50-100 ng Vektor
- x *insert* DNA
- 2 µl T4 Ligase Puffer (10x)
- 2 µl T4 DNA Ligase
- 2 µl PEG4000 (bei *blunt end* Reaktionen)
- H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> *ad* 20 µl

Das Gemisch wurde 1-2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 5-10 µl des Ligationsproduktes in kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

### 3.2.1.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde von der Firma GATC Biotech AG (Köln, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung der Nukleotidsequenzen erfolgte mit den Programmen *ClustalW2* und *Chromas Lite*.

## 3.2.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.2.1 Kultivierung von Zellen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in DMEM *high glucose culture medium* mit 10% fetalem Kälberserum (BSA), 60 mg/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Wachstumsstimulanz wurde den Ba/F3-gp130-Zellen Hyper-IL-6 (HIL-6) entweder als rekombinantes Protein (10 ng/ml) oder 0,2% des konditionierten Zellkulturüberstandes eines stabilen HIL-6 sekretierenden CHO-K1 Klons (ca. 10 µg/ml bestimmt mittels ELISA) hinzugegeben. Die Ba/F3 Varianten mit Expression des mIL-23R und Varianten des mIL-12Rβ1 wurden nach Selektion und Proliferationsanalyse mit 0,2% konditioniertem

Zellkulturüberstand eines stabilen Hyper-IL-23 (HIL-23) sekretierenden CHO-K1 Klons (ca. 5,5 µg/ml bestimmt mittels ELISA) versetzt. Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Ba/F3-Zellen sind murine pro B-Zellen, die ausschließlich mit IL-3 im Kulturmedium proliferieren. Diese Zellen wurden mit der cDNA für humanes gp130 transfiziert und sind somit in der Lage, im Beisein des Designerzytokins HIL-6 zu wachsen (Gearing *et al.* 1994). HIL-6 ist ein Fusionsprotein aus dem löslichen IL-6R (sIL-6) und IL-6. Beide Proteine sind über einen Linker miteinander verbunden (Fischer *et al.* 1997). HIL-23 ist analog zum HIL-6 aufgebaut und beinhaltet p40 und p19 sowie eine Linkersequenz. Hygromycin-B für Varianten mit dem IL-12Rβ1 und Puromycin für den IL-23R wurden als Selektionsantibiotikum in einer Arbeitskonzentration von 1 mg/ml bzw. 1,5 µg/ml verwendet. Die humanen Fibrosarkomzelllinien 2C4, U4C and γ2A wurden mit G418 (400 µg/ml) versetzt, während zu den Zelllinien 2fTGH und U1A 125 bzw. 250 µg/ml Hygromycin B hinzugegeben wurden.

COS-7-, HeLa- und Phoenix-Eco-Zellen wurden wöchentlich zweimal im Verhältnis 1:50, Ba/F3-gp130-Zellen wurden wöchentlich im Verhältnis 1:10000 und die Fibrosarkomzelllinien wöchentlich zweimal im Verhältnis 1:10 passagiert. Das Ablösen der adhären Zellen erfolgte bei COS-7-Zellen nach Inkubation mit Trypsin-EDTA für 5 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Bei HeLa-Zellen und den Fibrosarkomzelllinien erfolgte die Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Phoenix-Zellen wurden mit PBS von der Zellkulturplatte ab gespült.

### 3.2.2.2 Transfektion von adhären Zellen

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden die Zelllinien COS-7, HeLa, Phoenix-Eco und die humanen Fibrosarkomzelllinien U1A, γ2A, U4C, 2C4, 2fTGH mit Plasmiden transfiziert. Das als Transfektionsreagenz verwendete TurboFect (Fermentas, Thermo Scientific) bildet zusammen mit der Plasmid-DNA stabile, positiv geladene Komplexe. Die DNA wird somit vor enzymatischem Abbau geschützt und kann in eukaryotische Zellen eingeschleust werden.

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen mit folgender Dichte ausgesät, um eine Konfluenz von 70-90% zu erhalten:

COS-7:  $1 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm-Schale (10 ml Medium)

HeLa:  $2 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm-Schale (10 ml Medium)

Phoenix-Eco:  $8 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung einer 6-well-Platte (2 ml Medium)

Fibrosarkomzelllinien U1A,  $\gamma$ 2A, U4C, 2C4, 2fTGH:  $2 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm-Schale (10 ml Medium)

Hierfür wurde zunächst das Zellkulturmedium entfernt und die COS-7-, HeLa- und Fibrosarkomzelllinien mit 10 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der adhärenen Zellen wurden COS-7-Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA für 5 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Bei HeLa-Zellen und den Fibrosarkomzelllinien erfolgte die Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Phoenix-Zellen wurden mit PBS von der Platte abgespült. Nach dem Überführen der Zellen in DMEM<sup>+/+</sup> wurde die Zellzahl mittels Zellzählgerät (Zellcounter BioRad TC10) bestimmt und die Zellen in der gewünschten Anzahl in neue Schalen ausgebracht.

Für die Transfektion am folgenden Tag wurde zelllinienabhängig der in Tabelle 13 aufgeführte Transfektionsansatz bereitgestellt. DMEM<sup>-/-</sup> stellt das Medium ohne Zugabe von FCS und Penicillin/Streptomycin dar

**Tabelle 13: Transfektion der adhärenen Zelllinien mit Plasmid-DNA.**

Zelllinie	DNA-Menge [ $\mu$ g]	TurboFect [ $\mu$ l]	Volumen DMEM <sup>-/-</sup> [ml]	Zellkulturgefäß
COS-7	5 $\mu$ g; Co- Transfektion jeweils 2,5 $\mu$ g	10 $\mu$ l	1 ml	10 cm-Schale
HeLa	Co-Transfektion mit jeweils 4 $\mu$ g Plasmid-DNA	16 $\mu$ l	1,6 ml	10 cm-Schale
Phoenix-Eco	1 $\mu$ g Plasmid- DNA	2 $\mu$ l	200 $\mu$ l	6-well-Platte

---

**Fortsetzung**

Fibrosarkomzelllinien U1A, $\gamma$ 2A, U4C, 2C4, 2fTGH	Co-Transfektion mit jeweils 2,5 $\mu$ g	10 $\mu$ l	1 ml	10 cm Schale
---	--	------------	------	--------------

---

Die Komponenten wurden gemischt und nach einer Inkubation von 20 min bei RT tropfenweise zu den Zellen gegeben. Ein Wechsel des entsprechenden Zellkulturmediums erfolgte ca. 6 h nach der Transfektion. Bei der Transfektion von Phoenix-Eco-Zellen wurde das alte Medium nach 6 h durch DMEM<sup>+/+</sup> mit einem Anteil von 30% FCS ausgetauscht.

### 3.2.2.3 Retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen

Phoenix-Zellen sind in der Lage, transfizierte DNA dem Vorbild des Retrovirus folgend in mRNA zu transkribieren und diese in Virushüllproteine einzubauen. Sie dienen somit als Verpackungszelllinie bei der retroviralen Transduktion. Die sezernierten Viruspartikel können Ba/F3-Zellen infizieren und übertragen somit die mRNA. Mit Hilfe der Reversen Transkriptase, wird die mRNA in cDNA umgeschrieben und anschließend in das Genom der infizierten Zelle, in diesem Fall der Ba/F3 Zelle, integriert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle Varianten des murinen IL-12R $\beta$ 1 in den retroviralen Expressionsvektor pMOWS-hygro (Suthaus *et al.* 2010) kloniert. Der entsprechende Vektor für den murinen IL-23R lag bereits vor (pMOWS-puro-IL-23R Floss *et al.* 2013). Zur Selektion von transduzierten Zellen enthält dieser eine Antibiotikaresistenz. Der Vektor für die Varianten des mIL-12R $\beta$ 1 war mit einer Hygromycin-B-Resistenz ausgestattet (pMOWS-hygro), während der Vektor des mIL-23R das Resistenzgen für Puromycin besaß (pMOWS-puro) (Ketteler *et al.* 2002).

Zunächst wurden Phoenix-Eco-Zellen mittels TurboFect wie unter Punkt 3.2.2.2 beschrieben transfiziert. Circa 6 h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM<sup>+/+</sup>, das jedoch 30% FCS enthielt. Am folgenden Tag wurde der Überstand der Phoenix-Eco-Zellen mit den Viruspartikeln kurz zentrifugiert (2000 rpm, RT, 10 min), um tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wurden 250  $\mu$ l des Überstandes mit  $1 \times 10^5$  Ba/F3-Zellen und 3  $\mu$ l Polybrene (Sigma Aldrich, 800  $\mu$ g/ml)

gemischt. Das Hinzufügen von Polybrene sollte die Effizienz der retroviralen Transduktion erhöhen. Nach 2 h Zentrifugation bei RT und 1800 rpm wurde das Zellpellet in 5 ml DMEM<sup>+/+</sup> resuspendiert und in eine Vertiefung einer 6-*well*-Platte überführt. 10 ng/ml rHIL-6 ermöglichte die Proliferation der Ba/F3-Zellen. 48 h nach der Transduktion erfolgte die Zugabe von Hygromycin B (1 mg/ml) und Puromycin (1,5 µg/ml) zur Selektion der transduzierten Zellen. Transduzierte Zellen wurden für mindestens zwei Wochen mit den Selektionsantibiotika kultiviert. Anschließend erfolgte die Analyse der Zellen im Proliferationsassay (siehe Punkt 3.2.2.4) und mittels Durchflusszytometrie die Analyse der Oberflächenexpression der Zytokinrezeptoren (siehe Punkt 3.2.2.5).

### 3.2.2.4 Zellproliferationsassay

Zur genauen Analyse des Proliferationsverhaltens der transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen nach Zugabe von Zytokinen wurde der CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Promega) durchgeführt. Dieser Test beruht auf dem Umsatz des blauen Redoxfarbstoffs Resazurin durch metabolisch aktive Zellen zum pinkfarbenen, fluoreszenten Resorufin. Über Messung der Fluoreszenz bei 560 nm kann mittels Plattenreader die der lebenden Zellen proportionale Menge Resorufin gemessen werden.

Ba/F3-Zellen wurden nach dreimaligem Waschen mit PBS (Zentrifugation bei RT, 1500 rpm, 5 min) in DMEM<sup>+/+</sup> resuspendiert und auf eine Zellzahl von  $5 \times 10^4$ /ml eingestellt. In eine 96-*well* Platte wurden für jede Zelllinie jeweils in drei Vertiefungen Varianten ohne Zytokin, mit 0,2% HIL-6 oder 0,2% HIL-23 in einem Volumen von 100 µl ausgesät. Nach einer Inkubation von mindestens 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank wurde 20 µl *CellTiter-Blue*-Lösung in jede Vertiefung pipettiert und die Fluoreszenz zum Zeitpunkt 0 sowie nach 20, 40 und 60 min gemessen. Die Messwerte wurden durch Subtraktion der Werte vom Zeitpunkt 0 normalisiert. Für einen besseren Vergleich der verschiedenen Zelllinien wurde die Proliferation in Gegenwart von HIL-6 gleich 100% gesetzt.

### 3.2.2.5 Analyse der Oberflächenexpression der Zytokinrezeptoren

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Registrierung optischer Signale von Zellen beim Passieren eines Laserstrahls. Werden nun spezielle, mit Fluorophoren gekoppelte Antikörper gegen bestimmte Strukturen auf der Oberfläche der Zelle, z. B. den extrazellulären Teil des murinen IL-12R $\beta$ 1 oder IL-23R eingesetzt, können durch die Veränderungen des Emissionsverhaltens konkrete Analysen vorgenommen werden.

Für die Färbung der Ba/F3-gp130-Zellen mit den spezifischen Antikörpern wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt. 500000 Zellen wurden in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (2000 rpm, 4°C, 5 min). Nach Resuspension der Zellen in 1 ml FACS-Puffer (siehe Tabelle 4), wurde erneut zentrifugiert (2000 rpm, 4°C, 5 min) und der Puffer anschließend entfernt. Der Antikörper zur Detektion des murinen IL-12R $\beta$ 1 (Anti-Maus IL-12R $\beta$ 1-Phycoerythrin) war direkt mit dem Fluorophor gekoppelt und wurde 1:10 in FACS-Puffer verdünnt. 500.000 Zellen wurden in 100  $\mu$ l dieser Lösung resuspendiert. Der Antikörper gegen den murinen IL-23R (Maus IL-23 R Antikörper) wurde 1:20 in FACS-Puffer verdünnt und ebenfalls in einem Volumen von 100  $\mu$ l eingesetzt. Nach Inkubation von ca. 2 h auf Eis (IL-23R) bzw. im Dunkeln bei 4°C (IL-12R $\beta$ 1) wurde 1 ml FACS-Puffer zu der Zellsuspension gegeben und anschließend zentrifugiert (2000 rpm, 4°C, 5 min). Die Zellpellets für die Färbung des IL-12R $\beta$ 1 wurden in 500  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert und anschließend am FACS CantoII (BD Biosciences) ausgewertet. Der Nachweis der Oberflächenexpression des IL-23R erforderte die Inkubation mit einem zweiten Antikörper, der ebenfalls mit einem Fluorophor gekoppelt war. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde der Alexa Fluor 647 konjugierte Fab Ziege Anti-Ratte IgG Antikörper (1:100) verwendet. Die Analyse der Proben erfolgte am FACS-Gerät (FACS CantoII, BD) und die Auswertung unter Verwendung der FCS Express Software (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA).

### 3.2.2.6 Stimulationsassay zur Untersuchung der STAT3 Aktivierung

Stimulationsassays wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um die Aktivierung von STAT3 nach Stimulierung mit IL-23 sowohl in co-transfizierten HeLa- und Fibrosarkomzelllinien als auch in transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen zu untersuchen.

Nach Transfektion der HeLa-Zellen und Fibrosarkomzelllinien wurden diese am Folgetag mit PBS gewaschen und mit Medium ohne FCS versehen (*Starving*). Die Stimulation der Zellen erfolgte 16 h später durch Zugabe von 0,2% HIL-23 für 15 min im Falle von HeLa- und 30 min für die Fibrosarkomzelllinien. Anschließend wurden die Zellen geerntet und in 150 µl *Lysis Buffer* Phospho STAT3 (siehe Tabelle 4) lysiert.

Transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen wurden dreimal mit sterilem PBS gewaschen und für 4 h in Serum-freien DMEM Medium passagiert (*Starving*). Nach Stimulation mit HIL-23 für 1 h wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren, bis die Lyse mit 100 µl *Lysis Buffer* Phospho STAT3 erfolgte

Der Proteingehalt der HeLa, Fibrosarkom und Ba/F3 Zelllysate wurde mittels BCA-Methode (Pierce) nach Herstellerangaben bestimmt (siehe Punkt 3.2.3.2). Die STAT3 Aktivierung wurde mit Hilfe von Antikörpern, die gegen das phosphorylierte STAT3 Protein gerichtet sind, im Western Blot analysiert.

### **3.2.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten**

Im Rahmen der Arbeit wurden Zelllysate für weitere biochemische Analysen hergestellt.

COS-7-, HeLa- und die Fibrosarkomzelllinien wurden 48 h nach Transfektion lysiert. Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums zunächst mit 10 ml PBS gewaschen, anschließend in 1 ml PBS unter Verwendung eines Zellschabers von der Platte abgelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (14000 rpm, 4°C, 5 min), der Überstand verworfen und das erhaltene Zellpellet im entsprechenden Lysepuffer resuspendiert.

Die transduzierten Ba/F3-gp130-Zelllinien wurden durch Zentrifugation geerntet (5000 rpm, RT, 5 min), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Lyse bei -80°C gelagert.

Die Lyse der Zellen erfolgte für 2 h bei 4°C unter ständigem Rollen. Nach nochmaliger Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, 4°C) wurde der Überstand (= Zelllysate) in ein neues

Eppendorfreaktionsgefäß überführt, mit Lämmli-Puffer versetzt, und mittels Western Blot analysiert.

### 3.2.3.2 Quantifizierung von Proteinen

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde mit dem BCA Protein Assay (Pierce, Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers im 96-*well*-Platten Format bestimmt. Die BCA-Reaktion beinhaltet die Reduktion von zweiwertigen zu einwertigen Kupfer-Ionen in Anwesenheit von Proteinen. Das Zusammenspiel von einwertigen Kupfer-Ionen und der heterocyclischen Verbindung Bicinchoninsäure ergibt einen violetten Farbstoff, dessen Absorption bei 562 nm proportional zur Proteinkonzentration ist. Anhand einer vergleichenden Eichgerade mit BSA wurde die Proteinkonzentration der Zelllysate berechnet.

### 3.2.3.3 Co-Immunpräzipitationsassays

Zur Untersuchung der Interaktion der Tyrosinkinase Tyk2 mit dem murinen IL-12Rβ1 wurden Co-Immunpräzipitationsanalysen durchgeführt. Hierfür wurden COS-7-Zellen mit den Expressionsplasmiden für murines Tyk2 und den Varianten des IL-12Rβ1 co-transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen geerntet und in IP-Puffer lysiert. Nach Entfernen der Zelltrümmer durch Zentrifugation wurden die Lysate mit Anti-Tyk2 Antikörper (2 µg/ml) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 50 µl Protein-A-Agarose und eine weitere Inkubation von 2 h bei 4°C unter leichtem Rollen. Nach dreimaligem Waschen der Agarose mit Lysepuffer (1 min, 13000 rpm, 4°C) wurde der IP-Puffer vollständig entfernt und die Agarose mit 50 µl 2,5 x Lämmli-Puffer versetzt. Anschließend folgte die Inkubation für 10 min bei 95°C. Die Analyse der Interaktion des Zytokinrezeptors und der Januskinase wurde mittels Western Blot durchgeführt.

### 3.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Die Trennung von Proteinen anhand ihrer Molekülmasse erfolgte mittels *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE). Dabei fungiert das Polyacrylamidgel als eine Art Sieb, durch welches größere bzw. längere Proteine nach Anlegen einer äußeren Spannung langsamer wandern als kleinere. Damit die Bewegung

im elektrischen Feld allein zur Molekülmasse proportional ist, muss die Eigenladung der Proteine mit SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) überdeckt und die zu trennenden Proteine linearisiert werden. Durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol, das sich im Lämmli-Puffer befindet, werden Disulfidbrücken zerstört und durch Inkubieren der Proben bei 95°C (10 min) die Sekundär- und Tertiärstruktur aufgelöst. Der in Tabelle 4 beschriebene 5 x Lämmli-Puffer enthält sowohl SDS als auch  $\beta$ -Mercaptoethanol und wird in einem Verhältnis von 1:5 der Proteinlösung beigemischt. Anschließend wird die Probe 10 min bei 95°C inkubiert.

Das Polyacrylamidgel besteht aus Sammel- und Trenngel, die sich wiederum in Porengröße und pH-Wert unterscheiden (diskontinuierliches Trennverfahren). Am Übergang vom neutralen Sammelgel zum basischen Trenngel, werden die Proteine auf Grund des pH-Gradienten konzentriert und beim Durchlaufen des Trenngels anhand ihrer Größe (Molekulargewicht) voneinander getrennt (Laemmli 1970).

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden 10%-ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Ihre Zusammensetzung ist in Tabelle 14 aufgelistet.

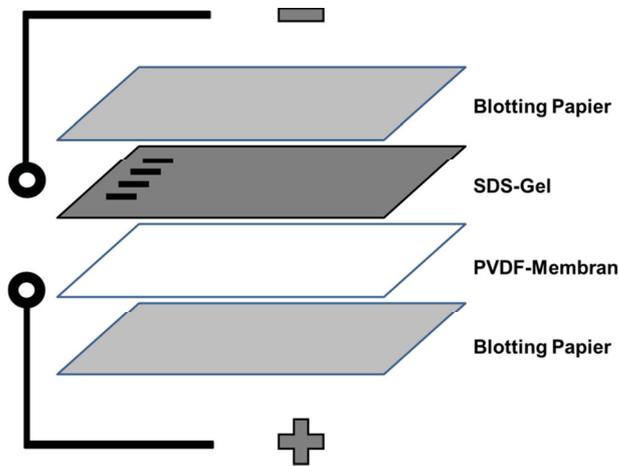
**Tabelle 14: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel**

Komponente	Trenngel (10 ml)	Sammelgel (4 ml)
H <sub>2</sub> O	4,0 ml	2,28 ml
30% Acrylamid-Mix	3,3 ml	0,67 ml
Puffer	2,6 ml	1,0 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml
APS	0,100 ml	0,04 ml

Die Trennung der Proteine mittels SDS-Page erfolgte bei 20 V.

Die Übertragung von Proteinen eines SDS-Gels auf eine Membran und die Detektion der Proteine wird als Western Blot bezeichnet. Entlang eines elektrischen Feldes wandern zunächst die Proteine zur Membran und bleiben je nach Membranart auf Grund hydrophober oder ionischer Wechselwirkung an ihr haften. Die im Rahmen

dieser Arbeit eingesetzte PVDF-Membran besticht durch die hydrophobe und polare Wechselwirkung mit Proteinen. Der Aufbau des sogenannten *semi-dry* Verfahrens ist in Abbildung 5 dargestellt.



**Abb. 5: Prinzip des *semi-dry* Western Blotting Verfahrens.** Auf vier Lagen in Transferpuffer getränktes *blotting* Papier wird eine durch Methanol aktivierte PVDF-Membran gelegt. Anschließend kommt die SDS-Page mittig auf der Membran zu liegen und wird von vier Lagen *blotting* Papier bedeckt. Wird nun eine äußere Spannung (1 h, 20 V) angelegt, können die Proteine auf die Membran übertragen und unter Verwendung von markierten Antikörpern sichtbar gemacht werden.

Die zuvor durch Methanol aktivierte PVDF-Membran wurde auf vier Lagen in Transferpuffer (siehe Tabelle 4) getränktes *blotting* Papier (Extra Thick Blotting Paper, BioRad, Hercules, USA) gelegt. Das SDS-Gel wurde anschließend mittig auf der Membran platziert und mit vier Lagen *blotting* Papier bedeckt. Nach dem Transfervorgang (1 h, 20 V) wurde die Membran für 3 h in 15 ml 5% Magermilchpulverlösung inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und der primäre Antikörper in der entsprechenden Konzentration zugegeben. Nach Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper über Nacht, wurde die Membran abermals mit TBS-T gewaschen. Anschließend konnte der Sekundärantikörper, welcher gegen seinen Vorgänger gerichtet und mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt ist, in der entsprechenden Konzentration auf die Membran gegeben werden. Die AK lagen entweder in einer 1%igen BSA-Lösung oder 5%iger Magermilchlösung vor. Nach Inkubation für 1 bis 1,5 h wurde mittels ECL Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB) und des ChemoCam Imagers (INTAS Science

Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) die Chemilumineszenz detektiert: Die an dem Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert das im Reagenz enthaltene Luminol. Bei diesem Prozess wird das Molekül kurzzeitig in einen angeregten Zustand versetzt. Das beim Übergang auf das ursprüngliche Niveau emittierte Licht kann mit Hilfe des ChemoCam Imagers unter Verwendung einer speziellen Kamera detektiert werden. Für eine weitere Beprobung der PVDF-Membran mit einem anderen Antikörper wurde die Membran für 30 min bei 60°C in *stripping* Puffer inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS-T konnte die Membran erneut mit 5%iger Magermilchpulverlösung blockiert und mit einem neuen Antikörper inkubiert werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Analyse der intrazellulären Domäne des IL-12Rβ1

Der IL-12Rβ1 mit der strukturellen Ähnlichkeit zur IL-6 Rezeptoruntereinheit gp130 wird in eine extrazelluläre (AS 20-564), transmembrane (AS 565-591) und intrazelluläre Domäne (AS 592-738) unterteilt (siehe Abb.6).

	<b>TM</b>	
Mensch	RAGVAYTVQVRADTAWLRGVWSQPQRFSEIVQVSDW---	LIFASLGSFLSILLVGVLY 567
Schimpanse	RAGVAYTVQVRADTAWLRGVWSQPQRFSEIVQVSDW---	LIFASLGSFLSILLVGVLY 528
Rhesusaffe	RAGVAYTVQVRADTAWLRGAWSPQRFSEIKVQVSDW---	FIFASLGSFLSILLVGVLY 489
Katze	RAGTAYTVQVRADTVTLQGAWSQPQPFSEVQVSDW---	DLSVLLASLGSFLSILLVGVLY 574
Schwein	RAGAAVMQVRADTAKWQGSWSQPLRFSEIVPSELRLDLSIFLASLGSFMSILLGVVLY 574	
Pferd	SAGAAVMQVRADTETRRGAWSPQRFSEVQVSEL---	SVVLVSLGSFVSVLLVGLTY 432
Ratte	RSRVVYKQVRADTAMLPGSWSRQRFSEVQISRL---	SIVFASLGSFASVLLVGSLY 590
Maus	RSRVMYKQVRADTARLPGAWSHPQRFSEVQISRL---	SIIFASLGSFASVLLVGSLY 588
	<b>Box1</b>	<b>Box2</b>
Mensch	LGLNRAARHLC <b>PP</b> LPTPCASSAIEFP--GGKETWQWINPVDFQEEASLQEALV <b>VVEM</b> SWDK 625	
Schimpanse	LGLNRAARHLC <b>PP</b> LPTPCASSAIEFP--GGKETWQWINPVDFQEEASLQEALV <b>VVEM</b> SWDK 586	
Rhesusaffe	LGLNRAARHLC <b>PP</b> LPTPCASSAIEFP--AGKETWQWINPVDFQEEASLQEALV <b>VVEM</b> SWDK 547	
Katze	LGLNRAARYL <b>CP</b> LPTPCASTVVEFHSSQGGKQAWQWTSADFPPEEVYRKEALV <b>VNV</b> SWEK 634	
Schwein	LGLNRVVRHLC <b>CP</b> LPTPCASTAVEFSDSQGGKQVWQWTSADFPPEEVSQ <b>Q</b> EALV <b>VNM</b> MSWDK 634	
Pferd	LGLSRAIRHLC <b>CP</b> LPTPCASTAVELPHSQGGKQAWQWISADFPPEESSPEKVLV <b>VSM</b> PCDK 492	
Ratte	LGLNRAAWHLC <b>CP</b> LPTPCGSAVEFPQSGKQAWQWRNPEDFPEVLYPRDALV <b>VEM</b> PRDR 650	
Maus	LGLNRAAWHLC <b>CP</b> LPTPCGSAVEFPQSGKQAWQWNPEDFPEVLYPRDALV <b>VEM</b> PGDR 648	
	▲ 595      ▲ 607      ▲ 621      ▲ 628      ▲ 634      ▲ 638	
Mensch	GERTEP-----LEKTELPEGAPALDTELSLEDGD--RCKAKM-----	662
Schimpanse	GERTEP-----IEKTELPEGAPALDTELSLEDGD--RCKAKM-----	623
Rhesusaffe	GERTEL-----LEKTELPEGAPALDTELSLEDGD--RCKAKV-----	584
Katze	GEGTDLDTPGHLKEKTRLLQGTPELALDAELPSEDRR--QVRGHPEAQTPEPGRQDGLGEG 692	
Schwein	GEGVDPDTPGPLEKEMELPLDAPEPALDMELPLEHRR--QAQGHPEPGLTRSGWHGGLEG 692	
Pferd	HEETDLDTPEPLEEKPKPPRGAPALDTELSLEDGR--QVQEHL-----	535
Ratte	DDETES-----PQATPERALDTRWPLGTEG--QVQGLSEARLPDLAREDCPRG 696	
Maus	GDGTES-----PQAAPCALDTRRPLETQRQRQVQALSEARRLGLAREDCPRG 696	
	▲ 657	
Mensch	-----	
Schimpanse	-----	
Rhesusaffe	-----	
Katze	SPAQAAGLPLLLGDLIQTPVFGSPSHTGLEA-----	723
Schwein	SPAQTAGLLLLLGDRLRQTPRFGSQGERGTSASSYIEED----	730
Pferd	-----	
Ratte	DLAHVT-LPLLLGDVTOGASVLGDLWWIHKTVEPGPPTLGQEA	738
Maus	DLAHVT-LPLLLGGVTOGASVLDDLRWTHKTAEPGPPTLGQEA	738
	▲ 699	

**Abb. 6: Die Primärstruktur des IL-12Rβ1.** Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen des IL-12Rβ1 aus verschiedenen Spezies ist dargestellt, wobei die Transmembrandomäne (TM) dunkelblau hervorgehoben wurde. Die vorhergesagten Box1 (lila) und Box2 Motive (grau) zeigen sich als hoch konservierte Region in der cytoplasmatischen Domäne des Rezeptors (Chua *et al.* 1995). Innerhalb des putativen Box1 Motivs sind die Proline rot markiert, die im Rahmen dieser Arbeit zu Valin mutiert wurden. Innerhalb des Box2 Motivs ist die Konsensussequenz  $\Phi\Phi E\Phi$  unterstrichen. Die Pfeile markieren die in dieser Arbeit erstellten Deletionsvarianten des murinen IL-12Rβ1.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die intrazelluläre Domäne dieser Rezeptoruntereinheit charakterisiert werden. Im Gegensatz zur humanen Variante besitzt der murine IL-12R $\beta$ 1 ein Tyrosin (Y635) in dessen intrazellulärem Teil (Chua *et al.* 1995).

Das 6-10 Aminosäuren umfassende Box1 Motiv liegt 6 AS von der Transmembrandomäne entfernt und ist durch eine prolinreiche Sequenz charakterisiert. Die Konsensussequenz des Box1 Motivs entspricht  $\phi\phi PX(I/V)XP(E/K)$ , wobei  $\phi$  für eine hydrophobe Aminosäure steht (Usacheva *et al.* 2002). Das Box2 Motiv wird als eine weniger exakt definierte Region beschrieben und beinhaltet die Sequenz (V/L)E(V/L)L, die durch die Konsensussequenz  $\phi\phi E\phi$  repräsentiert wird (Usacheva *et al.* 2002). Ein Vergleich der IL-12R $\beta$ 1 Proteinsequenz verschiedener Spezies belegt die hohe Homologie innerhalb dieser Bereiche (siehe Abb. 6). Die Homologie innerhalb der Aminosäuresequenz des IL-12R $\beta$ 1 in den aufgeführten Spezies liegt bei 23,9%, wobei der Vergleich der intrazellulären Domäne eine Homologie von 16,9% zeigt. Während die Sequenz des Box1 Motivs innerhalb der verschiedenen Spezies identisch ist, besitzt das Box2 Motiv lediglich eine Homologie von 15,4% (Daten generiert mit dem Alignment Programm UniProt auf der Website <http://www.uniprot.org/align/>).

## 4.2 Klonierung der Expressionsvektoren der verschiedenen IL-12R $\beta$ 1 Varianten

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die cDNA des murinen IL-12R $\beta$ 1 als Grundlage für die weitere Klonierung und Analyse des jeweiligen Rezeptors verwendet (Floss *et al.* 2013).

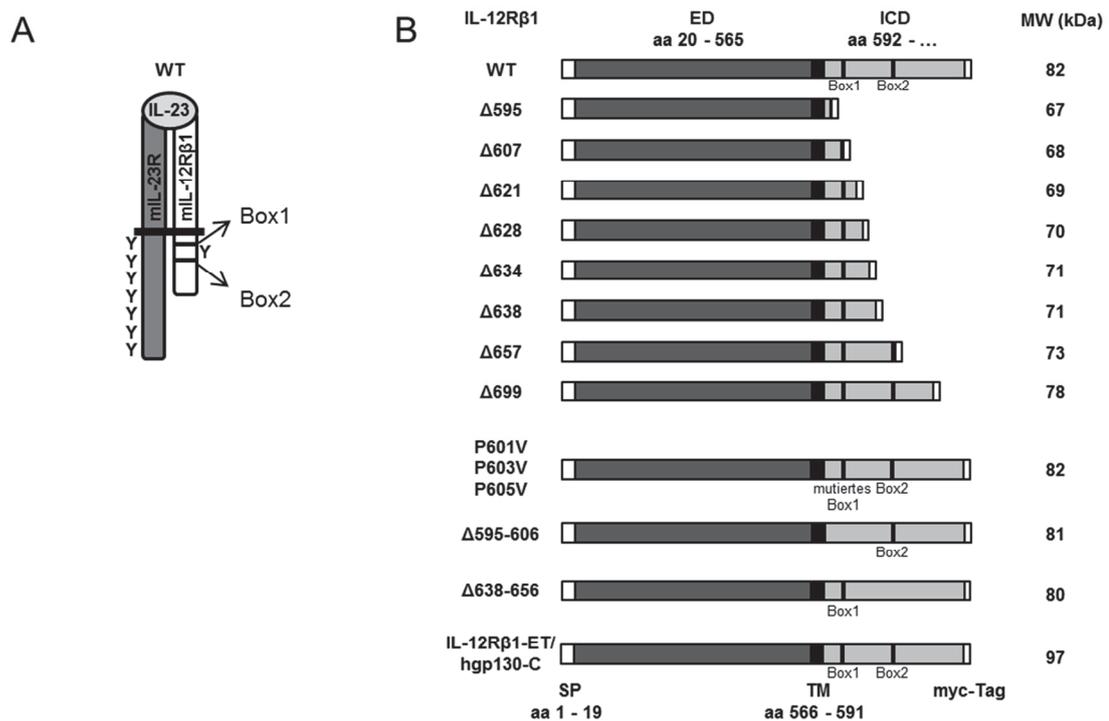
### *Generierung der pcDNA 3.1-Vektoren*

Für eine nähere Charakterisierung des mIL-12R $\beta$ 1 wurden die in Abbildung 7 aufgeführten Deletions- und Mutationsvarianten erstellt.

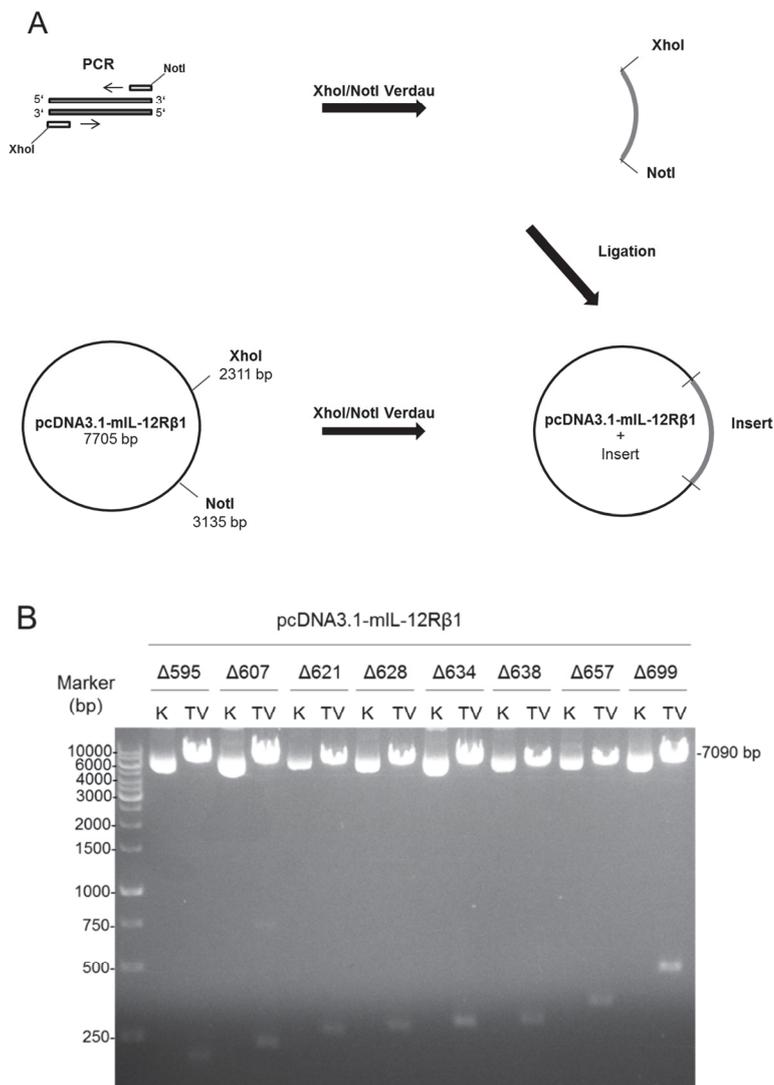
Für die Klonierung wurde der zu Beginn der Doktorarbeit vorliegende Expressionsvektor pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1 mit C-terminalem c-Myc tag (Floss *et al.* 2013) als Ausgangsplasmid verwendet. Mittels PCR (siehe Punkt 3.2.1.7) unter Verwendung der in Tabelle 9 aufgeführten Primer konnten Plasmide mit IL-12R $\beta$ 1 cDNAs generiert werden, die für unterschiedlich lange intrazellulärer Domänen des

IL-12R $\beta$ 1 kodieren (IL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 595,  $\Delta$ 607,  $\Delta$ 621,  $\Delta$ 628,  $\Delta$ 634,  $\Delta$ 638,  $\Delta$ 657,  $\Delta$ 699).

Die 3'-Primer wurden so gewählt, dass unmittelbar nach dem Triplet der letzten Aminosäure eine NotI-Restriktionsschnittstelle folgte. Eine XhoI Schnittstelle war Bestandteil des 5'-Primers. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen XhoI und NotI behandelt und in den ebenfalls mit XhoI und NotI gespaltenen pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1 Vektor ligiert (siehe Abb. 8A).



**Abb. 7: Deletionsvarianten des IL-12R $\beta$ 1.** A. Der murine IL-23 Rezeptorkomplex besteht aus dem IL-23R und dem IL-12R $\beta$ 1. Innerhalb des IL-12R $\beta$ 1 befinden sich die vorhergesagten Box1 und Box2 Motive und ein Tyrosinrest. Im Gegensatz dazu sind 7 Tyrosine in der cytoplasmatischen Domäne des murinen IL-23R beschrieben (Parham *et al.* 2002). B. Dargestellt ist eine Übersicht der verschiedenen Varianten des IL-12R $\beta$ 1, die im Rahmen dieser Arbeit kloniert wurden. Mehrere Expressionsvektoren mit unterschiedlich langer intrazellulärer Domäne des IL-12R $\beta$ 1 wurden erstellt. Zusätzlich wurden Varianten kloniert, die ein mutiertes (P601V P603V P605V) oder kein putatives Box1 Motiv ( $\Delta$ 595-606) besitzen. Die Variante  $\Delta$ 638-656 weist kein putatives Box2 Motiv auf. In einer weiteren Modifikation des IL-12R $\beta$ 1 wurde die intrazelluläre Domäne durch die entsprechenden Aminosäuren der Rezeptorkette gp130 ersetzt. Das berechnete Molekulargewicht (ohne Glykosylierung) der einzelnen Rezeptorvarianten wurde hinzugefügt.

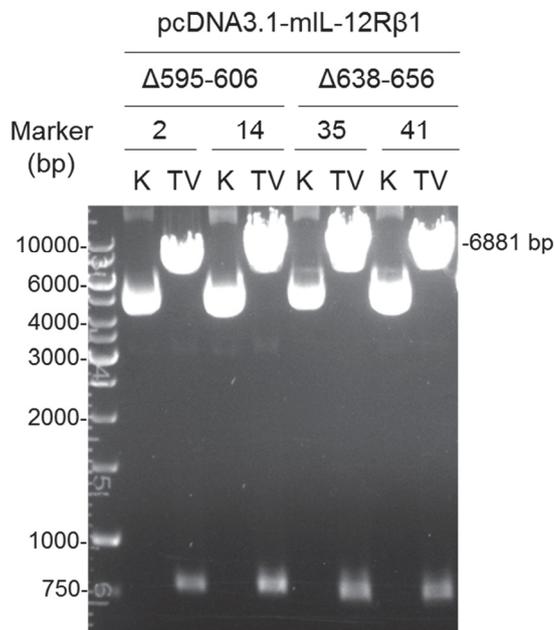


**Abb. 8: Klonierung der einzelnen Deletionsvarianten des IL-12Rβ1 in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1.** A. Der Expressionsvektor pcDNA3.1 mit C-terminalem c-Myc *tag* lag als Ausgangsplasmid vor. Mittels PCR und spezieller Primer konnten Deletionsvarianten des IL-12Rβ1 erstellt werden, wobei der 3' Primer eine NotI und der 5' Primer eine XhoI Schnittstelle besaß. Die PCR Produkte und der Vektor pcDNA3.1-mIL-12Rβ1 wurden mit XhoI/NotI behandelt und die Inserts anschließend mit dem geöffneten Vektor ligiert. B. Nach Transformation in kompetente *E. coli XLI blue* Zellen wurde die Plasmid-DNA isoliert und mittels HindIII/EcoRI Restriktion analysiert. Auf dem hier dargestellten Agarosegel wurden die unbehandelten Vektoren (K) neben den geschnittenen Vektoren (TV) aufgetragen. Fragmentgrößen: Δ595 (183 bp + 7090 bp); Δ607 (219 bp + 7090 bp); Δ621 (261 bp + 7090 bp); Δ628 (282 bp + 7090 bp); Δ634 (300 bp + 7090 bp); Δ638 (312 bp + 7090 bp); Δ657 (369 bp + 7090 bp); Δ699 (498 bp + 7090 bp). Marker: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, St.Leon-Rot, Deutschland)

Nach Transformation in kompetente *E. Coli XL1 blue* Zellen wurden erwartete Plasmid-Klone mittels Restriktionsanalyse identifiziert und pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 595, - $\Delta$ 607, - $\Delta$ 621, - $\Delta$ 628, - $\Delta$ 634, - $\Delta$ 638, - $\Delta$ 657, - $\Delta$ 699 genannt. In Abbildung 8B ist die Analyse der einzelnen Varianten des mIL-12R $\beta$ 1 in pcDNA3.1 mittels HindIII/EcoRI Restriktion und Agarosegelelektrophorese dargestellt. Die behandelten Vektoren zeigten die erwarteten Fragmentgrößen:  $\Delta$ 595 (183 bp + 7090 bp);  $\Delta$ 607 (219 bp + 7090 bp);  $\Delta$ 621 (261 bp + 7090 bp);  $\Delta$ 628 (282 bp + 7090 bp);  $\Delta$ 634 (300 bp + 7090 bp);  $\Delta$ 638 (312 bp + 7090 bp);  $\Delta$ 657 (369 bp + 7090 bp);  $\Delta$ 699 (498 bp + 7090 bp). Da sich die unbehandelten Vektoren als geschlossenes Plasmid schneller innerhalb des Gels bewegen, weichen ihre detektierten Größen von den tatsächlichen Längen ab. Die resultierenden pcDNA3.1 Vektoren aller IL-12R $\beta$ 1 Deletionsvarianten wurden durch Sequenzierung überprüft.

Zur Deletion der putativen Box1 und Box2 Motive wurden Primer für eine sogenannte SOE-PCR benötigt, die stromauf und -abwärts der Box Motive binden und diesen Bereich der *template* DNA ausklammern. Des Weiteren mussten die Primer der späteren Fusionsseite Überlappungen mit dem Fusionspartner besitzen (siehe Abb. 4). Unter Verwendung der PCR-Reaktion wurden zunächst zwei DNA Fragmente amplifiziert, die am 5' bzw. 3' Ende Überlappungen aufwiesen (Abschnitt vor und nach dem Box Motiv). Anschließend konnten durch eine gezielte Fusions-PCR unter Verwendung der äußeren Primer beide DNA-Fragmente miteinander verbunden werden. Die äußeren Primer wiesen wiederum Restriktionsschnittstellen der Enzyme XhoI und NotI auf. Analog zu den Deletionsvarianten erfolgte die Restriktion der PCR-Produkte und anschließende Ligation in den Vektor pcDNA3.1. Nach Transformation in kompetente *E. coli XL1 blue* Zellen wurden putative Klone mittels Restriktionsanalyse identifiziert. In Abbildung 9 ist die Analyse der beiden Varianten des mIL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 595-606 und - $\Delta$ 638-656 in pcDNA3.1 mittels XhoI/NotI Restriktion und Agarosegelelektrophorese dargestellt. Die unbehandelten Vektoren pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 595-606 und pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 638-656 besitzen eine Größe von 7669 bp bzw. 7648 bp, wobei sich diese als zirkuläres Plasmid schneller innerhalb des Gels bewegen und somit ihre detektierten Größen von den tatsächlichen Längen abweichen. Nach XhoI/NotI Restriktion zeigen sich für die Vektoren

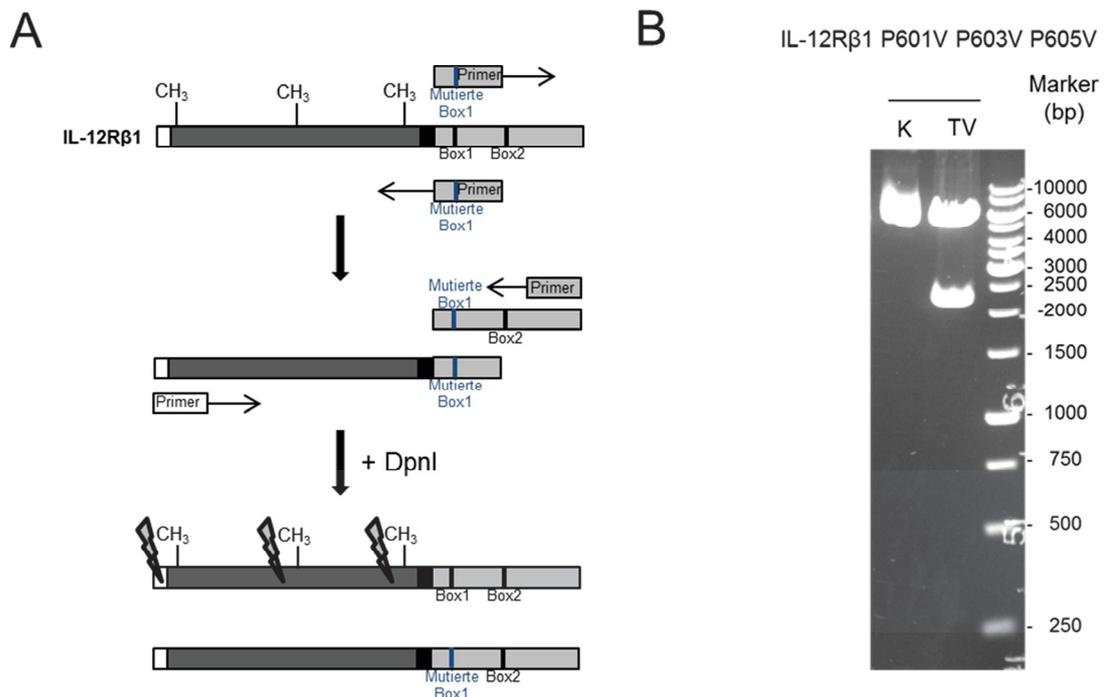
pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 595-606 und pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 638-656 die erwarteten Fragmentgrößen von 788 bp und 6881 bp bzw. 767 bp und 6881 bp.



**Abb. 9: Klonierung der Varianten des IL-12R $\beta$ 1 ohne Box1 oder Box2 Motiv.** Mittels SOE-PCR und anschließender Fusions-PCR wurde eine DNA-Sequenz des IL-12R $\beta$ 1 ohne Box1 oder Box2 Motiv synthetisiert. Die Ligation mit dem Vektor pcDNA3.1 erfolgte analog zu den bereits genannten Deletionsvarianten. Nach Transformation in kompetente *E. coli XL1 blue* Zellen wurde die Plasmid-DNA isoliert und mittels Restriktion und Agarosegelelektrophorese analysiert. Auf dem hier abgebildeten Agarosegel ist die XhoI/NotI Restriktion der Plasmide pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 595-606 mit den Plasmid-Klonen 2, 14 und pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 638-656 mit den Plasmid-Klonen 35, 41 dargestellt. Die unbehandelten Vektoren (K) wurden neben den geschnittenen Vektoren (TV) aufgetragen. Fragmentgrößen:  $\Delta$ 595-606 (788 bp + 6881 bp);  $\Delta$ 638-656 (767 bp + 6881 bp). Marker: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, St.Leon-Rot, Deutschland)

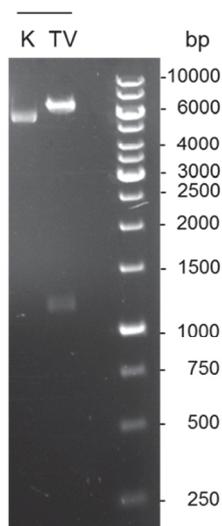
Zur weiteren Untersuchung des Box1 Motivs wurde eine Variante mit Punktmutationen der Aminosäure Prolin zu Valin an den Positionen 601, 603, 605 des IL-12R $\beta$ 1 erzeugt (Kloek *et al.* 2002). Die Punktmutationen erfolgten mittels *Site-directed mutagenesis* PCR unter Verwendung eines *sense* sowie *anti-sense* Primers, bei dem die entsprechenden Triplets verändert waren. Diese Primer wurden unter Verwendung des Programms der Firma *Agilent* (<https://www.genomics.agilent.com>) erzeugt. In zwei aufeinander folgenden Reaktionen wurden mittels PCR vollständige Plasmide mit den entsprechenden Mutationen amplifiziert. Die *template* DNA wurde durch DpnI Verdau entfernt (siehe Abb. 10A). Nach Transformation dieser Plasmide in kompetente *E. coli*

*XL1 blue* Zellen wurden putative Klone mittels Restriktion und Sequenzierung analysiert. Abbildung 10B zeigt die mittels Agarosegelelektrophorese analysierte Plasmid-DNA, die unbehandelt eine Größe von 7705 bp und nach AflIII/NotI Restriktion entsprechende Fragmentgrößen von 2227 bp und 5478 bp besitzt. Da sich der unbehandelte Vektor als zirkulierendes Plasmid schneller innerhalb des Gels bewegt, weicht seine detektierte Größe von seiner tatsächlichen Länge ab. Das erhaltene Plasmid wurde pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1 P601V P603V P605V genannt.



**Abb. 10: Einfügen gezielter Mutationen in das Box1 Motiv mit *Site-directed mutagenesis*.** A. Zur Klonierung der Variante IL-12R $\beta$ 1 P601V P603V P605V wurden ein *sense* und ein *anti-sense* Primer verwendet, bei denen die Triplets dieser Aminosäuren entsprechend verändert waren (designt mit Hilfe des Programms von Agilent: <https://www.genomics.agilent.com>). Mittels PCR konnten nun in zwei aufeinander folgenden Reaktionen Plasmide mit der gewünschten Mutation synthetisiert werden. Da die *template* DNA methyliert ist, wurde diese mittels DpnI Verdau geschnitten, um folgend einen Ansatz mit ausschließlich vollständiger synthetisierter Plasmid-DNA zu generieren. B. Nach Transformation der erzeugten Vektoren in kompetente *E. Coli XL1 blue* Zellen wurde die Plasmid-DNA isoliert, mittels AflIII/NotI Restriktion und Agarosegelelektrophorese analysiert. Der zirkuläre Vektor (K) mit einer Größe von 7705 bp ist neben dem geschnittenen Vektor (TV) mit den Fragmentgrößen von 2227 bp und 5478 bp dargestellt. Marker: GeneRuler<sup>TM</sup> 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, St.Leon-Rot, Deutschland)

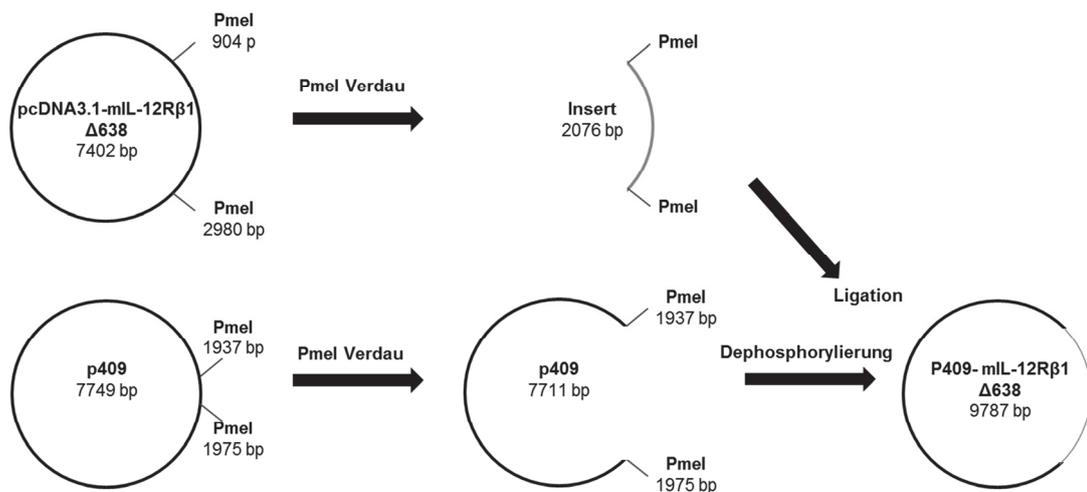
Für die Klonierung einer Variante des IL-12R $\beta$ 1, bei der die intrazelluläre Domäne (AS 592-738) durch die der gp130 Rezeptorkette ersetzt ist, wurde ebenfalls die SOE-PCR verwendet. Zunächst wurde ein Fragment der extrazellulären Domäne und der Transmembrandomäne des IL-12R $\beta$ 1 mit einer XhoI *site* am 5' Ende amplifiziert. Zusätzlich erfolgte eine PCR zur Vervielfältigung der intrazellulären Domäne von gp130 mit einer NotI Restriktionsstelle am 3' Ende. Beide Fragmente wurden mittels Fusions-PCR miteinander verbunden, mit den Enzymen XhoI und NotI behandelt und in den ebenfalls geschnittenen pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1 Vektor ligiert. Nach Transformation des Ligationsansatzes in kompetente *E. coli* Zellen wurden putative Plasmid-Klone mittels Restriktionsverdau überprüft und die Sequenz analysiert. Abbildung 11 zeigt die mittels Agarosegelelektrophorese analysierte Plasmid-DNA, die unbehandelt eine Größe von 8095 bp und nach XhoI/NotI Restriktion Fragmentgrößen von 1214 bp und 6881 bp besitzt. Da sich das zirkuläre Plasmid schneller innerhalb des Gels bewegt, weicht seine detektierte Größe von seiner tatsächlichen ab. Das erhaltene Plasmid wurde pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1-ET/hgp-130-C genannt.

IL-12R $\beta$ 1-ET/hgp-130-C

**Abb.11: Klonierung der Variante IL-12R $\beta$ 1-ET/hgp-130-C.** Bei dieser Variante wurde mittels SOE-PCR die intrazelluläre Domäne des IL-12R $\beta$ 1 (AS 592-738) durch die der gp130 Rezeptorkette ersetzt. Nach Transformation des erzeugten Vektors in kompetente *E. coli* XLI blue Zellen wurde die Plasmid-DNA isoliert, mittels XhoI/NotI Restriktion und Agarosegelelektrophorese analysiert. Auf dem hier dargestellten Agarosegel ist der unbehandelte Vektor (K) mit einer Größe von 8095 bp neben dem geschnittenen Vektor (TV) mit den Fragmentgrößen von 1214 bp und 6881 bp dargestellt. Marker: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, St.Leon-Rot, Deutschland)

### *Subklonierung der IL-12R $\beta$ 1-Varianten kodierenden cDNAs in die Expressionsvektoren p409 und pMOWS*

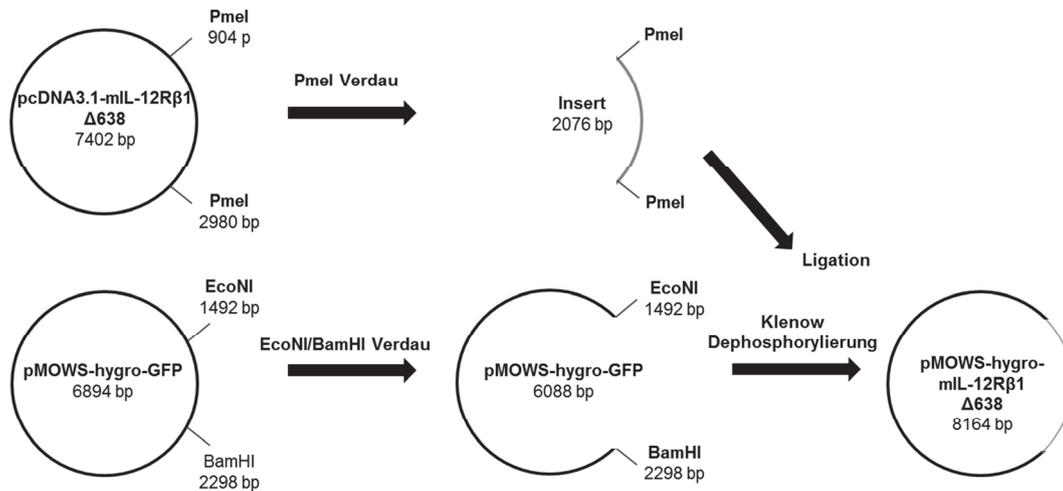
Für eine erhöhte Expression der IL-12R $\beta$ 1 Varianten in eukaryotischen Zellen war die Umklonierung der cDNA in den Vektor p409 notwendig (siehe Abb. 12). Auch die retrovirale Transduktion verlangte eine Überführung der cDNAs in den retroviralen Expressionsvektor pMOWS-hygro (siehe Abb. 13).



**Abb. 12. Umklonierung der Varianten des IL-12R $\beta$ 1 von pcDNA3.1 in p409.** Beispielfhaft wird hier der Klonierungsvorgang anhand der Variante IL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 638 gezeigt. Sowohl der Vektor p409 als auch pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 638 wurden mit PmeI geschnitten. Zur Verhinderung einer Re-Ligation wurde das geöffnete Plasmid des p409 Vektors dephosphoryliert. In einer anschließenden Reaktion wurde das Insert mit dem Vektor ligiert.

Jeweils 10  $\mu$ g DNA der pcDNA3.1 Vektoren der verschiedenen Varianten des IL-12R $\beta$ 1 wurden mit PmeI geschnitten. Die gewünschten PmeI-Fragmente wurden nach Agarosegelelektrophorese aus dem Gel eluiert. Der Vektor p409 wurde ebenfalls mit PmeI geschnitten. Das Plasmid pMOWS-hygro wurde zunächst mit BamHI und EcoNI geschnitten, die entstandenen klebrigen Enden mittels Klenow-Fragment aufgefüllt und anschließend zur Verhinderung der Religation dephosphoryliert. Die entsprechenden Inserts wurden mit dem vorbereiteten Vektor p409 und pMOWS-hygro ligiert (siehe Punkt 3.2.1.8). Die anschließende Transformation und Präparation der ligierten Vektor DNA erfolgte wie bereits beschrieben. Die resultierenden Plasmide wurden als p409-mIL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 595,  $\Delta$ 607,  $\Delta$ 621,  $\Delta$ 628,  $\Delta$ 634,  $\Delta$ 638,  $\Delta$ 657,  $\Delta$ 699,  $\Delta$ 595-606,  $\Delta$ 638-656, -P601V P603V P605V, -ET/hp130-C und pMOWS-hygro-

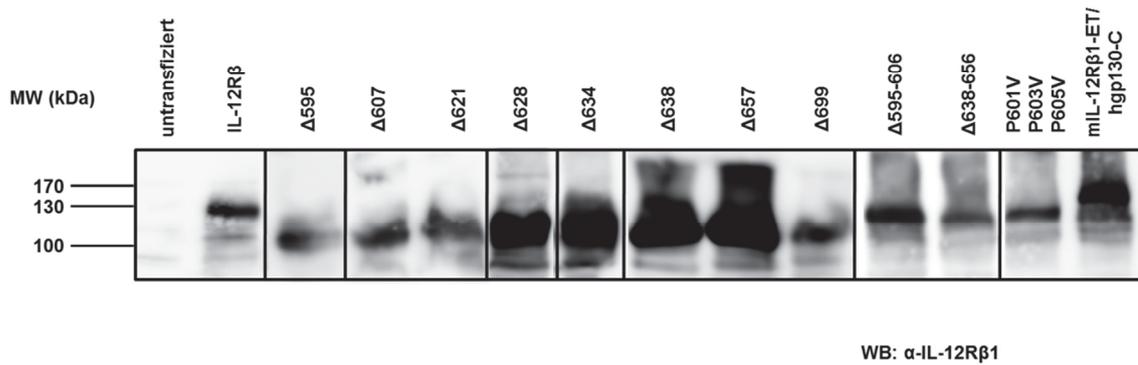
mIL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 595, - $\Delta$ 607, - $\Delta$ 621, - $\Delta$ 628, - $\Delta$ 634, - $\Delta$ 638, - $\Delta$ 657, - $\Delta$ 699, - $\Delta$ 595, - $\Delta$ 606, - $\Delta$ 638-656, -P601V P603V P605V, -ET/hp130-C bezeichnet.



**Abb. 13: Überführen der Varianten des IL-12R $\beta$ 1 von pcDNA3.1 in pMOWS-hygro-GFP.** Anhand der Variante IL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 638 ist die Umklonierung schematisch dargestellt. Das Insert wurde mittels PmeI-Verdau aus dem Vektor pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 638 isoliert. Der Vektor pMOWS-hygro-GFP wurde mit EcoNI und BamHI geschnitten, die klebrigen Enden mittels Klenow-Fragment aufgefüllt und anschließend dephosphoryliert. In einem folgenden Ligationsansatz wurde das Insert in den Vektor pMOWS-hygro-GFP eingefügt.

### 4.3 Expression der IL-12R $\beta$ 1-Varianten in COS-7-Zellen

Inwiefern die zuvor klonierten cDNAs im Rahmen der Transkription und Translation in die entsprechenden Proteinketten umgesetzt werden, wurde in der Zelllinie COS-7 überprüft. Eine 10 cm Schale mit COS-7-Zellen (70-80% konfluent) wurde mit 5  $\mu$ g Plasmid-DNA transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen lysiert und die Proteine in den resultierenden Zelllysaten mittels SDS-PAGE voneinander getrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurden diese mittels eines IL-12R $\beta$ 1 Antikörpers detektiert.



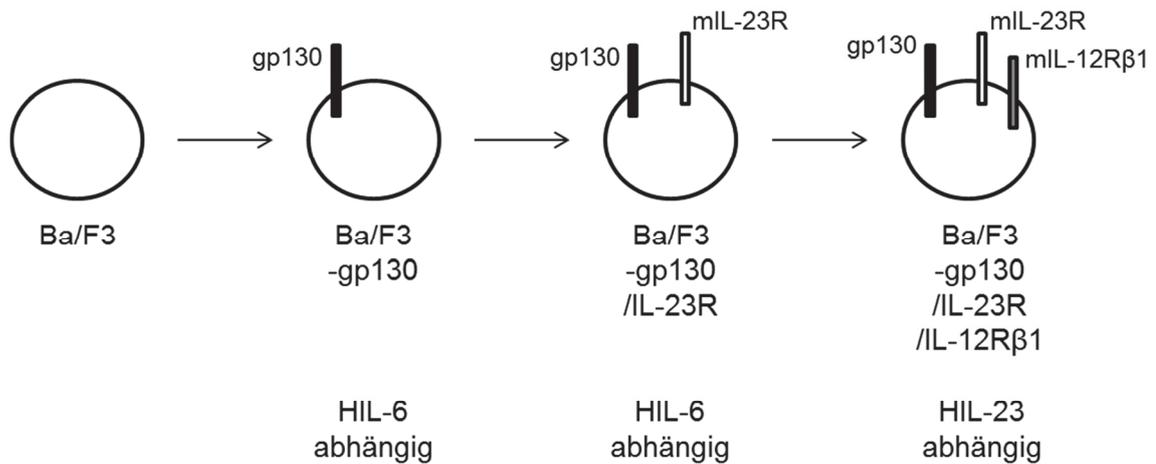
**Abb. 14: Expression der Varianten des IL-12Rβ1 in COS-7-Zellen.** COS-7-Zellen wurden mit Plasmid-DNA der einzelnen Varianten des IL-12Rβ1 transfiziert und nach zwei Tagen Zelllysate hergestellt. Die Lysate wurden mittels SDS-Page und Western Blot unter Verwendung eines biotinylierten Antikörpers gegen den IL-12Rβ1 und anschließender Inkubation mit Streptavidin-HRP analysiert.

Anhand von Abbildung 14 ist ersichtlich, dass alle generierten Rezeptorvarianten nach Transfektion von COS-7-Zellen nachweisbar waren. Da die Proteinkonzentration der Zelllysate nicht bestimmt wurde und standardmäßig 40 µl Lysat in Lämmli-puffer geladen wurde, lässt sich kein Rückschluss auf die unterschiedliche Expression der verschiedenen Varianten ziehen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die zuvor auf DNA-Ebene generierten Expressionsplasmide in der Zelllinie COS-7 exprimiert werden. Die erzeugten cDNAs konnten nun für weitere Versuche eingesetzt werden. Die Molekulargewichte der einzelnen Proteine sind in Abbildung 7B aufgeführt, fallen jedoch im Western Blot durch die posttranslationale Glykosylierung größer aus.

#### 4.4 Erzeugung stabiler Ba/F3-gp130-Zellen

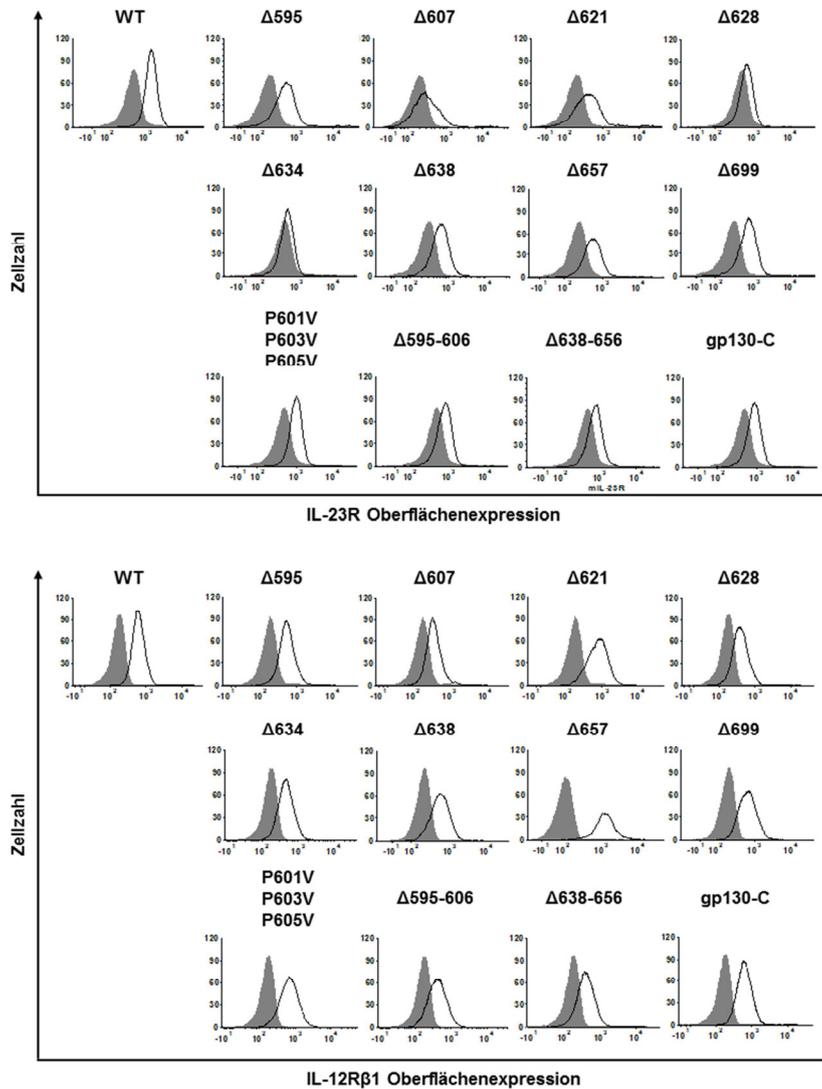
Zur Analyse der IL-23-vermittelten Signaltransduktion der verschiedenen IL-12Rβ1 Varianten wurde die murine prä-B-Zelllinie Ba/F3 verwendet. Ba/F3-Zellen sind als eine frühe Entwicklungsstufe der lymphoblastischen Zelllinie klassifiziert und wurden initial aus murinem Knochenmark isoliert. Diese Interleukin 3 (IL-3) -abhängigen Zellen stellen ein ideales Werkzeug zur Untersuchung der Signalgebung von Zytokinen dar (Palacios und Steinmetz 1985; Suthaus *et al.* 2010). Gearing und Mitarbeiter konnten schon im Jahre 1994 mit dieser Zelllinie genauere Untersuchungen zur Signalgebung des *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), *Oncostatin M* (OSM) und *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF) durchführen, indem entsprechende Rezeptorketten, wie

z.B. der LIF-Rezeptor und gp130, in die Zellen mittels Elektroporation transfiziert wurden (Gearing *et al.* 1994).



**Abb. 15. Retrovirale Transduktion von Ba/F3-Zellen.** Grundlage dieser Arbeit waren native Ba/F3 Zellen, die zunächst mit der gp130 Rezeptorkette und anschließend mit dem IL-23R retroviral transduziert wurden (Floss *et al.* 2013). Die Ba/F3-gp130/IL-23R-Zelllinie konnte nun mit dem IL-12Rβ1 oder den einzelnen Varianten transduziert werden. Somit standen verschiedene Zelllinien für weitere Analysen zum IL-12Rβ1 zur Verfügung.

Die Ba/F3-gp130-Zelllinie wurde unter Verwendung der retroviralen Transduktion derart modifiziert, dass auch der murine IL-23R auf der Oberfläche exprimiert wurde. Diese Ba/F3-gp130-IL-23R-Zelllinie wurde in einem weiteren Schritt mit dem murinen IL-12Rβ1 transduziert, was in einer IL-23 responsiven Zelllinie resultierte (Floss *et al.* 2013) (siehe Abb. 15). Die bereits erzeugten und in der AG Scheller vorliegenden Ba/F3-gp130-IL-23R-Zellen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit den cDNAs der verschiedenen IL-12Rβ1 Varianten transduziert. Nach 2-wöchiger Selektion der Zellen wurden diese hinsichtlich der Expression der beiden IL-23 Rezeptoren auf ihrer Oberfläche untersucht.



**Abb. 16: Analyse der Oberflächenexpression des IL-23R und den IL-12R $\beta$ 1 Varianten in Ba/F3-gp130-Zellen mittels Durchflusszytometrie.** Jede Zelllinie wurde durch Anfärben mit einem spezifischen Antikörper und anschließender Durchflusszytometrie auf die Oberflächenexpression der jeweiligen Rezeptorkette überprüft. Die repräsentativen Histogramme der IL-23R (oben) und IL-12R $\beta$ 1 (unten) Oberflächenexpression der transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen sind hier dargestellt. Auf der x-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz und somit das Maß der jeweiligen Rezeptorexpression abgebildet, wobei die y-Achse die Anzahl der Zellen mit bestimmter Fluoreszenz zeigt. Graue Histogramme repräsentieren ebenfalls gefärbte Ba/F3-gp130-Zellen und sind als Negativkontrolle hinterlegt. Als schwarze Linien sind die Histogramme der im Rahmen der Arbeit erzeugten Ba/F3-gp130-IL-23R-Zellen mit den verschiedenen IL-12R $\beta$ 1 Varianten dargestellt. Die Verschiebung der Intensität der gemessenen Fluoreszenz zwischen der grau hinterlegten Negativkontrolle (Ba/F3-gp130) und der Variante mit IL-12R $\beta$ 1-Deletion spiegelt die Expression der Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen wieder.

Die Oberflächenexpression wurde unter Verwendung der Durchflusszytometrie nach Färbung der Zellen mit spezifischen Antikörpern analysiert (siehe Punkt.3.2.2.5).

Abbildung 16 gibt eine Übersicht der Ergebnisse der FACS-Analyse. Die Intensität der Fluoreszenz und somit das Maß der jeweiligen Rezeptorexpression wird auf der x-Achse und die Anzahl der Zellen mit bestimmter Fluoreszenz auf der y-Achse dargestellt. Als Negativkontrolle wurden Ba/F3-gp130-Zellen ebenfalls mit den Antikörpern gefärbt und als graue Histogramme abgebildet. Die Histogramme der im Rahmen der Arbeit erzeugten Ba/F3-gp130-IL-23R-Zellen mit den verschiedenen IL-12R $\beta$ 1 Varianten sind als schwarze Linien dargestellt. Die Histogramme aller IL-12R $\beta$ 1 Varianten für die IL-23R und auch IL-12R $\beta$ 1 Oberflächenexpression sind erkennbar nach rechts verschoben. Sie weisen somit ein stärkeres Fluoreszenzsignal und eine Expression des jeweiligen Rezeptors im Gegensatz zur Negativkontrolle auf. Lediglich die Variante IL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 634 zeigte in Bezug auf die IL-23R Oberflächenexpression ein geringeres Signal, jedoch war auch hier der IL-23R noch deutlich detektierbar.

Anhand dieser Daten wurde belegt, dass sowohl der murine IL-23R als auch die gewünschte Variante des IL-12R $\beta$ 1 auf der Oberfläche der jeweiligen Ba/F3-gp130-Zelllinien exprimiert werden. Da die Verschiebung der Histogramme zwischen den verschiedenen Varianten unterschiedlich stark ist, kann auf eine unterschiedliche Expression der Rezeptoren geschlossen werden.

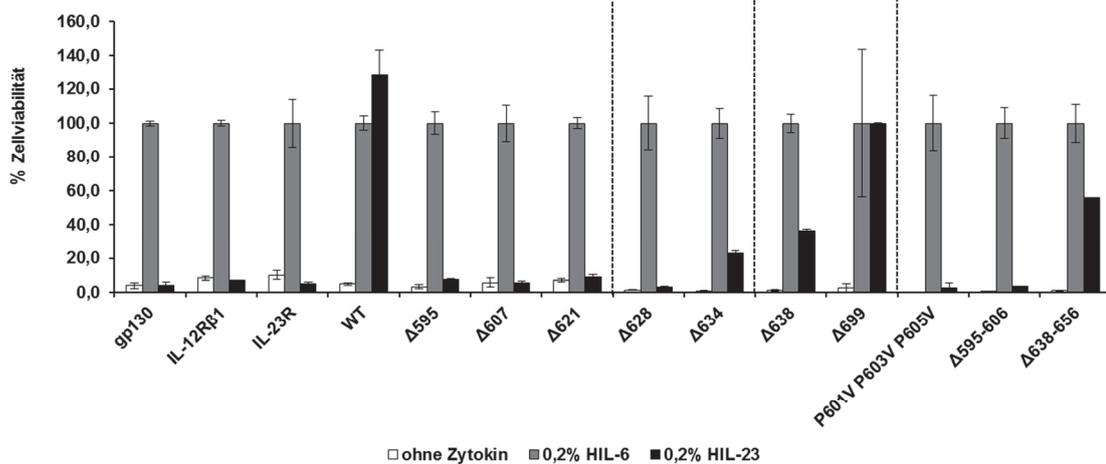
Die Variante IL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 657 wurde nicht weiter im Rahmen dieser Arbeit, sondern innerhalb der AG Scheller analysiert.

## **4.5 Analyse der IL-23-abhängigen Proliferation der generierten Ba/F3-gp130-Zelllinien**

Die generierten Ba/F3-gp130-Zelllinien sind als Progenitorzellen der B-lymphozytären Reihe in Proliferation beeinflussbar durch Interleukine (Palacios und Steinmetz 1985; Gearing *et al.* 1994). Dieser Umstand ermöglichte den Einfluss von IL-23 auf die mit den Varianten des murinen IL-12R $\beta$ 1 und dem murinen IL-23R transduzierten Zellen zu analysieren und entsprechende Aussagen über die Funktionalität der veränderten IL-12R $\beta$ 1-Varianten zu treffen. Der Nachweis der beiden Zytokinrezeptoren auf der Oberfläche der jeweiligen Zelllinie war eine wichtige Voraussetzung für diesen Test.

Für den Proliferationstest wurde nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS eine gleiche Anzahl an Zellen der verschiedenen Ba/F3-gp130-Zelllinien in Vertiefungen einer 96-*well*-Platte pipettiert. Jede Zelllinie wurde mit 0,2% HIL-6 (10 µg/ml), 0,2% HIL-23 (5,5 µg/ml), und ohne Zytokin versetzt. Die Proliferation der verschiedenen Zellen wurde nach mindestens 48 h mit dem CellTiter-Blue<sup>®</sup> Cell Viability Assay (Promega) bestimmt (siehe Punkt 3.2.2.4). Für einen besseren Vergleich der Zelllinien untereinander wurde die Proliferation in Gegenwart von HIL-6 gleich 100% gesetzt. Die Zugabe von HIL-6, einer Kombination des löslichen IL-6 Rezeptors und IL-6, bewirkte, dass alle Ba/F3-gp130-Zelllinien proliferierten. Das Designerzytokin HIL-6 bindet an gp130, das alle Zelllinien ebenfalls exprimieren, und führt so zu einer Signaltransduktion. Dies beruht auf dem IL-6 *trans signaling* (Garbers *et al.* 2012). Die Analyse der HIL-6-vermittelten Proliferation dient als zellinterne Positivkontrolle. Die Zelllinie mit dem Wildtyp IL-12Rβ1 (WT) proliferierte bei Zugabe von HIL-23, da sie den physiologischen IL-23 Rezeptorkomplex besaß. Diese Zelllinie ist die Positivkontrolle für die Zugabe von IL-23. Im Gegensatz dazu zeigten untransduzierte Ba/F3-gp130-Zellen nach Zugabe von HIL-23 keine Proliferation. Diese Zellen fungierten als Negativkontrolle für IL-23 Zugabe.

Die Zelllinien mit den Deletionsvarianten Δ595 bis Δ628 proliferierten nicht nach Stimulation mit HIL-23. Im Gegensatz dazu zeigten die Linien Δ634 und Δ638 eine deutlich reduzierte Proliferation. Das IL-23 induzierte Proliferationsverhalten der Varianten Δ699 war vergleichbar mit dem Wildtyp. Die innerhalb der AG Scheller untersuchte Variante Δ657 zeigte ebenfalls ein dem Wildtyp vergleichbares Proliferationsverhalten (Daten nicht gezeigt). Alle erzeugten Zelllinien zeigten keine Proliferation ohne Zytokin (siehe Abb. 17).



**Abb. 17: Analyse der IL-23-abhängigen Proliferation der Ba/F3-gp130-Zelllinien.** Jede Zelllinie wurde hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens ohne die Zugabe eines Zytokins, nach Stimulation mit 0,2% HIL-6 oder 0,2% HIL-23 untersucht. Standardmäßig wurde der Proliferationswert für die jeweilige Variante mit 0,2% HIL-6 Stimulation als Bezugsgröße von 100% definiert. Untransduzierte Ba/F3-gp130-Zellen (gp130) dienten als Negativkontrolle und Zellen, die neben den IL-23R auch den Wildtyp IL-12Rβ1 (WT) exprimierten, als Positivkontrolle in Bezug auf die IL-23-abhängige Proliferation (n=3).

Diese Ergebnisse belegen, dass ein bestimmter Bereich des intrazellulären Teils des IL-12Rβ1 essentiell für die IL-23-abhängige Proliferation der transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen ist. Der für die Proliferation entscheidende Bereich befindet sich auf Grundlage der Analysen in dieser Arbeit und der Auswertung der Variante Δ627 in der AG Scheller zwischen den Aminosäuren 595 und 656. Eine weitere Ergänzung erfolgte anhand der Analyse der Varianten mit den deletierten und mutierten putativen Box1 und Box2 Motiven. Sowohl die Zelllinie Δ595-606 (ohne putatives Box1 Motiv), als auch die Variante P601V P603V P605V (mutiertes putatives Box1 Motiv) zeigten keine Proliferation nach HIL-23 Zugabe. Wohingegen Ba/F3 Δ638-656 Zellen (ohne putatives Box2 Motiv) eine deutlich verminderte IL-23-induzierte Proliferation aufwiesen (siehe Abb. 17). Diese Daten weisen dem putativen Box1 Motiv eine essentielle Rolle in der IL-23-abhängigen Proliferation zu. Des Weiteren kann dem putativen Box2 Motiv eine wichtige, jedoch untergeordnete Rolle zugewiesen werden.

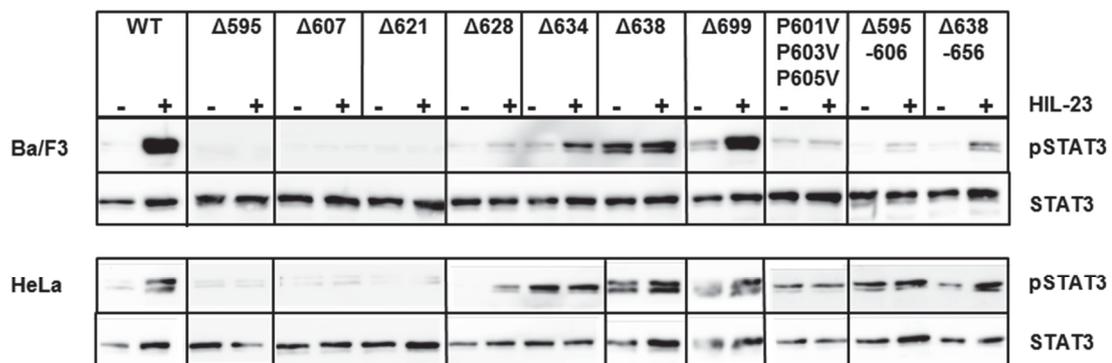
## 4.6 Analyse der IL-23-induzierten STAT3 Aktivierung

Innerhalb der durch IL-23 eingeleiteten Signalkaskade spielt der Jak/STAT Weg eine entscheidende Rolle in der Aktivierung von Zielgenen (Zou *et al.* 1997; Watford *et al.* 2004). Die Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT3, STAT4 und STAT5 werden durch Januskinasen-vermittelte Phosphorylierung aktiviert, wobei STAT3 als der essentielle Faktor für die IL-23 Signaltransduktion angesehen wird (Parham *et al.* 2002). Untersuchungen zur STAT3 Aktivierung in Zellen, die den murinen IL-23R und eine veränderte Variante des murinen IL-12R $\beta$ 1 exprimierten, sollten somit als Werkzeug zur genaueren Analyse der veränderten IL-23 Signalgebung dienen. Die Phosphorylierung von STAT3 korreliert mit der Funktionalität des IL-23 Rezeptorkomplexes und lässt eine Schlussfolgerung auf die Notwendigkeit bestimmter Bereiche des intrazellulären Teils des IL-12R $\beta$ 1 zu.

Unter Verwendung eines Stimulationsassays in zwei verschiedenen Zelltypen wurde die IL-23-abhängige Aktivierung von STAT3 untersucht. Zum einen wurden co-transfizierte HeLa- und zum anderen transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen hinsichtlich der Phosphorylierung von STAT3 nach IL-23 Stimulation analysiert. HeLa-Zellen wurden mit dem eukaryotischen Expressionsvektor für den murinen IL-23R und einer der Varianten des murinen IL-12R $\beta$ 1 co-transfiziert. Nach 30 h wurden diese Zellen mit PBS gewaschen und für 16 h mit Medium ohne FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 0,2% HIL-23 für 15 min. Parallel dazu wurden ebenfalls erzeugte Ba/F3-gp130-Zelllinien untersucht. Hierfür wurden die Zellen mehrmals gewaschen, für vier Stunden mit FCS-freiem Medium inkubiert und ebenfalls für 15 min mit IL-23 stimuliert. Nach Ernte der Zellen wurden diese lysiert und mittels Western Blot unter Verwendung von  $\alpha$ -pSTAT3 und STAT3 Antikörpern analysiert.

Abbildung 18 gibt eine Übersicht über beide Zellsysteme und die verschiedenen IL-12R $\beta$ 1 Varianten. Die Kombination vom murinen IL-23R mit dem Wildtyp IL-12R $\beta$ 1 (WT) dient als Positivkontrolle und zeigte wie bereits beschrieben (Floss *et al.* 2013) eine deutliche Phosphorylierung von STAT3 nach Stimulation mit IL-23 in stabil transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen und co-transfizierten HeLa-Zellen.

Für Ba/F3-gp130-Zellen, die die Varianten  $\Delta 595$  bis  $\Delta 628$  des IL-12R $\beta$ 1 exprimierten, war keine Phosphorylierung von STAT3 nach Stimulation mit HIL-23 im Western Blot nachweisbar. Die Ba/F3-Zelllinie, die die Variante  $\Delta 634$  des IL-12R $\beta$ 1 exprimierte, zeigte eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte Aktivierung von STAT3. Die Ba/F3-Zelllinie  $\Delta 638$  zeigte eine hohe Hintergrundaktivität (STAT3 Aktivierung ohne Zytokinstimulation), wobei nur ein geringer Unterschied zwischen der stimulierten und nicht stimulierten Variante zu erkennen ist. Die Variante  $\Delta 699$  zeigte eine dem Wildtyp vergleichbare Aktivierung von STAT3 im Western Blot. Ein ebenso starkes Signal zeigte die innerhalb der AG Scheller untersuchte Ba/F3-Zelllinie  $\Delta 657$  (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 18: Analyse der Phosphorylierung von STAT3 in stimulierten HeLa- und Ba/F3-gp130-Zellen mit Expression der einzelnen Rezeptorvarianten.** Stabil transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen wurden dreimal gewaschen, für 4 h in FCS-freiem Medium inkubiert und mit 0,2% HIL-23 für 15 min stimuliert. HeLa-Zellen wurden transient mit der cDNA des IL-23R und den IL-12R $\beta$ 1 Varianten transfiziert. Die Zellen wurden nach 36 h mit PBS gewaschen und über Nacht in FCS-freiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,2% HIL-23 für 15 min stimuliert. Zelllysate wurden hergestellt und ein SDS-Gel mit gleichen Mengen Protein (50  $\mu$ g/ Bahn) beladen. Mittels Immunoblotting und spezifischer Antikörper gegen phospho-STAT3 und STAT3 wurden die einzelnen Varianten analysiert (n=3).

Die Analysen der HeLa-Zellen zeigten weniger eindeutige Ergebnisse, als die vergleichbaren Stimulationsversuche an Ba/F3-Zelllinien. Bei den Varianten  $\Delta 595$  bis  $\Delta 621$  konnte vergleichbar mit den Ba/F3-Versuchen keine Aktivierung von STAT3 im Western Blot detektiert werden. Die Variante  $\Delta 628$  besaß ein im Vergleich zum Wildtyp stark reduziertes pSTAT3-Signal nach IL-23-abhängiger Stimulation, wobei das detektierte STAT3 Signal zugunsten der stimulierten Variante erhöht war. Die Analysen an den restlichen Varianten zeigten eine unterschiedlich hohe

Hintergrundaktivität nicht stimulierter Zellen. Bei  $\Delta 634$  ist kein Intensitätsunterschied zwischen stimulierter und nicht stimulierter Variante zu erkennen.  $\Delta 638$  und  $\Delta 699$  zeigten jedoch nach IL-23-abhängiger Stimulation ein im Vergleich zur nicht stimulierten Variante verstärktes Signal. Die innerhalb der AG Scheller analysierte Variante  $\Delta 657$  zeigte eine dem Wildtyp vergleichbare Phosphorylierung von STAT3 (Daten nicht gezeigt).

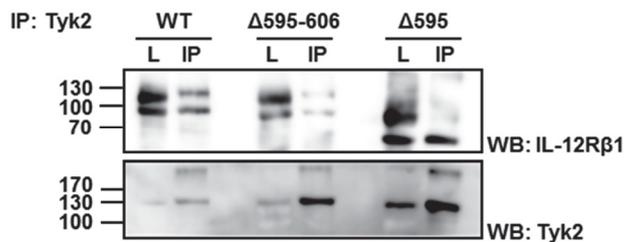
Somit wurde bestätigt, dass der intrazelluläre Teil des IL-12R $\beta$ 1 eine entscheidende Rolle bei der Phospho-STAT3-abhängigen Signaltransduktion spielt. Weiterhin muss ein bestimmter Teil der intrazellulären Domäne dieses Rezeptors vorhanden sein, damit eine Aktivierung von STAT3 möglich ist. Auf Grund der Analysen mit den unterschiedlichen Deletionsvarianten in dieser Arbeit und der Variante  $\Delta 657$  in der AG Scheller liegt dieser bestimmte Bereich innerhalb der Aminosäuren 595 bis 656 des mIL-12R $\beta$ 1, wobei die AS 595 bis 628 für die STAT3 Aktivierung unbedingt notwendig sind. Dieser Bereich umfasst das putative Box1 Motiv des mIL-12R $\beta$ 1.

Folgende Analysen mit Ba/F3-Zelllinien deckten auf, dass die Varianten mit mutiertem (P601V P603V P605V) und deletiertem putativen Box1 Motiv ( $\Delta 595-606$ ) keine IL-23-abhängige Aktivierung von STAT3 im Western Blot zeigten. Im Gegensatz dazu zeigten Ba/F3-Zellen mit deletiertem putativen Box2 Motiv ( $\Delta 638-656$ ) nur eine verminderte Aktivierung von STAT3. Bei HeLa-Zellen, die mit der cDNA des mutierten (P601V P603V P605V) und deletiertem putativen Box1 Motiv ( $\Delta 595-606$ ) transfiziert wurden, war das Signal der nicht stimulierten und stimulierten Variante im Western Blot von gleicher Intensität und deutete auf eine unveränderte STAT3 Aktivierung nach Zytokinstimulation hin. Die Variante ohne putatives Box2 Motiv ( $\Delta 638-656$ ) zeigte eine stärkere Aktivierung von STAT3 nach IL-23-abhängiger Stimulation.

Anhand dieser Ergebnisse konnte das Box1 und Box2 Motiv definiert werden. Dem Box1 Motiv kommt somit eine essentielle Rolle in der IL-23-abhängigen Signaltransduktion zu, wobei das Box2 Motiv eine vergleichbar untergeordnete Position einnimmt.

## 4.7 Analyse der Interaktion von Tyk2 und dem IL-12R $\beta$ 1

Die Januskinase Tyk2 ist mit dem intrazellulären Teil des IL-12R $\beta$ 1 assoziiert (Zou *et al.* 1997). Bisher fehlen Studien zur Identifikation der Rezeptorbereiche, die direkt für die Assoziation von Tyk2 benötigt werden. Mittels Co-Immunpräzipitation sollte die Bindung von Tyk2 mit der Wildtyp IL-12R $\beta$ 1 Proteinkette (WT), mit einer Variante des IL-12R $\beta$ 1 ohne cytoplasmatischer Domäne ( $\Delta$ 595) und ohne Box1 Motiv ( $\Delta$ 595-606) analysiert werden. Hierfür wurden COS-7-Zellen mit der cDNA der murinen Januskinase Tyk2 und den entsprechenden Varianten des IL-12R $\beta$ 1 co-transfiziert. Tyk2 wurde immunpräzipitiert und der entsprechende IL-12R $\beta$ 1 und Tyk2 im Western Blot analysiert.

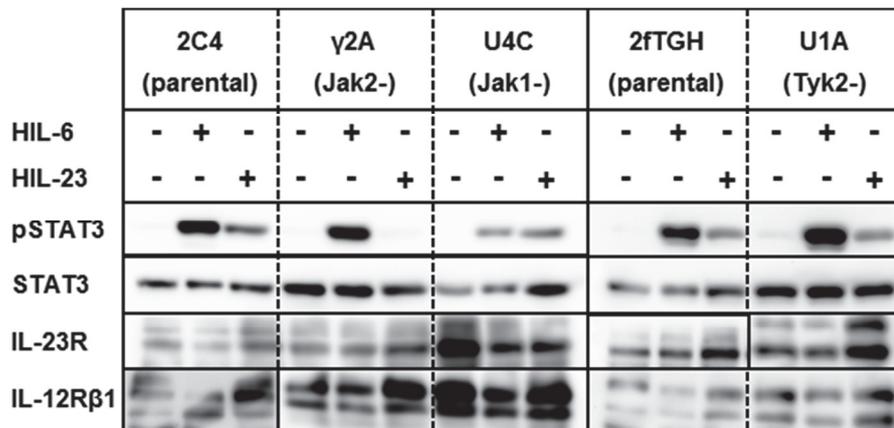


**Abb. 19: Analyse der Assoziation von Tyk2 mit verschiedenen Varianten des IL-12R $\beta$ 1.** COS-7-Zellen wurden mit der cDNA der murinen Januskinase Tyk2 und dem Wildtyp IL-12R $\beta$ 1, der IL-12R $\beta$ 1 Variante ohne cytoplasmatische Domäne ( $\Delta$ 595) oder ohne Box1 Motiv ( $\Delta$ 505-606) co-transfiziert. Anschließend wurde mittels Tyk2-Immunpräzipitation und Western Blot Analyse die entsprechende IL-12R $\beta$ 1 Variante detektiert. Die Membran wurde zusätzlich mit  $\alpha$ -Tyk2 Antikörper beprobt (n=3).

Abbildung 19 zeigt, dass nach Immunpräzipitation von Tyk2 aus Zellen, die sowohl murines Tyk2 als auch den Wildtyp IL-12R $\beta$ 1 exprimierten, die entsprechende Rezeptorkette (glykosylierte Proteinkette bei ca. 120 kDa) im Western Blot nachweisbar war. Dies verdeutlicht die physiologische Interaktion von Tyk2 mit dem IL-12R $\beta$ 1. Im Gegensatz dazu war weder der IL-12R $\beta$ 1 ohne cytoplasmatische Domäne ( $\Delta$ 595) noch der ohne Box1 Motiv ( $\Delta$ 595-606) nach erfolgter Immunpräzipitation von Tyk2 im Western Blot nachweisbar. Hiermit wird deutlich, dass das Box1 Motiv essentiell für die Bindung der Januskinase Tyk2 ist. Auch im Zusammenhang mit den vorherigen Ergebnissen ist somit dem Box1 Motiv eine Schlüsselposition in der durch Tyk2-vermittelten Signaltransduktion am IL-12R $\beta$ 1 zuzuschreiben.

## 4.8 Untersuchungen an humanen Fibrosarkomzelllinien mit Jak1-, Jak2- und Tyk2-Defizienz

Um die Notwendigkeit von Jak2 und Tyk2 im Rahmen der IL-23 Signaltransduktion zu analysieren, wurden humane Fibrosarkomzelllinien (2C4 and 2fTGH) und die davon abgeleiteten Jak1- (U4C), Jak2- ( $\gamma$ 2A) und Tyk2- (U1A) defizienten Zellen mit den cDNAs des mIL-23R und mIL-12R $\beta$ 1 co-transfiziert. Die Experimente erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Doreen Floss aus der AG Scheller (siehe Abb.20).



**Abb. 20: Analyse von kinase-defizienten Fibrosarkomzelllinien im Rahmen der IL-23 Signaltransduktion.** Die kinase-defizienten Fibrosarkomzelllinien  $\gamma$ 2A (Jak2-defizient), U4C (Jak1- defizient), U1A (Tyk2-defizient) und die parentalen Zelllinien 2C4 und 2fTGH wurden mit den Expressionsplasmiden des IL-23 Rezeptors co-transfiziert. 30 h nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und über Nacht in FCS-freiem Medium inkubiert (*Starving*). Anschließend wurden die Zellen mit 0,2% HIL-6 für 15 min oder 0,2% HIL-23 für 30 min stimuliert. Zelllysate wurden erstellt und ein SDS-Gel mit 50  $\mu$ g Protein (31  $\mu$ g für HIL-6 Stimulation) pro Bahn beladen. Im anschließenden Western Blot konnte die Aktivierung von STAT3 mit spezifischen Antikörpern gegen phospho-STAT3 und STAT3 sowie die Rezeptorexpression mit Antikörpern gegen den mIL-23R und mIL-12R $\beta$ 1 detektiert werden. Die Experimente erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Doreen Floss aus der AG Scheller (n=3).

Die Expression beider Rezeptoren wurde im Western Blot mittels Antikörper gegen den mIL-23R und mIL-12R $\beta$ 1 analysiert und vergleichbare Expressionslevel ermittelt. Die co-transfizierten Zellen wurden mit und ohne HIL-23 inkubiert und die IL-23-abhängige STAT3 Aktivierung im Western Blot gezeigt. Die Stimulation mit HIL-6 diente als Kontrolle.

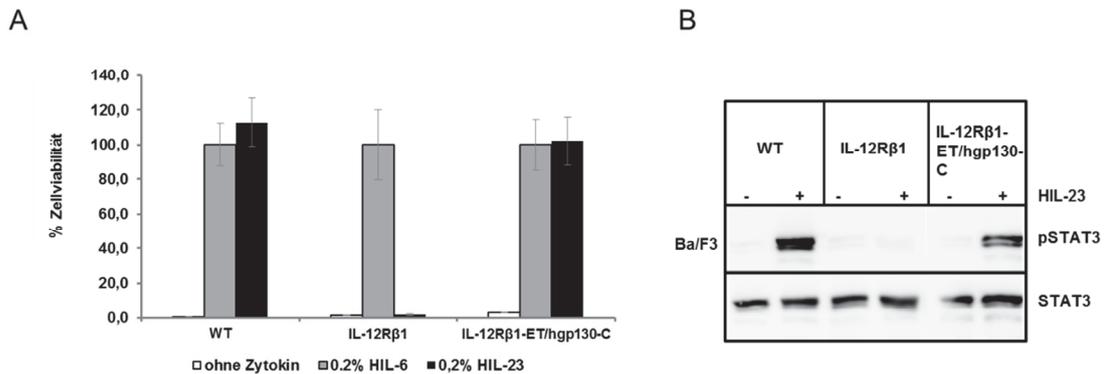
Die IL-23-abhängige Tyrosin Phosphorylierung von STAT3 konnte sowohl in den Zelllinien 2C4 und 2fTGH, als auch in den Jak1-defizienten Zellen U4C ermittelt werden. Während die Jak2-defizienten Zellen ( $\gamma$ 2A) keine Aktivierung von STAT3 nach IL-23-abhängiger Stimulation zeigten, wurde in den Tyk2-defizienten Zellen (U1A) eine leichte Aktivierung von STAT3 festgestellt. Frühere Studien an kinase-defizienten Fibrosarkomzelllinien zeigten eine entscheidende Rolle von Jak1 für die IL-6-abhängige Aktivierung von STAT3, da die STAT3 Phosphorylierung in Abwesenheit von Jak1 stark reduziert, aber unbeeinträchtigt durch eine Jak2- oder Tyk2- Defizienz war (Guschin *et al.* 1995). Vergleichbare Resultate wurden im Rahmen dieser Arbeit in kinase-defizienten Zelllinien, die mit dem IL-23 Rezeptorkomplex co-transfiziert und mit HIL-6 stimuliert wurden, ermittelt. Die parentalen Zelllinien 2C4 und 2fTGH sowie die Jak2- und Tyk2-defizienten Zellen zeigten eine Aktivierung von STAT3 nach Stimulation mit HIL-6 im Western Blot. In den Jak1-defizienten Zellen U4C wurde jedoch ein stark reduziertes phospho-STAT3 Signal nach HIL-6-abhängiger Stimulation ermittelt.

#### **4.9 Untersuchungen zur chimären Variante aus extrazellulärer mIL-12R $\beta$ 1 und intrazellulärer gp130 Rezeptorkette**

Kotenko und Mitarbeiter entwickelten anhand von Studien zum Interferon- $\gamma$  Rezeptor ein Modell für Klasse II Zytokinrezeptoren, bei dem der Rezeptorkomplex in eine signalgebende Untereinheit und einen sog. „Helferrezeptor“ unterteilt wird. Der Helferrezeptor besitzt lediglich zusätzliche Kinase-Aktivität und kann mit jeder Januskinase assoziiert sein (Kotenko *et al.* 1996). Inwiefern das für den mIL-12R $\beta$ 1 zutrifft sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Übertragen auf den IL-23 Rezeptorkomplex stellt der IL-23R die signalgebende Untereinheit dar, da dieser mehrere Tyrosine innerhalb seiner cytoplasmatischen Domäne besitzt, die entscheidend an der Signaltransduktion beteiligt sind (Floss *et al.* 2013). Der IL-12R $\beta$ 1 könnte als der sog. „Helferrezeptor“ betrachtet werden. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde eine Variante des mIL-12R $\beta$ 1, bei der die intrazelluläre Domäne durch die gp130 Rezeptorkette ersetzt ist, mittels SOE-PCR kloniert (siehe Punkt 4.2). Zusammen mit dem IL-23R wurde diese Variante (IL-12R $\beta$ 1-ET/hgp130-C)

über retrovirale Transduktion in Ba/F3-gp130 Zellen überführt (siehe Punkt 4.3). Die IL-23-abhängige Proliferation und STAT3 Aktivierung der generierten Ba/F3-gp130 Zelllinie wurde anschließend untersucht.



**Abb. 21. Analysen der chimären Variante des IL-12Rβ1 mit intrazellulärer gp130 Rezeptorkette.** Ba/F3-gp130 Zellen wurden generiert, die sowohl den IL-23R als auch die Variante des IL-12Rβ1 mit intrazellulärer gp130 Rezeptorkette (IL-12Rβ1-ET/hgp130-C) konstitutiv auf ihrer Oberfläche exprimierten. A. Die Zellen wurden hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens ohne die Zugabe eines Zytokins, nach Stimulation mit 0,2% HIL-6 oder 0,2% HIL-23 untersucht. Standardmäßig wurde der Proliferationswert für die jeweilige Variante mit 0,2% HIL-6 Stimulation als Bezugsgröße von 100% definiert. Ba/F3-gp130-Zellen die nur den IL-12Rβ1 exprimierten dienten als Negativkontrolle und Zellen, die neben dem IL-23R auch den Wildtyp IL-12Rβ1 (WT) exprimierten, als Positivkontrolle in Bezug auf die IL-23-abhängige Proliferation. B. Die stabil transduzierten Ba/F3-IL-12Rβ1-ET/hgp130-C Zellen wurden ebenfalls nach 15-minütiger Stimulation mit IL-23 lysiert und die Proteinlysate mittels SDS-PAGE analysiert. Nach Immunoblotting und spezifischer Antikörper gegen phospho-STAT3 und STAT3 wurde die Variante zusammen mit dem Wildtyp als Positivkontrolle und einer Variante, die nur den IL-12Rβ1 exprimiert, als Negativkontrolle analysiert (n=3).

Im Proliferationstest wurde gezeigt, dass Ba/F3-gp130 Zellen mit Expression des mIL-23R und des chimären Rezeptors IL-12Rβ1-ET/hgp130-C eine dem Wildtyp vergleichbare Proliferation besitzen (siehe Abb. 21A). Mittels Stimulationsversuchen konnte die IL-23-abhängige Aktivierung von STAT3 innerhalb der besagten Zelllinie detektiert werden (siehe Abb. 21B). Die intrazelluläre Domäne des IL-12Rβ1 kann somit durch die gp130 Rezeptorkette ersetzt werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Der IL-23 Signalweg

Das heterodimere Zytokin IL-23 setzt sich aus den Untereinheiten IL-23p19 und IL-12p40 zusammen, wobei letzteres ebenfalls am Aufbau von IL-12 beteiligt ist. Der IL-12R $\beta$ 1 ist sowohl Bestandteil des IL-12 Rezeptors als auch in der Lage, zusammen mit dem IL-23R den physiologischen IL-23 Rezeptorkomplex zu bilden (Vignali und Kuchroo 2012). Die beschriebenen Rezeptoren reihen sich in die gp130 Familie von hämatopoetischen Zytokinrezeptoren ein, die ebenfalls Rezeptoren der Zytokine IL-6, LIF, CNTF, OSM und weitere beinhaltet (Garbers *et al.* 2012). Unter diesen stellt IL-6 den Prototyp der gp130 Rezeptor-bindenden Zytokine dar (Boulangier *et al.* 2003). Auf Seiten der Interaktion zwischen Rezeptor und Zytokinuntereinheit gibt es eine starke Spezifität, wobei das IL-12p40 Protein nur mit dem IL-12R $\beta$ 1, jedoch nicht mit dem IL-23R eine Bindung eingeht (Schröder *et al.* 2015; Wu *et al.* 2000).

Die Rezeptorbindung von IL-23 bewirkt die Dimerisierung von IL-12R $\beta$ 1 und IL-23R (Parham *et al.* 2002). Darauf folgt die Aktivierung der nicht kovalent mit der intrazellulären Domäne des Rezeptors assoziierten Kinasen vom Janus Typ. Januskinasen sind Proteintyrosinkinasen im Signalweg der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase und stellen eine Familie mit den Mitgliedern Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2 dar (Ghoreschi *et al.* 2009). Unter Einbezug verschiedener Signalwege, die über STAT Proteine (Parham *et al.* 2002), die Phosphatidylinositol 3-Kinase (Cho *et al.* 2006), NF- $\kappa$ B (Cho *et al.* 2006) und die MAPK-Kaskade (Floss *et al.* 2013) vermittelt werden, erfolgt die Signaltransduktion am IL-23 Rezeptorkomplex.

*Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) Proteine binden als ein wichtiger Bestandteil der Signalkaskade an phosphorylierte Tyrosinreste des aktivierten Rezeptors, werden ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert und translozieren als dimerer Komplex in den Nukleus, um als Transkriptionsfaktoren auf die Genexpression Einfluss zu nehmen (Ghoreschi *et al.* 2009). Die IL-23-abhängige Aktivierung der Januskinasen führt zur Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT3, STAT4 und STAT5, wobei unter diesen STAT3 der entscheidende Faktor ist (Parham *et al.* 2002).

Genaue Untersuchungen zur Signaltransduktion des IL-23R, der dadurch verbundenen Aktivierung von STAT3 und anderen Signalwegen wurden bereits von Floss *et al.* durchgeführt, wobei vergleichbare Studien zum IL-12R $\beta$ 1 fehlen (Floss *et al.* 2013).

## **5.2 Die intrazelluläre Domäne des IL-12R $\beta$ 1 ist entscheidend für die IL-23-vermittelte Signalwirkung**

In der Literatur herrschen widersprüchliche Ansichten über die Funktion des IL-12R $\beta$ 1. Einerseits wird seine Funktion auf die hoch affine Bindung mit dem Zytokin begrenzt, wobei er bezogen auf die Signaltransduktion nicht von essentieller Bedeutung ist (Collison und Vignali 2008). Andererseits konnte in Studien von Russell und Mitarbeiter gezeigt werden, dass die IL12p40-Homodimer-abhängige Chemotaxis von Makrophagen und virale Entzündungen der Atemwege durch den IL-12R $\beta$ 1 vermittelt werden (Russell *et al.* 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der IL-12R $\beta$ 1 eine entscheidende Rolle für die IL-23 Signalgebung spielt.

Verschiedene Deletionsvarianten des IL-12R $\beta$ 1 wurden kloniert, bei denen die intrazelluläre Domäne an bestimmten Aminosäuren verkürzt wurde. Dabei war zu beachten, dass sich die einzelnen Varianten im Vorhandensein von vermutlich funktionellen Bereichen, wie den putativen Box1 und Box2 Motiven unterscheiden und eine zum größten Teil regelmäßige Verteilung des c-terminalen Längenunterschiedes am Rezeptor vorliegt. Für die Expression der Proteine wurde der eukaryotische Expressionsvektor p409 und der retrovirale Vektor pMOWS-hygro verwendet. Frühere Studien der AG Scheller zeigten, dass der Vektor p409 im Rahmen der Transfektion von COS-7-Zellen als erfolgreiches Werkzeug zur Einschleusung von Plasmid-DNA in Zellen eingesetzt wurde. Althoff *et al.* konnten zum Beispiel chimäre gp130 und TNF- $\alpha$  Varianten erfolgreich in COS-7-Zellen transfizieren (Althoff *et al.* 2001). Weiterhin wurde DNA der synthetisierten IL-12R $\beta$ 1 Varianten in den retroviralen Vektor pMOWS, der durch Suthaus *et al.* mit dem Hygromycin-Resistenzgen modifiziert wurde, kloniert (Suthaus *et al.* 2010). Ketteler *et al.* synthetisierten diesen Vektor und zeigten mittels dessen Einsatz verstärkte Genexpression in hämatopoetischen Zelllinien und Progenitorzellen (Ketteler *et al.* 2002). Die in der vorliegenden Arbeit generierten pMOWS-Vektoren wurden zur retroviralen Transduktion von murinen Ba/F3-Zellen eingesetzt.

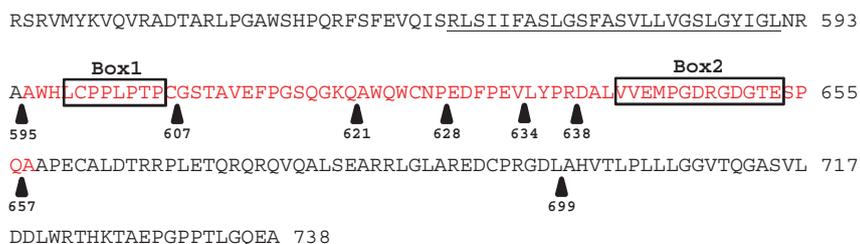
Ba/F3-gp130-Zellen dienten im Rahmen dieser Arbeit als eines von zwei Zellmodellen zur Analyse der IL-23-abhängigen Signaltransduktion. Ba/F3-Zellen sind murine prä-B-Zellen und bewährten sich als ideales Zellmodell zur Untersuchung der Signalgebung von Zytokinen (Palacios und Steinmetz 1985). Die Möglichkeit der Transduktion spezifischer Rezeptorketten in Ba/F3-Zellen und Generierung einer Zelllinie mit konstitutiver Expression des jeweiligen Proteins war Grundlage für Studien zur Signalgebung verschiedener Zytokine. Gearing und Mitarbeitern etablierten diese Methodik an Studien zum *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), *Oncostatin M* (OSM) und *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF) (Gearing *et al.* 1994). Auch die IL-23 Signaltransduktion wurde bisher erfolgreich in Ba/F3-Zellen untersucht (Floss *et al.* 2013). Mittels retroviraler Transduktion unter Verwendung des Vektors pMOWS und der Verpackungszelllinie Phoenix-Eco wurden im Rahmen dieser Arbeit Ba/F3-gp130-Zelllinien generiert, die sowohl den IL-23R als auch eine Variante des IL-12R $\beta$ 1 konstitutiv auf ihrer Oberfläche exprimierten. Die Oberflächenexpression konnte nach Färbung mit spezifischen Antikörpern mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Das unterschiedliche Expressionsniveau der einzelnen Rezeptorproteine kann auf einen übergeordneten Regulationsmechanismus innerhalb der Zelle hinweisen.

Unter Verwendung der generierten Ba/F3-gp130-Zelllinien wurde einerseits die IL-23-abhängige Proliferation und andererseits die IL-23-abhängige STAT3 Phosphorylierung untersucht. In einem zweiten Zellmodell wurden HeLa-Zellen transient mit cDNAs des IL-23R und der IL-12R $\beta$ 1 Varianten co-transfiziert und ebenfalls die Phosphorylierung von STAT3 mittels Western Blot bestimmt. Beim Vergleich der Ergebnisse der Western Blot Analyse beider Zelllinien zeigt sich, dass bei Transfektion von HeLa-Zellen die Resultate im Vergleich zu stabilen Ba/F3-Zelllinien weniger scharf und eindeutig waren. Bereits Floss und Mitarbeiter zeigten, dass die Transfektion von HeLa-Zellen mit IL-23R Varianten und die anschließende Analyse von pSTAT3 nach IL-23-abhängiger Stimulation auf Grund eines hohen Hintergrunds zu weniger deutlichen Ergebnissen führten (Floss *et al.* 2013).

Anhand der Deletionsvarianten  $\Delta$ 595,  $\Delta$ 607,  $\Delta$ 621 und  $\Delta$ 628, die sowohl keine Aktivierung von STAT3 in beiden Zellmodellen (bzw. ein gegenüber dem Wildtyp stark reduziertes Signal bei  $\Delta$ 628 in HeLa-Zellen), als auch keine Proliferation der jeweiligen Ba/F3-gp130 Zelllinien nach Stimulation mit IL-23 zeigten, wurde bewiesen,

dass der IL-12R $\beta$ 1 bestimmte Bereiche besitzt, ohne die der IL-23 Rezeptorkomplex keine Funktion besitzt. Neben der hochaffinen Bindung des Zytokins im extrazellulären Bereich ist die cytoplasmatische Domäne des IL-12R $\beta$ 1 entscheidend an der Signaltransduktion beteiligt.

Die Untersuchungen transient transfizierter HeLa-Zellen und stabil transduzierter Ba/F3-gp130 Zelllinien mit einer Vielzahl von Varianten des IL-12R $\beta$ 1 ermöglichten eine genaue Eingrenzung des für die Signaltransduktion entscheidenden Bereichs. Zusammen mit der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Deletionsvarianten und der im Rahmen der AG Scheller zusätzlich analysierten Variante  $\Delta$ 656 (Daten nicht gezeigt) konnte der Bereich der cytoplasmatischen Domäne, der für die Signalgebung von Bedeutung ist, eingegrenzt werden. Der Bereich der AS 595 bis 634 ist essentiell für die IL-23-abhängige Proliferation der stabil transduzierten Ba/F3 Zelllinien, wobei die AS 595 bis 628 unbedingt notwendig für die Aktivierung von STAT3 sind. Innerhalb dieser Region befindet sich eine Sequenz, die in Zytokinrezeptoren hochkonserviert vorliegt und als Box1 Motiv definiert wurde (siehe Abb. 22). Sie wurde schon 1991 bei Analysen am *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF) Rezeptor (Fukunaga *et al.* 1991), Interleukin 2 Rezeptor (Mori *et al.* 1991) und Interleukin 6 Rezeptor (Murakami *et al.* 1991) beschrieben.



**Abb. 22. Eingrenzung der für die Signaltransduktion entscheidenden AS-Sequenz des mIL-12R $\beta$ 1.** Die Primärstruktur des mIL-12R $\beta$ 1 ist dargestellt, wobei die Transmembrandomäne (unterstrichen) hervorgehoben wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die für die IL-23-abhängige Signaltransduktion entscheidende Aminosäuresequenz von 595 bis 656 (rot) detektiert. Innerhalb dieser Region befinden sich die Sequenzen der putativen Box1 und Box2 Motive, die in vielen Zytokinrezeptoren konserviert vorliegen.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass der Bereich der AS 634 bis 656 notwendig für eine dem Wildtyp vergleichbare Proliferation von stabil transduzierten Ba/F3 Zelllinien ist. Innerhalb dieses Bereichs befindet sich das putative Box2 Motiv.

### **5.3 Untersuchungen zu den putativen Box1 und Box2 Motiven und der Assoziation mit der Kinase Tyk2 im Rahmen der IL-23-vermittelten Signaltransduktion**

Usacheva *et al.* untersuchten den Zusammenhang des putativen Box1 und Box2 Motivs mit der Aktivierung und Assoziation der Januskinase Jak1 bei Typ 1 Interferon-Rezeptoren. Eine Sequenz dieser beiden Motive befindet sich ebenfalls in der cytoplasmatischen Domäne des IL-12R $\beta$ 1 (Chua *et al.* 1995). Die Prolin-reiche Sequenz des putativen Box1 Motiv liegt in der *membrane proximal region* 6 AS nach der Transmembrandomäne, während sich das putative Box2 Motiv C-terminal des Box1 Motivs in der cytoplasmatischen Domäne befindet. Die Homologie innerhalb der Box2 Motive verschiedener Zytokinrezeptoren ist sehr gering. Die Studien von Usacheva zeigten, dass das Box1 Motiv stärker an der Aktivierung und das Box2 Motiv an der Assoziation der Kinase Jak1 beteiligt ist (Usacheva *et al.* 2002). Inwiefern dies für den IL-12R $\beta$ 1 zutrifft, wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt. HeLa- und Ba/F3-gp130-Zellen, die die generierten Varianten des IL-12R $\beta$ 1 ohne putatives Box1 Motiv, mit mutiertem putativem Box1 Motiv oder ohne putatives Box2 Motiv exprimierten, wurden auf STAT3 Aktivierung und Proliferation nach IL-23 Stimulation untersucht. Die Analysen zeigten, dass sich ein fehlendes oder mutiertes putatives Box1 Motiv negativ auf die IL-23-vermittelte Signaltransduktion auswirkte. Das Fehlen des putativen Box2 Motivs rief jedoch nur eine verminderte Signalgebung hervor. Mit diesen Analysen wurde das Box1 und Box2 Motiv des mIL-12R $\beta$ 1 definiert, wobei dem Box1 Motiv eine entscheidende Rolle in der IL-23-vermittelten Signaltransduktion zugeschrieben wird. Weiterhin bestätigen diese Ergebnisse frühere Studien am GM-CSFR $\beta$  und *Growth Hormone* (GH) Rezeptor, bei denen gezeigt wurde, dass das putative Box2 Motiv positiv modulierend in die Signalgebung der beiden Rezeptoren eingreift, aber nicht absolut essentiell ist (Sakamaki *et al.* 1992; Colosi *et al.* 1993).

Innerhalb der IL-12 Familie besitzen Januskinasen eine Schlüsselposition im Rahmen der Zytokin-vermittelten Signaltransduktion. Die Kinasen Jak2 und Jak1 sind mit der IL-27 und IL-35 Signalgebung assoziiert, wobei Tyk2 und Jak2 für IL-12 und IL-23 entscheidend sind (Vignali und Kuchroo 2012).

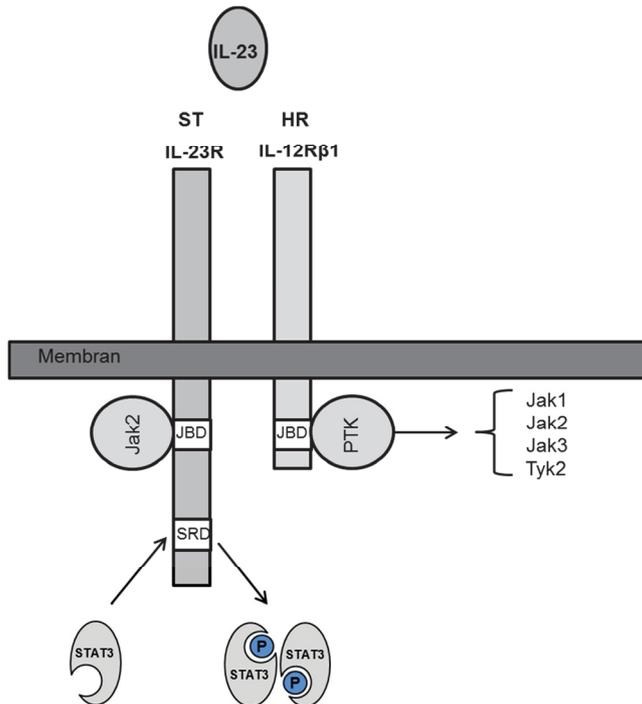
Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die Bindung von Tyk2 am IL-12R $\beta$ 1 eingehend zu analysieren und die Rolle des putativen Box1 Motivs als vielleicht wichtige Andockstelle für Tyk2 näher zu charakterisieren. Im Zellmodell sollte die Bindung von Tyk2 und charakteristischen IL-12R $\beta$ 1 Varianten mittels Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Da sich COS-7-Zellen innerhalb der AG Scheller sowohl zur Expression von Proteinen als auch im Rahmen von Immunpräzipitationsanalysen (Schröder *et al.* 2015) als geeignete Zelllinie darstellten, wurden diese Zellen für die beschriebenen Analysen zur Tyk2 Interaktion verwendet. Suthaus und Mitarbeiter verwendeten in ihren Studien ebenfalls Immunpräzipitationsanalysen auf der Basis transfizierter COS-7 Zellen zur Darstellung der Homodimerisierung des künstlichen IL-15-gp130 Proteins (Suthaus *et al.* 2010). Die Präzipitationsstudien zeigten, dass bei dem IL-12R $\beta$ 1 ohne putatives Box1 Motiv eine Bindung zur Januskinase Tyk2 nahezu unterblieb.

#### **5.4 Die Januskinase Tyk2 kann durch eine andere Kinase substituiert werden**

Angesichts des Stellenwertes für die IL-23 Signaltransduktion liegt bezüglich der Kinasen Tyk2 und Jak2 ein Ungleichgewicht vor. Eigene Analysen an Kinase-defizienten Fibrosarkomzellen zeigten, dass Jak2 absolut essentiell für die IL-23-vermittelte Signalgebung ist (in Zusammenarbeit mit Dr. Doreen Floss aus der AG Scheller). In weiteren Studien wurde die embryonale Letalität von Jak2 KO Mäusen auf Grund von Defekten in der Erythropoese aufgedeckt (Neubauer *et al.* 1998). Tyk2-defiziente Mäusen jedoch sind lebensfähig, wobei eine eingeschränkte Zytokin-vermittelte Immunantwort gezeigt wurde (Shimoda *et al.* 2000; Karaghiosoff *et al.* 2000). Studien an Patienten konnten anhand zweier Individuen mit autosomal rezessiver Tyk2-Defizienz beschrieben werden, die unterschiedliche klinische Präsentationen zeigten (Minegishi *et al.* 2006), (Kilic *et al.* 2012). Der Patient aus den Untersuchungen von Minegishi *et al.* zeigte ein Hyper-IgE-Syndrom mit ungewöhnlich hoher Anfälligkeit für zahlreiche Mikroorganismen wie Viren, Pilze und Mykobakterien sowie litt an einer atopische Dermatitis. Zelluläre Defekte in zahlreichen Signalwegen der Zytokine IFN, IL-6, IL-10, IL-12, und IL-23 wurden ermittelt. Weder eine durch IL-12 noch durch IL-23 induzierte STAT4 Aktivierung konnte in T-Zellen des Patienten

detektiert werden (Minegishi *et al.* 2006). Daten zur IL-23-abhängigen STAT3 Aktivierung liegen bislang nicht vor. Anhand phänotypischer Auffälligkeiten von STAT4-KO-Mäusen wurde beschrieben, dass die Aktivierung von STAT4 hauptsächlich durch IL-12 erfolgt (Kaplan *et al.* 1996). Die durch IL-23-vermittelte STAT4 Aktivierung ist vergleichsweise gering, wobei IL-23 hauptsächlich zur Aktivierung von STAT3 führt (Watford *et al.* 2004; Parham *et al.* 2002). Inwiefern Tyk2 essentiell für die IL-23-vermittelte Aktivierung von STAT3 ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Dr. Doreen Floss aus der AG Scheller untersucht. Mittels Tyk2-defizienten Fibrosarkomzellen, die den IL-23R und den IL-12R $\beta$ 1 exprimierten, wurde gezeigt, dass die IL-23-vermittelte Phosphorylierung von STAT3 auch ohne Tyk2 erfolgte und vermutlich durch eine weitere Kinase katalysiert wird. Unterstützt wird diese Hypothese durch Analysen von Kotenko und Mitarbeiter an chimären humanen IFN- $\gamma$ R2 Rezeptoren, die den Austausch von Januskinasen innerhalb des Jak-STAT-Signalweges zeigten (Kotenko *et al.* 1996).

Dabei wurde von den Autoren ein Model vorgeschlagen, bei denen die signalgebenden Rezeptoren in zwei verschiedene Einheiten unterteilt werden (siehe Abb. 23). Dabei steht ein signaltransduzierender Rezeptor mit STAT (SRD=STAT Rekrutierungsdomäne) und Jak (JBD=Januskinasebindungsdomäne) Bindungsdomäne einem Helferrezeptor mit nur einer Jak Bindungsdomäne gegenüber. Übertragen auf den IL-23 Rezeptorkomplex ist der IL-12R $\beta$ 1 der Helferrezeptor ohne funktionelle Tyrosinreste, jedoch mit assoziierter Proteinkinase Aktivität nach Bindung von IL-23. Die Aktivierung von STAT3 jedoch ist abhängig von bestimmten Bereichen des IL-23R (Floss *et al.* 2013). Kotenko und Mitarbeiter postulierten, dass die intrazelluläre Domäne des Helferrezeptors mit jeder Januskinase assoziiert sein kann und keine Spezifität bezüglich der Signaltransduktion herrscht (Kotenko *et al.* 1996).



**Abb. 23: Modell zur Klassifizierung von Rezeptoren angewandt auf den IL-23 Rezeptorkomplex.** Signalgebende Rezeptoren werden in einen signaltransduzierenden (ST) und einen Helferrezeptor (HR) unterteilt. Der signalvermittelnde Teil besitzt eine Jak (JBD) und STAT (SRD) Bindungsdomäne, wobei der Helferrezeptor nur eine Jak Bindungsdomäne besitzt, die mit jeder Januskinase assoziieren kann. STAT3 Proteine werden durch Phosphorylierung aktiviert und üben als Dimer ihre Funktion als Transkriptionsfaktor aus. ST, signaltransduzierender Rezeptor; HR, Helferrezeptor; JBD Januskinasebindungsdomäne; SRD, STAT Rekrutierungsdomäne; PTK, Proteintyrosinkinase. Modifiziert nach Kotenko 1996.

Eigene Untersuchungen mit einer chimären Variante des IL-12R $\beta$ 1, bei der die intrazelluläre Domäne durch die der gp130 Rezeptorkette ausgetauscht wurde, bestätigten diese These. Ba/F3-gp130-Zellen wurden generiert, die sowohl den IL-23R als auch den chimären IL-12R $\beta$ 1 (IL-12-R $\beta$ 1-ET/hgp130-c) konstitutiv auf ihrer Oberfläche exprimierten. Nach Stimulierung mit IL-23 zeigten diese Zellen ein dem Wildtyp vergleichbares Proliferationsverhalten und eine gleichwertige Aktivierung von STAT3. Diese Ergebnisse zeigen, dass die intrazelluläre Domäne des IL-12R $\beta$ 1 durch die gp130 Rezeptorkette ausgetauscht werden kann und zur Signalweiterleitung führt. Die mit dem mIL-12R $\beta$ 1 assoziierte Januskinase Tyk2 wurde in diesem Fall durch die gp130 assoziierte Kinase ersetzt. Gp130 ist mit den Januskinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 assoziiert, wobei Jak1 eine entscheidende Rolle für die STAT3 Aktivierung einnimmt (Guschin *et al.* 1995; Eulendorf *et al.* 2012). Diese Ergebnisse zeigen eine funktionelle

Kombination der beiden Rezeptorketten IL-23R und gp130. Fortführende Studien in der AG Scheller mit einer Vielzahl von Rezeptorchimären, bei denen extra- und intrazelluläre Domänen von Zytokinrezeptoren der IL-12 Familie kombiniert werden, sollen weitere Aufschlüsse über mögliche funktionelle Rezeptoruntereinheiten liefern.

## **5.5 Assoziation von Jak2 an den IL-23R**

Zur vollständigen Darstellung der Signaltransduktion des IL-23 Rezeptorkomplexes ist ebenfalls eine genaue Analyse des IL-23R nötig. Innerhalb des von Kotenko *et al.* aufgestellten ST/HR-Modells muss der IL-23R mindestens eine Bindungsstelle für eine Januskinase besitzen. Parham und Mitarbeiter zeigten bereits, dass Jak2 mit dem IL-23R assoziiert ist (Parham *et al.* 2002). Die klassischen Box1 und Box2 Motive fehlen jedoch innerhalb der cytoplasmatischen Domäne des IL-23R (Usacheva *et al.* 2002). Eine mögliche Jak2 Bindungsstelle wurde kürzlich vorgeschlagen (Pidaseva *et al.* 2011) und innerhalb der AG Scheller genauer analysiert (Floss *et al.* 2015, eingereicht). Ba/F3 Zellen, die den IL-23R ohne das postulierte Motiv exprimierten, zeigten keine Aktivierung von STAT3 und Proliferation nach IL-23 Stimulation. Jedoch konnte mittels Immunpräzipitation eine Assoziation von Jak2 mit der IL-23R Deletionsvariante gezeigt werden (Floss *et al.* 2015, eingereicht). Analysen weiterer IL-23R Deletionsvarianten deuteten an, dass die Aminosäuresequenz E455 bis E479 des murinen IL-23R wichtig für die Assoziation mit Jak2 ist, während der proximale cytoplasmatische Teil essentiell für die IL-23 Signalgebung ist (Floss *et al.* 2013). Der mit einer Häufigkeit von 0-17% in der Bevölkerung auftretende Polymorphismus R381Q des IL-23R befindet sich innerhalb der von Pidaseva und Mitarbeiter postulierten Bindestelle. Er stellt einen der signifikantesten, humanen genetischen Polymorphismen bezüglich Autoimmunität dar (Sarin *et al.* 2011) und vermittelt einen Schutz gegen entzündliche Darmerkrankungen, Psoriasis, ankylosierende Spondylitis und *graft versus host disease* (Paus *et al.* 2008). Einige Studien belegten den Funktionsverlust des IL-23R R381Q, wobei eine verminderte IL-23-abhängige Produktion von IL-17 und IL-22 gezeigt wurde. Weiterhin zeigten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen von Individuen mit IL-23R R381Q Polymorphismus eine unter IL-23 Stimulation verringerte Aktivierung von STAT3 im Vergleich zu Wildtyp Zellen (Sarin *et al.* 2011). Im Gegensatz zur Identifikation eines geringeren Prozentsatzes zirkulierender T<sub>H</sub>17-Zellen von Sarin und Mitarbeiter, wurde in der Arbeitsgruppe von Di Meglio gezeigt,

dass der R381Q Polymorphismus keinen Einfluss auf die T<sub>H</sub>17-Zell-Differenzierung besitzt, sondern die IL-23 beeinflusste T<sub>H</sub>17-Zell Effektorfunktion beeinträchtigt wird. Individuen ohne R381Q Polymorphismus und Träger wurden untersucht, wobei eine signifikant reduzierte IL-23-abhängige IL-17A Produktion und STAT3 Phosphorylierung im Falle des Polymorphismus beschrieben wurde (Di Meglio *et al.* 2011). Sarin und Mitarbeiter demonstrierten ergänzend eine verringerte STAT3 Aktivierung in mit IL-12Rβ1 und IL-23R oder R381Q Variante co-transfizierten HeLa-Zellen (Sarin *et al.* 2011). Die beschriebenen Ergebnisse sind vergleichbar mit Studien von Floss und Mitarbeiter an Varianten mit R400Q Polymorphismus in der Maus, welche dem R381Q Polymorphismus beim Menschen entspricht. Ba/F3-IL-12Rβ1 Zellen, die den IL-23R R400Q exprimierten, proliferierten unter IL-23 Stimulation, aber besaßen eine verringerte STAT3 Aktivierung (Floss *et al.* 2015, eingereicht). De Paus und Mitarbeiter zeigten in Studien zur Untersuchung des R381Q Polymorphismus gegensätzliche Ergebnisse. Mit IL-12Rβ1 und IL-23R Wildtyp oder R381Q co-transduzierte T-Zellblasten von Patienten mit Nullmutation des IL-12Rβ1 zeigten eine ähnliche Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT4 nach IL-23 Stimulation und keine Unterschiede in der IL-23-abhängigen Proliferation. Anhand dieser Ergebnisse scheint der Zusammenhang zwischen Autoimmunerkrankungen und des beschriebenen Polymorphismus nicht auf funktioneller Ebene innerhalb der R381Q Variante des IL-23R zu bestehen (Paus *et al.* 2008).

Die vorliegende Arbeit liefert entscheidende Hinweise zur Charakterisierung der IL-23 Signaltransduktion. Die genaue Analyse dieses Signalweges ist für das Verständnis von IL-23 bedingten Autoimmunerkrankungen, der Rolle von IL-23 in der Krebsentstehung und der dadurch bedingten Therapiemöglichkeiten von besonderer Bedeutung. Bisherige Therapiemöglichkeiten beinhalten die Interaktion eines generierten Antikörpers gegen IL-12/23 p40 (Ustekinumab, zugelassen in den USA und EU) oder IL-23p19 (Briakinumab, Phase 3 abgeschlossen) (Croxford *et al.* 2014). Durch die genaue Charakterisierung der Struktur des IL-23 Rezeptors und der nach Aktivierung entstehenden Signalkaskade können Medikamente entwickelt werden, die spezifisch in dieses System eingreifen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte strukturelle Analyse des IL-12Rβ1 und dessen Assoziation mit der Januskinase Tyk2 ist ein Ansatz für neue Therapiestrategien zur Bekämpfung von IL-23-vermittelten Erkrankungen.

Therapeutika könnten spezifisch mit der Interaktion von Tyk2 und dem IL-12R $\beta$ 1 interferieren und die IL-23-vermittelte Signaltransduktion beeinflussen. Durch Anlagerung spezifischer Proteine an die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Motive des IL-12R $\beta$ 1 wäre es möglich, die durch diesen Rezeptor eingeleiteten Signalwege gezielt zu beeinflussen.

## 6 Schlussfolgerungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Stellung des IL-12R $\beta$ 1 innerhalb der IL-23 Signalgebung analysiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass der IL-12R $\beta$ 1 entscheidend an der IL-23-abhängigen Signaltransduktion beteiligt ist.

Zusammen mit weiteren Arbeiten in der AG-Scheller konnte die für die Signalgebung entscheidende cytoplasmatische Domäne des IL-12R $\beta$ 1 auf die Aminosäuren 595-656 begrenzt werden. Die innerhalb dieser Domänen befindlichen putativen Box1 und Box2 Motive konnten definiert und auf die Notwendigkeit innerhalb der IL-23 Signaltransduktion untersucht werden. Das in vielen Zytokinrezeptoren hochkonserviert vorliegende putative Box1 Motiv ist essentiell für die IL-23-abhängige Signaltransduktion und an der Bindung des Rezeptors mit der Januskinase Tyk2 beteiligt. Wie in der Literatur bereits vermutet, wirkt das putative Box2 Motiv lediglich signalverstärkend.

In einer weiteren Analyse konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Domäne des IL-12R $\beta$ 1 durch die gp130 Proteinkette ersetzt werden kann. Das in der Literatur von Kotenko und Mitarbeiter beschriebene Modell zur Unterteilung eines Rezeptor in einen signaltransduzierenden- und einen sog. Helferrezeptor wurde im Rahmen dieser Arbeit diskutiert und bestärkt. Der IL-12R $\beta$ 1 als Helferrezeptor kann somit durch eine funktionelle Rezeptorkette mit einer assoziierten Januskinase ersetzt werden.

Die genaue Charakterisierung der Struktur des IL-12R $\beta$ 1 und der anschließenden Signalgebung wie der Assoziation mit der Januskinase Tyk2 ist der Ansatz zur Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Bekämpfung IL-23 bedingter Erkrankungen.

## 7 Literatur und Quellenverzeichnis

- Althoff, K.; Müllberg, J.; Aasland, D.; Voltz, N.; Kallen, K.; Grötzinger, J.; Rose-John, S. (2001): Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins. *Biochem. J.* 353 (Pt 3), S. 663–672.
- Annunziato, F.; Romagnani, S. (2011): Mouse T helper 17 phenotype: not so different than in man after all. *Cytokine* 56 (1), S. 112–115.
- Awasthi, A.; Kuchroo, V. K. (2009): Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int. Immunol.* 21 (5), S. 489–498.
- Balkwill, F.; Mantovani, A. (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357 (9255), S. 539–545.
- Bamba, S.; Andoh, A.; Yasui, H.; Araki, Y.; Bamba, T.; Fujiyama, Y. (2003): Matrix metalloproteinase-3 secretion from human colonic subepithelial myofibroblasts: role of interleukin-17. *J. Gastroenterol.* 38 (6), S. 548–554.
- Becerra-Díaz, M.; Valderrama-Carvajal, H.; Terrazas, L. I. (2011): Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) family members in helminth infections. *Int. J. Biol. Sci.* 7 (9), S. 1371–1381.
- Boulanger, M. J.; Chow, DC.; Brevnova, E. E.; Garcia, K. C. (2003): Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* 300 (5628), S. 2101–2104.
- Cai, X.; Xu, Y.; Cheung, A. K.; Tomlinson, R. C.; Alcázar-Román, A.; Murphy, L. *et al.* (2013): PIKfyve, a class III PI kinase, is the target of the small molecular IL-12/IL-23 inhibitor apilimod and a player in Toll-like receptor signaling. *Chem. Biol.* 20 (7), S. 912–921.
- Carmody, R. J.; Ruan, Q.; Liou, H. C.; Chen, Y. H. (2007): Essential roles of c-Rel in TLR-induced IL-23 p19 gene expression in dendritic cells. *J. Immunol.* 178 (1), S. 186–191.
- Case, R. D.; Piccione, E.; Wolf, G.; Benett, A. M.; Lechleider, R. J.; Neel, B. G.; Shoelson, S. E. (1994): SH-PTP2/Syp SH2 domain binding specificity is defined by direct interactions with platelet-derived growth factor beta-receptor, epidermal growth factor receptor, and insulin receptor substrate-1-derived phosphopeptides. *J. Biol. Chem.* 269 (14), S. 10467–10474.
- Cho, M. L.; Kang, J. W.; Moon, Y. M.; Nam, H. J.; Jhun, J. Y.; Heo, S. B. *et al.* (2006): STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J. Immunol.* 176 (9), S. 5652–5661.
- Chua, A. O.; Wilkinson, V. L.; Presky, D. H.; Gubler, U. (1995): Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component. *J. Immunol.* 155 (9), S. 4286–4294.
- Cocco, C.; Canale, S.; Frasson, C.; Di Carlo, E.; Ognio, E.; Ribatti, D. *et al.* (2010): Interleukin-23 acts as antitumor agent on childhood B-acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 116 (19), S. 3887–3898.

- Collison, L. W.; Vignali, D. A. A. (2008): Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol. Rev.* 226, S. 248–262.
- Collison, L. W.; Workman, C. J.; Kuo, T. T.; Boyd, K.; Wang, Y.; Vignali, K. M. *et al.* (2007): The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450 (7169), S. 566–569.
- Colosi, P.; Wong, K.; Leong, S. R.; Wood, W. I. (1993): Mutational analysis of the intracellular domain of the human growth hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 268 (17), S. 12617–12623.
- Croxford, A. L.; Kulig, P.; Becher, B. (2014): IL-12-and IL-23 in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25 (4), S. 415–421.
- Cua, D. J.; Sherlock, J.; Chen, Y.; Murphy, C. A.; Joyce, B.; Seymour, B. *et al.* (2003): Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421 (6924), S. 744–748.
- Cua, D. J.; Tato, C. M. (2010): Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10 (7), S. 479–489.
- Darnell, J. E.; Kerr, I. M.; Stark, G. R. (1994): Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264 (5164), S. 1415–1421.
- Di Meglio, P.; Di Cesare, A.; Laggner, U.; Chu, C. C.; Napolitano, L.; Villanova, F. *et al.* (2011): The IL23R R381Q gene variant protects against immune-mediated diseases by impairing IL-23-induced Th17 effector response in humans. *PLoS ONE* 6 (2), S. e17160.
- Durant, L.; Watford, W. T.; Ramos, H. L.; Laurence, A.; Vahedi, G.; Wei, L. *et al.* (2010): Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. In: *Immunity* 32 (5), S. 605–615.
- Duvallet, E.; Semerano, L.; Assier, E.; Falgarone, G.; Boissier, M. C. (2011): Interleukin-23: a key cytokine in inflammatory diseases. *Ann. Med.* 43 (7), S. 503–511.
- Elliott, M.; Benson, J.; Blank, M.; Brodmerkel, C.; Baker, D.; Sharples, K. R.; Szapary, P. (2009): Ustekinumab: lessons learned from targeting interleukin-12/23p40 in immune-mediated diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1182, S. 97–110.
- Eulendorf, R.; Dittrich, A.; Khouri, C.; Müller, P. J.; Mütze, B.; Wolf, A.; Schaper, F. (2012): Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs. *Eur. J. Cell Biol.* 91 (6-7), S. 486–495.
- Fischer, M.; Goldschmitt, J.; Peschel, C.; Brakenhoff, J. P.; Kallen, K. J.; Wollmer, A. *et al.* (1997): I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat. Biotechnol.* 15 (2), S. 142–145.
- Floss, D. M.; Mrotzek, S.; Klöcker, T.; Schröder, J.; Grötzinger, J.; Rose-John, S.; Scheller, J. (2013): Identification of Canonical Tyrosine-dependent and Non-canonical Tyrosine-independent STAT3 Activation Sites in the Intracellular Domain of the Interleukin 23 Receptor. *J. Biol. Chem.* 288 (27), S. 19386–19400.
- Fukunaga, R.; Ishizaka-Ikeda, E.; Pan, C. X.; Seto, Y.; Nagata, S. (1991): Functional domains of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *EMBO J.* 10 (10), S. 2855–2865.

- Gandhi, M.; Alwawi, E.; Gordon, K. B. (2010): Anti-p40 antibodies ustekinumab and briakinumab: blockade of interleukin-12 and interleukin-23 in the treatment of psoriasis. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 29 (1), S. 48–52.
- Garbers, C.; Hermanns, H. M.; Schaper, F.; Müller-Newen, G.; Grötzinger, J.; Rose-John, S.; Scheller, J. (2012): Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23 (3), S. 85–97.
- Gearing, D. P.; Ziegler, S. F.; Comeau, M. R.; Friend, D.; Thoma, B.; Cosman, D. *et al.* (1994): Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (3), S. 1119–1123.
- Ghoreschi, K.; Laurence, A.; O'Shea, J. J. (2009): Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol. Rev.* 228 (1), S. 273–287.
- Guschin, D.; Rogers, N.; Briscoe, J.; Witthuhn, B.; Watling, D.; Horn, F. *et al.* (1995): A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *EMBO J.* 14 (7), S. 1421–1429.
- Heinrich, P. C.; Behrmann, I.; Müller-Newen, G.; Schaper, F.; Graeve, L. (1998): Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 334 (Pt 2), S. 297–314.
- Huang, W.; Na, L.; Fidel, P. L.; Schwarzenberger, P. (2004): Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J. Infect. Dis.* 190 (3), S. 624–631.
- Hue, S.; Ahern, P.; Buonocore, S.; Kullberg, M. C.; Cua, D. J.; McKenzie, B. S. *et al.* (2006): Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 203 (11), S. 2473–2483.
- Ihle, J. N.; Kerr, I. M. (1995): Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* 11 (2), S. 69–74.
- Infante-Duarte, C.; Horton, H. F.; Byrne, M. C.; Kamradt, T. (2000): Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J. Immunol.* 165 (11), S. 6107–6115.
- Jones, L. L.; Vignali, D. A. A. (2011): Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunol. Res.* 51 (1), S. 5–14.
- Jones, S. A.; Scheller, J.; Rose-John, S. (2011): Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J. Clin. Invest.* 121 (9), S. 3375–3383.
- Kaplan, M. H.; Sun, Y. L.; Hoey, T.; Grusby, M. J. (1996): Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382 (6587), S. 174–177.
- Karaghiosoff, M.; Neubauer, H.; Lassnig, C.; Kovarik, P.; Schindler, H.; Pircher, H. *et al.* (2000): Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity* 13 (4), S. 549–560.
- Ketteler, R.; Glaser, S.; Sandra, O.; Martens, U. M.; Klingmüller, U. (2002): Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther.* 9 (8), S. 477–487.

- Kilic, S. S.; Hacimustafaoglu, M.; Boisson-Dupuis, S.; Kreins, A. Y.; Grant, A. V.; Abel, L.; Casanova, J. L. (2012): A patient with tyrosine kinase 2 deficiency without hyper-IgE syndrome. *J. Pediatr.* 160 (6), S. 1055–1057.
- Kloek, C.; Haq, A. K.; Dunn, S. L.; Lavery, H. J.; Banks, A. S.; Myers, M. G. (2002): Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J. Biol. Chem.* 277 (44), S. 41547–41555.
- Kobayashi, M.; Fitz, L.; Ryan, M.; Hewick, R. M.; Clark, S. C.; Chan, S. *et al.* (1989): Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170 (3), S. 827–845.
- Kotenko, S. V.; Izotova, L. S.; Pollack, B. P.; Muthukumar, G.; Pauku, K.; Silvennoinen, O. *et al.* (1996): Other kinases can substitute for Jak2 in signal transduction by interferon-gamma. *J. Biol. Chem.* 271 (29), S. 17174–17182.
- Krulig, E.; Gordon, K. B. (2010): Ustekinumab: an evidence-based review of its effectiveness in the treatment of psoriasis. *Core. Evid.* 5, S. 11–22.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Langowski, J. L.; Zhang, X.; Wu, L.; Mattson, J. D.; Chen, T.; Smith, K. *et al.* (2006): IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 442 (7101), S. 461–465.
- Langrish, C. L.; McKenzie, B. S.; Wilson, N. J.; Waal Malefyt, R. de; Kastelein, R. A.; Cua, D. J. (2004): IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 202, S. 96–105.
- Leonardi, C. L.; Kimball, A. B.; Papp, K. A.; Yeilding, N.; Guzzo, C.; Wang, Y. *et al.* (2008): Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1). *Lancet* 371 (9625), S. 1665–1674.
- Lima, X. T.; Abuabara, K.; Kimball, A. B.; Lima, H. C. (2009): Briakinumab. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 9 (8), S. 1107–1113.
- Liu, Z.; Yadav, P. K.; Xu, X.; Su, J.; Chen, C.; Tang, M. *et al.* (2011): The increased expression of IL-23 in inflammatory bowel disease promotes intraepithelial and lamina propria lymphocyte inflammatory responses and cytotoxicity. *J. Leukoc. Biol.* 89 (4), S. 597–606.
- Matusевичius, D.; Kivisäkk, P.; He, B.; Kostulas, N.; Ozenci, V.; Fredrikson, S.; Link, H. (1999): Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 5 (2), S. 101–104.
- McGeachy, M. J.; Chen, Y.; Tato, C. M.; Laurence, A.; Joyce-Shaikh, B.; Blumenschein, W. M. *et al.* (2009): The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat. Immunol.* 10 (3), S. 314–324.
- Minegishi, Y.; Saito, M.; Morio, T.; Watanabe, K.; Agematsu, K.; Tsuchiya, S. *et al.* (2006): Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity* 25 (5), S. 745–755.

- Mori, H.; Barsoumian, E. L.; Hatakeyama, M.; Taniguchi, T. (1991): Signal transduction by interleukin 2 receptor beta chain: importance of the structural integrity as revealed by site-directed mutagenesis and generation of chimeric receptors. *Int. Immunol.* 3 (2), S. 149–156.
- Murakami, M.; Narazaki, M.; Hibi, M.; Yawata, H.; Yasukawa, K.; Hamaguchi, M. *et al.* (1991): Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (24), S. 11349–11353.
- Naeger, L. K.; McKinney, J.; Salvekar, A.; Hoey, T. (1999): Identification of a STAT4 binding site in the interleukin-12 receptor required for signaling. *J. Biol. Chem.* 274 (4), S. 1875–1878.
- Napolitani, G.; Rinaldi, A.; Bertoni, F.; Sallusto, F.; Lanzavecchia, A. (2005): Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.* 6 (8), S. 769–776.
- Neubauer, H.; Cumano, A.; Müller, M.; Wu, H.; Huffstadt, U.; Pfeffer, K. (1998): Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 93 (3), S. 397–409.
- Ngiow, S. F.; Teng, M. W. L.; Smyth, M. J. (2013): A balance of interleukin-12 and -23 in cancer. *Trends Immunol.* 34 (11), S. 548–555.
- Oppmann, B.; Lesley, R.; Blom, B.; Timans, J. C.; Xu, Y.; Hunte, B. *et al.* (2000): Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from IL-12. *Immunity* 13 (5), S. 715–725.
- O'Shea, J. J.; Paul, W. E. (2002): Regulation of T(H)1 differentiation--controlling the controllers. *Nat. Immunol.* 3 (6), S. 506–508.
- Palacios, R.; Steinmetz, M. (1985): Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell* 41 (3), S. 727–734.
- Papp, K. A.; Langley, R. G.; Lebwohl, M.; Krueger, G. G.; Szapary, P.; Yeilding, N. *et al.* (2008): Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2). *Lancet* 371 (9625), S. 1675–1684.
- Parham, C.; Chirica, M.; Timans, J.; Vaisberg, E.; Travis, M.; Cheung, J. *et al.* (2002): A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J. Immunol.* 168 (11), S. 5699–5708.
- Paus, R. A. de; van de Wetering, D.; van Dissel, J. T.; van de Vosse, E. (2008): IL-23 and IL-12 responses in activated human T cells retrovirally transduced with IL-23 receptor variants. *Mol. Immunol.* 45 (15), S. 3889–3895.
- Pflanz, S.; Timans, J. C.; Cheung, J.; Rosales, R.; Kanzler, H.; Gilbert, J. *et al.* (2002): IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 16 (6), S. 779–790.
- Pidasheva, S.; Trifari, S.; Phillips, A.; Hackney, J. A.; Ma, Y.; Smith, A. *et al.* (2011): Functional studies on the IBD susceptibility gene IL23R implicate reduced receptor function in the protective genetic variant R381Q. *PLoS ONE* 6 (10), S. e25038.

- Prchal-Murphy, M.; Semper, C.; Lassnig, C.; Wallner, B.; Gausterer, C.; Teppner-Klymiuk, I. *et al.* (2012): TYK2 kinase activity is required for functional type I interferon responses in vivo. *PLoS ONE* 7 (6), S. e39141.
- Rasmussen, T. K.; Andersen, T.; Hvid, M.; Hetland, M. L.; Hørslev-Petersen, K.; Stengaard-Pedersen, K. *et al.* (2010): Increased interleukin 21 (IL-21) and IL-23 are associated with increased disease activity and with radiographic status in patients with early rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 37 (10), S. 2014–2020.
- Re, F.; Strominger, J. L. (2001): Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 276 (40), S. 37692–37699.
- Rozwarski, D. A.; Gronenborn, A. M.; Clore, G. M.; Bazan, J. F.; Bohm, A.; Wlodawer, A. *et al.* (1994): Structural comparisons among the short-chain helical cytokines. *Structure* 2 (3), S. 159–173.
- Russell, T. D.; Yan, Q.; Fan, G.; Khalifah, A. P.; Bishop, D. K.; Brody, S. L.; Walter, M. J. (2003): IL-12 p40 homodimer-dependent macrophage chemotaxis and respiratory viral inflammation are mediated through IL-12 receptor beta 1. *J. Immunol.* 171 (12), S. 6866–6874.
- Ryan, C.; Abramson, A.; Patel, M.; Menter, A. (2012): Current investigational drugs in psoriasis. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 21 (4), S. 473–487.
- Sakamaki, K.; Miyajima, I.; Kitamura, T.; Miyajima, A. (1992): Critical cytoplasmic domains of the common beta subunit of the human GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors for growth signal transduction and tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 11 (10), S. 3541–3549.
- Sandborn, W. J.; Feagan, B. G.; Fedorak, R. N.; Scherl, E.; Fleisher, M. R.; Katz, S. *et al.* (2008): A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterol.* 135 (4), S. 1130–1141.
- Sarin, R.; Wu, X.; Abraham, C. (2011): Inflammatory disease protective R381Q IL23 receptor polymorphism results in decreased primary CD4+ and CD8+ human T-cell functional responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (23), S. 9560–9565.
- Schindler, C. W. (2002): Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J. Clin. Invest.* 109 (9), S. 1133–1137.
- Schröder, J.; Moll, J. M.; Baran, P.; Grötzinger, J.; Scheller, J.; Floss, D. M. (2015): Non-Canonical Interleukin 23 Receptor Complex Assembly: P40 PROTEIN RECRUITS INTERLEUKIN 12 RECEPTOR  $\beta$ 1 VIA SITE II AND INDUCES P19/INTERLEUKIN 23 RECEPTOR INTERACTION VIA SITE III. *J. Biol. Chem.* 290 (1), S. 359–370.
- Shimoda, K.; Kato, K.; Aoki, K.; Matsuda, T.; Miyamoto, A.; Shibamori, M. *et al.* (2000): Tyk2 plays a restricted role in IFN alpha signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function. In: *Immunity* 13 (4), S. 561–571.
- Sofen, H.; Smith, S.; Matheson, R. T.; Leonardi, C. L.; Calderon, C.; Brodmerkel, C. *et al.* (2014): Guselkumab (an IL-23-specific mAb) demonstrates clinical and molecular response in patients with moderate-to-severe psoriasis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133 (4), S. 1032–1040.

- Sommer, J.; Effenberger, T.; Volpi, E.; Waetzig, G. H.; Bernhardt, M.; Suthaus, J. *et al.* (2012): Constitutively active mutant gp130 receptor protein from inflammatory hepatocellular adenoma is inhibited by an anti-gp130 antibody that specifically neutralizes interleukin 11 signaling. *J. Biol. Chem.* 287 (17), S. 13743–13751.
- Suthaus, J.; Tillmann, A.; Lorenzen, I.; Bulanova, E.; Rose-John, S.; Scheller, J. (2010): Forced homo- and heterodimerization of all gp130-type receptor complexes leads to constitutive ligand-independent signaling and cytokine-independent growth. *Mol. Biol. Cell* 21 (15), S. 2797–2807.
- Tato, C. M.; Cua, D. J. (2008a): SnapShot: Cytokines I. *Cell* 132 (2), S. 324, 324.e1.
- Tato, C. M.; Cua, D. J. (2008b): SnapShot: cytokines II. *Cell* 132 (3), S. 500.
- Tato, C. M.; Cua, D. J. (2008c): SnapShot: cytokines III. *Cell* 132 (5), S. 900.
- Tato, C. M.; Cua, D. J. (2008d): SnapShot: Cytokines IV. *Cell* 132 (6), S. 1062.e1-2.
- Teunissen, M. B.; Koomen, C. W.; Waal Malefyt, R. de; Wierenga, E. A.; Bos, J. D. (1998): Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 111 (4), S. 645–649.
- Usacheva, A.; Sandoval, R.; Domanski, P.; Kotenko, S. V.; Nelms, K.; Goldsmith, M. A.; Colamonici, O. R. (2002): Contribution of the Box 1 and Box 2 motifs of cytokine receptors to Jak1 association and activation. *J. Biol. Chem.* 277 (50), S. 48220–48226.
- Vaknin-Dembinsky, A.; Balashov, K.; Weiner, H. L. (2006): IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J. Immunol.* 176 (12), S. 7768–7774.
- Verreck, F. A. W.; Boer, T. de; Langenberg, D. M. L.; Hoeve, M. A.; Kramer, M.; Vaisberg, E. *et al.* (2004): Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (13), S. 4560–4565.
- Vignali, D. A. A.; Kuchroo, V. K. (2012): IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat. Immunol.* 13 (8), S. 722–728.
- Wada, Y.; Cardinale, I.; Khatcherian, A.; Chu, J.; Kantor, A. B.; Gottlieb, A. B. *et al.* (2012): Apilimod inhibits the production of IL-12 and IL-23 and reduces dendritic cell infiltration in psoriasis. *PLoS ONE* 7 (4), S. e35069.
- Watford, W. T.; Hissong, B. D.; Bream, J. H.; Kanno, Y.; Muul, L.; O'Shea, J. J. (2004): Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol. Rev.* 202, S. 139–156.
- Wen, S. R.; Liu, G. J.; Feng, R. N.; Gong, F. C.; Zhong, H.; Duan, S. R.; Bi, S. (2012): Increased levels of IL-23 and osteopontin in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 244 (1-2), S. 94–96.
- Wiederkehr-Adam, M.; Ernst, P.; Müller, K.; Bieck, E.; Gombert, F. O.; Ottl, J. *et al.* (2003): Characterization of phosphopeptide motifs specific for the Src homology 2 domains of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and STAT3. *J. Biol. Chem.* 278 (18), S. 16117–16128.

- Wilson, N. J.; Boniface, K.; Chan, J. R.; McKenzie, B. S.; Blumenschein, W. M.; Mattson, J. D. *et al.* (2007): Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat. Immunol.* 8 (9), S. 950–957.
- Wojno, E. D. Tait; Hunter, C. A. (2012): New directions in the basic and translational biology of interleukin-27. *Trends Immunol.* 33 (2), S. 91–97.
- Wu, C.; Wang, X.; Gadina, M.; O'Shea, J. J.; Presky, D. H.; Magram, J. (2000): IL-12 receptor beta 2 (IL-12R beta 2)-deficient mice are defective in IL-12-mediated signaling despite the presence of high affinity IL-12 binding sites. *J. Immunol.* 165 (11), S. 6221–6228.
- Yang, X. O.; Panopoulos, A. D.; Nurieva, R.; Chang, S. H.; Wang, D.; Watowich, S. S.; Dong, C. (2007): STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J. Biol. Chem.* 282 (13), S. 9358–9363.
- Yao, B. B.; Niu, P.; Surowy, C. S.; Faltynek, C. R. (1999): Direct interaction of STAT4 with the IL-12 receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 368 (1), S. 147–155.
- Ye, P.; Rodriguez, F. H.; Kanaly, S.; Stocking, K. L.; Schurr, J.; Schwarzenberger, P. *et al.* (2001): Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* 194 (4), S. 519–527.
- Zhang, Y.; Ma, X. (2010): Triptolide inhibits IL-12/IL-23 expression in APCs via CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J. Immunol.* 184 (7), S. 3866–3877.
- Ziolkowska, M.; Koc, A.; Luszczkiewicz, G.; Ksiezopolska-Pietrzak, K.; Klimczak, E.; Chwalinska-Sadowska, H.; Maslinski, W. (2000): High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J. Immunol.* 164 (5), S. 2832–2838.
- Zou, J.; Presky, D. H.; Wu, C. Y.; Gubler, U. (1997): Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases. *J. Biol. Chem.* 272 (9), S. 6073–6077.
- Zúñiga, L. A.; Jain, R.; Haines, C.; Cua, D. J. (2013): Th17 cell development: from the cradle to the grave. *Immunol. Rev.* 252 (1), S. 78–88.

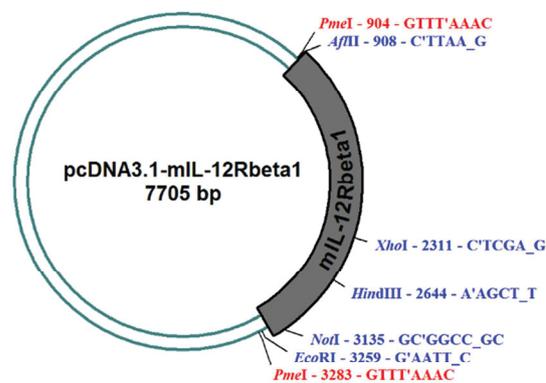
## 8 Anhang

### Vektorkarten

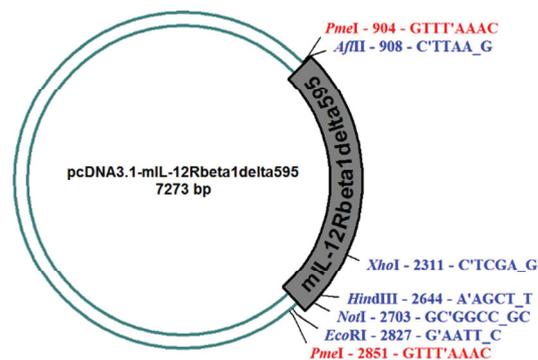
Hier aufgeführt sind die Deletions- und Mutationsvarianten des mIL-12R $\beta$ 1 in pcDNA3.1

Die Vektoren sind mit C-terminalem c-Myc- und *HIS-Tag* versehen.

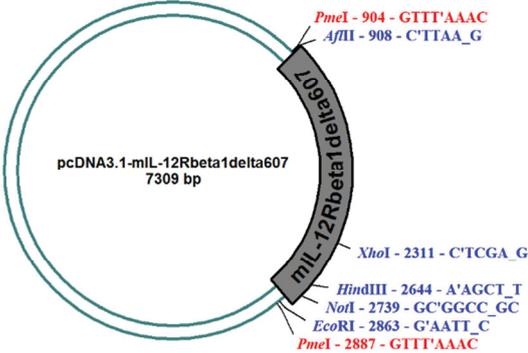
pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1



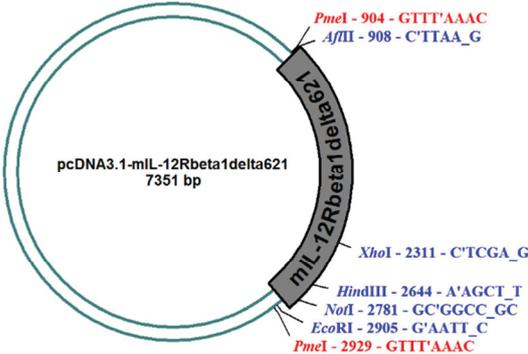
pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 595



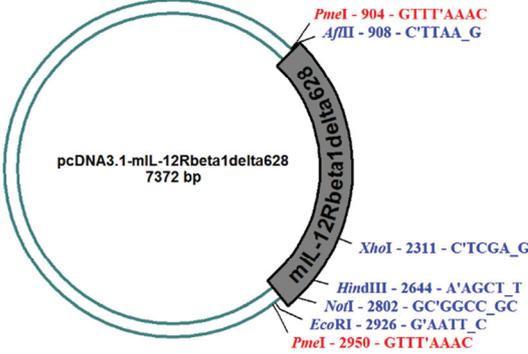
pcDNA3.1-mIL-12Rβ1Δ607



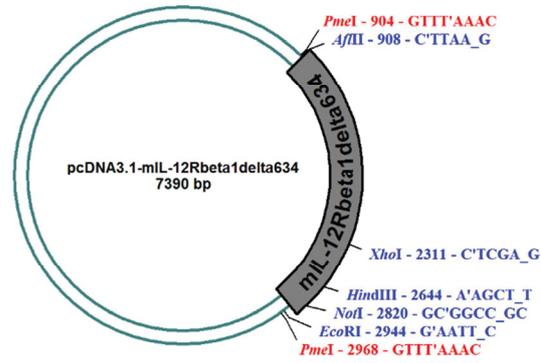
pcDNA3.1-mIL-12Rβ1Δ621



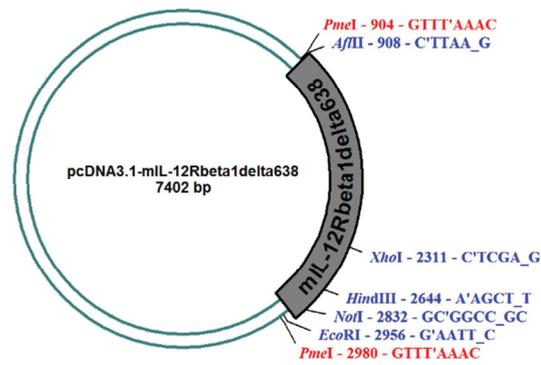
pcDNA3.1-mIL-12Rβ1Δ628



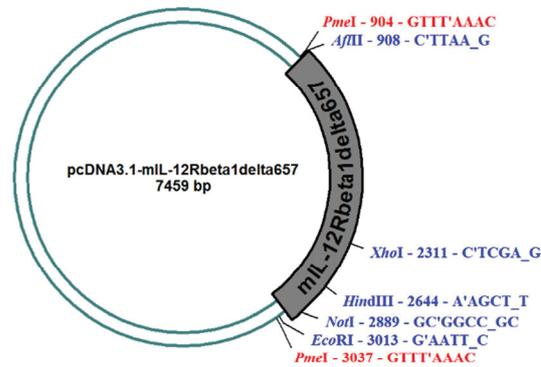
pcDNA3.1-mIL-12Rβ1Δ634



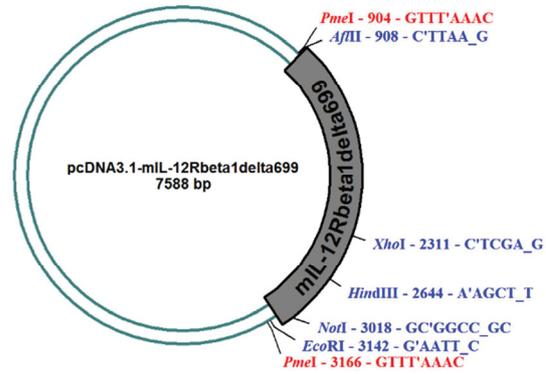
pcDNA3.1-mIL-12Rβ1Δ638



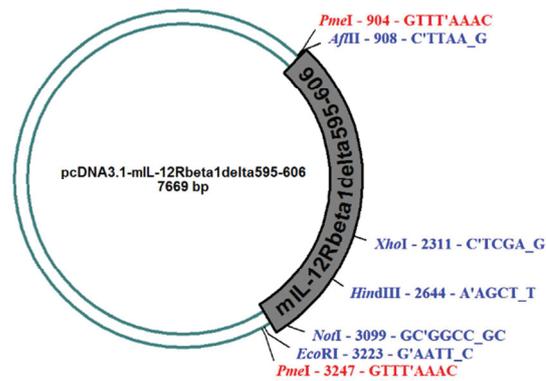
pcDNA3.1-mIL-12Rβ1Δ657



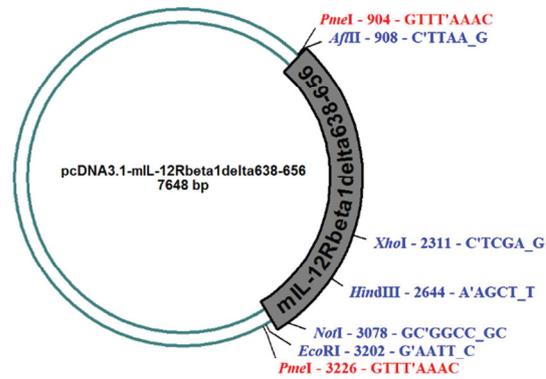
pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 699



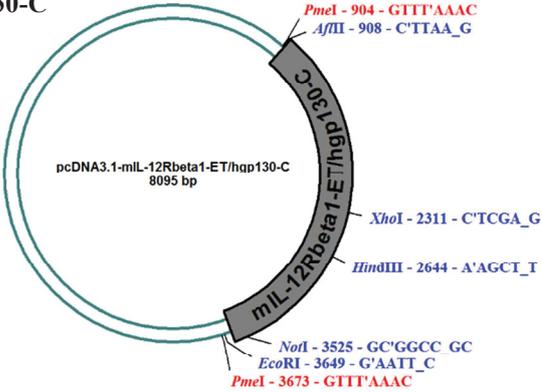
pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 595-606



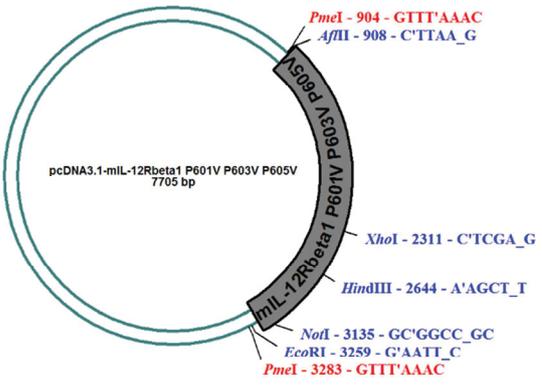
pcDNA3.1-mIL-12R $\beta$ 1 $\Delta$ 638-656



pcDNA3.1-mIL-12Rβ1-ET/hgp130-C



pcDNA3.1-mIL-12Rβ1  
P601V P603V P605V



# Danksagung

Der Dank geht an alle Personen, die mich auf dem Weg zur Promotion begleitet haben.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Scheller und meiner Betreuerin Dr. Doreen M. Floss bedanken. Nur durch ihre stetige Unterstützung und dem Interesse an dem wissenschaftlichen Erfolg war es mir möglich diese Arbeit zu vollenden.

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Forschungskommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unterstützt. Somit möchte ich mich bei allen Beteiligten, die dies ermöglichten, bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter der AG Scheller, deren Hilfe und Unterstützung zur Entstehung und Vollendung der Dissertation beigetragen haben.

Mein größtes Dankeschön geht an meine Familie, die mich auf diesem langen und schwierigen Weg begleitet und mich in allen Lebenslagen unterstützt hat.

-Danke-

# Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

12.02.2015, Tobias Klöcker

---