

**Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des
heterodimeren Zytokins Interleukin 23 (IL-23) und
dessen Rezeptorkomplexes**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jutta Schröder

aus Dinslaken

Düsseldorf, Januar 2015

aus dem Institut für **Biochemie und Molekularbiologie II**
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. William Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2015

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1	Einteilung der Zytokine	1
1.1.1	Zytokine der Interleukin 12 (IL-12) Familie	1
1.2	Komponenten des heterodimeren Interleukin 23 Komplexes	3
1.2.1	Interleukin 23	3
1.2.2	Struktureller Aufbau der Zytokinuntereinheit p19	3
1.2.3	Die lösliche α -Rezeptoruntereinheit p40	5
1.3	Rezeptoren des Zytokins IL-23	6
1.3.1	Klasse I Zytokinrezeptoren	6
1.3.2	Strukturelle Eigenschaften des IL-23R	7
1.3.3	Strukturelle Eigenschaften des IL-12R β 1	8
1.4	Postuliertes Bindungsparadigma des IL-23 Rezeptorkomplexes	10
1.4.1	<i>Site I</i> Interaktion von p19 mit p40	11
1.4.2	<i>Site II</i> Interaktion von p19 mit IL-12R β 1	12
1.4.3	<i>Site III</i> Interaktion von p19 mit IL-23R	14
1.5	IL-23 induzierte Signaltransduktion: Aktivierung des IL-23 Rezeptorkomplexes	14
1.5.1	Signalweiterleitung des IL-23 Rezeptorkomplexes	15
1.6	IL-23 vermittelte Immunantwort	18
1.6.1	Entwicklung naiver T-Zellen	19
1.6.2	Entwicklung von Effektorzellen	20
1.6.3	Differenzierung von TH17-Zellen	20
1.6.4	Unterschiede der murinen und humanen TH17-Zelldifferenzierung	22
1.7	Die Bedeutung von IL-23 in Autoimmunerkrankungen	23
<u>2</u>	<u>ZIELSETZUNG</u>	<u>25</u>
<u>3</u>	<u>PUBLIKATION 1</u>	<u>27</u>
<u>4</u>	<u>PUBLIKATION 2</u>	<u>28</u>
<u>5</u>	<u>PUBLIKATION 3</u>	<u>29</u>
<u>6</u>	<u>PUBLIKATION 4</u>	<u>30</u>
<u>7</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>31</u>

7.1	Charakterisierung der <i>site I</i> relevanten Aminosäuren in p19	32
7.2	Charakterisierung der <i>site I</i> relevanten Aminosäuren in p40	34
7.2.1	Interaktion von p40 mit p19	34
7.2.2	Interaktion von p40 mit p35	36
7.3	Charakterisierung der <i>site II</i> Interaktion von p19 mit IL-12Rβ1	37
7.4	Charakterisierung der <i>site III</i> Interaktion von p19 mit IL-23R	39
7.5	Aktivierung eines homodimeren IL-23R Komplexes durch p40_D2D3-p19Fc	42
7.6	Kritische Tyrosinreste des IL-23R zur STAT3 Rekrutierung.....	45
7.7	IL-23 abhängige STAT1 Aktivierung	47
7.8	Identifizierung eines nicht-kanonischen Aktivierungsmotivs für STAT3	48
7.9	IL-23 vermittelte Aktivierung von Erk1/2 und Akt	49
7.10	Charakterisierung der Bindung von Jak2 mit IL-23R	51
7.11	Assoziation der Januskinase Tyk2 mit IL-12Rβ1	52
7.12	IL-23 induzierte Rolle Tyk2-bindender Motive des IL-12Rβ1	53
8	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>57</u>
9	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>71</u>
10	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>74</u>
11	<u>DANKSAGUNG.....</u>	<u>75</u>
12	<u>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</u>	<u>77</u>

Zusammenfassung

Das proinflammatorische Zytokin Interleukin 23 (IL-23) ist an der Differenzierung und Expansion von IL-17 produzierenden CD4⁺ T-Helfer (TH17) -Zellen beteiligt und daher mit der Pathogenese inflammatorischer Autoimmunerkrankungen wie multipler Sklerose (MS) oder rheumatoider Arthritis (RA) verknüpft. Das heterodimere Zytokin setzt sich aus der Zytokinuntereinheit p19 und der löslichen α -Rezeptoruntereinheit p40 zusammen und signalisiert über die Rezeptorketten IL-12 Rezeptor β 1 (IL-12R β 1) und IL-23 Rezeptor (IL-23R). Hierbei werden die Jak-STAT, MAPK und PI3K Signalwege aktiviert.

Der IL-23 Rezeptorkomplex umfasst vier Interaktionspartner, wobei vermutet wird, dass diese dem architektonischen *site I-II-III* Paradigma zur Signaltransduktion folgen. *Site I* von p19 wird für die Bindung zu p40 benötigt, wohingegen *site II* und *site III* von p19 die Bindung zu IL-12R β 1 und IL-23R vermitteln sollen.

Der erste Teil dieser Doktorarbeit befasst sich mit der Identifizierung kritischer Aminosäuren und Proteindomänen der Interaktionspartner zur Vermittlung der IL-23•IL-23R•IL-12R β 1 Komplexbildung. Die klassischen Interaktionsflächen der *site I* und *site III* wurden charakterisiert und Aminosäuren identifiziert, die für diese Interaktionen verantwortlich sind (*site I*: p19_I176/A178/R179, p40_Y265/Y318; *site III*: p19_W157). Die klassische Definition einer *site II* vermittelten Interaktion zwischen p19 und IL-12R β 1 wurde hingegen ausgeschlossen. Stattdessen wird die Interaktion von IL-23 und IL-12R β 1 durch die p40 Domänen D1 und D2 und die Zytokinrezeptor-Homologie-Region (ZHR) von IL-12R β 1 vermittelt (nicht-kanonische *site II*: IL-12R β 1_Y143R/V116_L117_S118).

Neben seiner Rolle als IL-23 Untereinheit wird p40 ebenfalls von IL-12 (p35/p40) genutzt. Die Bildung beider Zytokine schließt eine *site I* vermittelte Disulfidbrücke ein. Der zweite Teil untersucht die Rolle dieser Interaktion für IL-12 und zeigt deren Entbehrlichkeit für die biologische Aktivität. Außerdem wurde gezeigt, dass die Mutation von p40_C197 die Bildung des antagonistischen p40 Homodimers verhindert.

Der dritte Teil dieser Arbeit betrachtet die Rolle vorausgesagter Tyrosinreste für die Aktivierung der IL-23 aktivierten Signalwege. Neben kanonischen Y-Motiven wurde eine nicht-kanonische Sequenz (L554-Q570) innerhalb des murinen IL-23R identifiziert, die eine Rolle bei der Aktivierung von STAT3 übernimmt.

Die Aktivierung der Signalwege erfordert die initiale Aktivierung von Rezeptor-assoziierten Januskinasen (Jaks). IL-23R bindet Jak2, wohingegen IL-12R β 1 mit der Tyrosinkinase Tyk2

interagiert. Die Assoziierung von Jaks erfolgt über die sogenannten Box 1 und Box 2 Motive innerhalb der intrazellulären Rezeptorketten. Der vierte Teil dieser Arbeit zeigt, dass die Interaktion von Tyk2 mit IL-12R β 1 vorwiegend über Box 1 und in geringem Umfang über Box 2 vermittelt wird. Für Jak2 wurde hingegen eine untypische Bindungsstelle im murinen IL-23R identifiziert (E455-E479).

Diese Doktorarbeit analysiert die kritischen extrazellulären Komponenten für die Bildung des IL-23 Rezeptorkomplexes, sowie die relevanten intrazellulären Bereiche für die effiziente Signalweiterleitung.

Zusammenfassung in Englisch

Interleukin 23 (IL-23) is involved in the differentiation and expansion of IL-17-producing CD4⁺ T helper (TH17) cells and linked to the pathogenesis of inflammatory autoimmune diseases like multiple sclerosis (MS) or rheumatoid arthritis (RA). The heterodimeric cytokine, composed of the cytokine subunit p19 and the soluble α receptor subunit p40 signals through the receptor chains IL-12 receptor β 1 (IL-12R β 1) and IL-23 receptor (IL-23R) by activating the Jak-STAT, MAPK and PI3K signaling pathways.

The IL-23 receptor complex comprises four interaction partners. It is considered that they are following the site I-II-III architectural paradigm for signal transduction. Site I of p19 is required for binding to p40, whereas site II and site III of p19 were suggested to mediate binding to IL-12R β 1 and IL-23R. The first part of the thesis deals with the identification of critical amino acids and protein domains of the interaction partners to mediate IL-23•IL-23R•IL-12R β 1 complex formation. The classical site I and III interfaces were defined and amino acids responsible for these interactions have been identified (site I: p19_I176/A178/R179, p40_Y265/Y318; site III: p19_W157). However, the classical definition of a site II mediated interaction between p19 and IL-12R β 1 was excluded. Instead interaction of IL-23 and IL-12R β 1 is mediated by the p40 domains D1 and D2 and the cytokine homology region (CHR) of IL-12R β 1 (non-canonical site II: IL-12R β 1_Y143R/V116_L117_S118).

Besides its role as IL-23 subunit p40 is also shared by IL-12 (p35/p40). The formation of both cytokines includes a site I mediated disulfide bond. The second part investigated the role of this interaction for IL-12 and showed its dispensability for biological activity. Further it was shown that mutation of p40_C197 prevents the formation of antagonistic p40 homodimers.

The third part of this work is focused on the role of predicted tyrosine residues for the activation of the IL-23 activated signal transduction pathways. Beside canonical tyrosine motifs a non-canonical sequence (L554-Q570) within the murine IL-23R with importance for STAT3 activation was identified.

The activation of signal transduction requires the initial activation of receptor-associated Janus kinases (Jaks). IL-23R is reported to bind Jak2 whereas IL-12R β 1 interacts with the tyrosine kinase Tyk2. Association of Jaks is thought to be mediated via so-called Box 1 and Box 2 motifs within the intracellular receptor chains. The fourth part of the thesis showed that

Tyk2 interaction with IL-12R β 1 is primarily mediated via Box 1 and to a lesser extent by Box 2. However, an uncommon binding site for Jak2 within the murine IL-23R was identified (E455-E479).

In brief, this doctoral thesis analyzes the critical extracellular components for the formation of the IL-23 receptor complex as well as the relevant intracellular parts for efficient signal transduction.

1 Einleitung

1.1 Einteilung der Zytokine

Zytokine sind lösliche Polypeptide, welche als wichtige Mediatoren der interzellulären Kommunikation regulatorische Funktionen bezüglich biologischer Prozesse wie z.B. Proliferation, Differenzierung, Immunantwort oder Entzündungsreaktionen übernehmen [1,2]. Diese Peptide weisen sowohl pleiotrope als auch redundante Eigenschaften auf und werden gemäß ihrer biologischen Effekte in verschiedene Untergruppen eingeteilt [1].

Hierzu werden neben den Kolonie-stimulierenden Faktoren (*colony-stimulating factors*, CSF), Tumornekrosefaktoren (*tumor necrosis factors*, TNF), Chemokinen und Interferonen (IFN) ebenso die Interleukine (IL) gezählt [3]. Bedingt durch ihre Faltungstopologie werden Zytokine weiterhin in helikale Zytokine, die trimere TNF Familie, Cysteinknoten Wachstumsfaktoren und β -*Trefoil* Wachstumsfaktoren unterschieden.

Die Klassifizierung ihrer Rezeptoren erfolgt aufgrund gemeinsamer struktureller Eigenschaften in Chemokinrezeptoren, Klasse I und II Zytokinrezeptoren, Tyrosinkinaserzeptoren, TNF Rezeptoren sowie IL-1 Rezeptoren (IL-1R) [4].

1.1.1 Zytokine der Interleukin 12 (IL-12) Familie

Sowohl die Interleukin 6 (IL-6) als auch die IL-12 Familie repräsentieren klassische Vertreter der Klasse I Zytokine, welche aus strukturell verwandten Vier-Helix-Bündel Proteinen aufgebaut sind [5]. Zu der IL-12 Familie werden derzeit vier Mitglieder gezählt (IL-12, IL-23, IL-27, IL-35), wobei IL-12 und IL-23 proinflammatorische und IL-27 sowie IL-35 antiinflammatorische Eigenschaften aufweisen.

Die Interleukine lassen sich weiterhin aufgrund gemeinsamer struktureller Eigenschaften gruppieren, die sich durch die Verwendung identischer Zytokinuntereinheiten und Rezeptoren charakterisieren. Die Mitglieder der IL-12 Familie bilden heterodimere Komplexe, wobei die α -Untereinheiten (p19, p28, p35) mit zwei möglichen β -Untereinheiten (p40; *Epstein-Barr virus-induced gene 3 protein* (EBI-3)) dimerisieren (siehe Abbildung 1) [5].

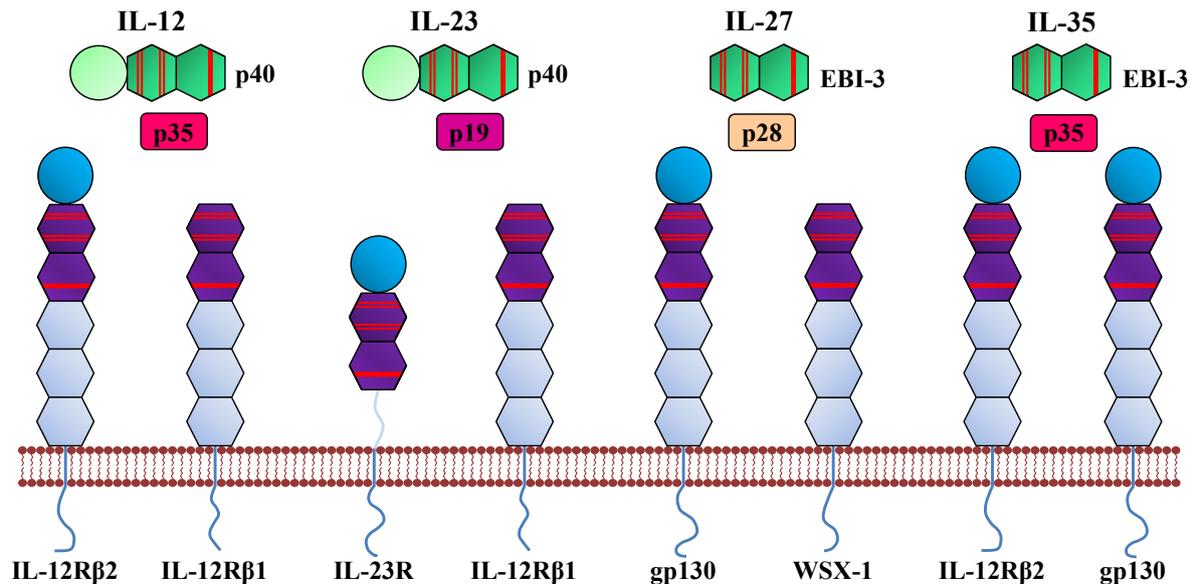


Abbildung 1: Architektur der IL-12 Familie.

Das Heterodimer IL-12 besteht aus p35 und p40 und vermittelt die intrazelluläre Signalkaskade über die Rezeptoren IL-12Rβ2 und IL-12Rβ1 [6,7]. IL-23 setzt sich aus p19 und p40 zusammen und signalisiert über IL-23R und IL-12Rβ1, wohingegen IL-27 aus den Untereinheiten p28 und EBI-3 gebildet wird [8-10]. IL-27 bindet die Rezeptoren WSX-1 und gp130 [11]. P35 und EBI-3 bilden das Zytokin IL-35, welches die Signaltransduktion über IL-12Rβ2 und gp130 induziert [12,13]. Ig-ähnliche Domänen werden durch Kreise symbolisiert und Sechsecke repräsentieren Fibronectin Typ III Domänen. Konservierte Cysteinpaare werden durch doppelte rote Linien und das Motiv WSXWS wird durch rote Balken dargestellt. Die Darstellung ist modifiziert nach Vignali *et al.* und Langrish *et al.* [12,14,15].

IL-12 und IL-23 verfügen über die lösliche β -Untereinheit p40, welche in IL-12 mit p35 und in IL-23 mit p19 interagiert [6,8]. Die α -Untereinheit p35 wird sowohl von IL-12 als auch von IL-35 genutzt, wobei die Heterodimerisierung bei IL-35 mit der β -Untereinheit EBI-3 erfolgt [6,12]. EBI-3 interagiert ebenfalls mit der α -Untereinheit p28 zur Bildung von IL-27 (siehe Abbildung 1) [10].

Auch die Liganden-induzierte Signalweiterleitung der IL-12 Heterodimere erfolgt teilweise mittels analoger Rezeptoren. So signalisiert IL-12 über den IL-12 Rezeptor β 1 (IL-12Rβ1) und den IL-12 Rezeptor β 2 (IL-12Rβ2), wohingegen IL-23 sowohl IL-12Rβ1 als auch den IL-23 Rezeptor (IL-23R) rekrutiert [7,9]. Im Gegensatz hierzu bindet IL-27 die Rezeptoren gp130 (Glykoprotein 130) und WSX-1 [11]. Zur Signalweiterleitung nutzt IL-35 die Rezeptoren gp130, IL-12Rβ2 sowie Homodimere dieser Rezeptoren, wobei in B-Zellen ebenfalls die Verwendung von IL-12Rβ2 und WSX-1 beschrieben wurde [13,16].

Nach Aktivierung intrazellulärer Januskinasen (Jaks) rekrutieren die Rezeptoren verschiedene Spektren an *signal transducers and activators of transcription* (STAT) Molekülen [14]. IL-12 und IL-23 phosphorylieren STAT1, -3, -4 und -5, wobei IL-12 hauptsächlich STAT4 und IL-23 STAT3 rekrutiert [9]. Dahingegen wird die biologische Aktivität von IL-27

vorwiegend über STAT1 und STAT3 vermittelt, jedoch erfolgt ebenfalls die Rekrutierung von STAT2 und STAT5 [13,17,18]. IL-35 vermittelt die Signaltransduktion über die Phosphorylierung von STAT1, -3 und -4 [13,16].

1.2 Komponenten des heterodimeren Interleukin 23 Komplexes

1.2.1 Interleukin 23

IL-23 ist ein binärer Komplex der Klasse I Zytokine, welchem eine Schlüsselrolle in der Pathogenese entzündlicher Autoimmunerkrankungen zugeordnet wird [15]. Die Expression dieses Zytokins erfolgt durch aktivierte Monozyten, Makrophagen, dendritische und endotheliale Zellen sowie T- und B-Zellen [8,19]. Die Interaktion zwischen den monomeren Untereinheiten p40 und p19 mit den zugehörigen Rezeptoren (IL-12R β 1/IL-23R) resultiert in einem biologisch aktiven Komplex, wobei die Heterodimerisierung von p19 und p40 die Synthese beider Untereinheiten innerhalb derselben Zelle erfordert [8,9].

IL-23R wird hauptsächlich von T-Zellen, aber auch von B-Zellen sowie lymphoiden Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert. Die Expression von IL-12R β 1 erfolgt dagegen hauptsächlich in natürlichen Killerzellen (NK), aber auch in T-Zellen und in geringen Mengen in B-Zellen und Monozyten [20].

1.2.2 Struktureller Aufbau der Zytokinuntereinheit p19

Die IL-23 Untereinheit p19 wurde erstmals im Jahr 2000 von Oppmann *et al.* als Ergebnis einer sequenzbasierten Datenanalyse zur Identifikation von IL-6 verwandten Zytokinen beschrieben. P19 enthält 5 Cysteinreste, keine Glykosylierungsstellen und die cDNA Sequenz codiert im humanen Molekül (UniProtKB: Q9NPF7) für 189 Aminosäuren (UniProtKB-Angaben schließen das Signalpeptid ein). Das kalkulierte Molekulargewicht beträgt im humanen p19 20,73 kDa, wohingegen das murine Molekül (UniProtKB: Q9EQ14) mit 196 Aminosäuren über ein kalkuliertes Molekulargewicht von 22,07 kDa verfügt [8].

Obwohl die IL-23 Untereinheit p19 nur eine geringe Sequenzähnlichkeit zu den übrigen Mitgliedern der IL-12 Familie aufweist, nimmt sie ebenfalls die sogenannte Vier-Helix-Bündel Faltungstopologie ein (siehe Abbildung 2) [5,8].

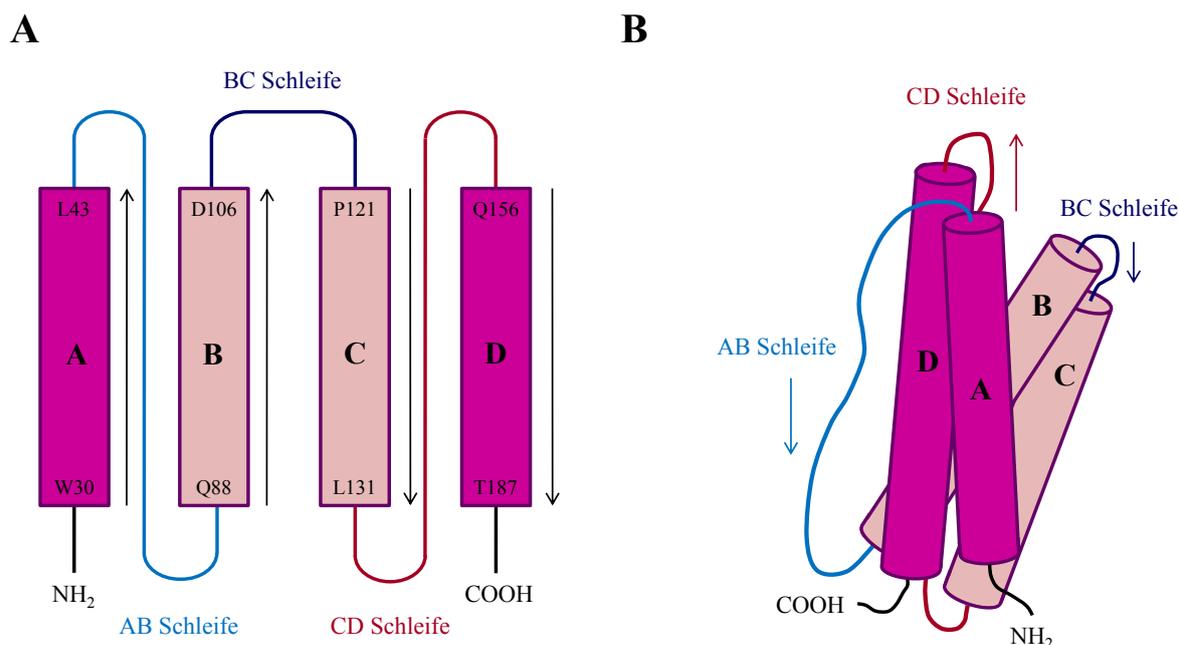


Abbildung 2: Vier-Helix-Bündel Topologie der Zytokinuntereinheit p19.

A) P19 besteht aus vier α -Helices, die in der Orientierung auf-auf-ab-ab angeordnet sind [8,21]. Die Helices werden durch drei Schleifen unterschiedlicher Länge verknüpft [22]. Die Abbildung ist modifiziert nach Grötzinger [22]. **B)** Schematische Darstellung der Faltung von Vier-Helix-Bündeln nach dem Vorbild des porcinen Wachstumsfaktors Methionyl-Somatotropin (*methionyl porcine somatotropin*, MPS) [8,23]. Die Abbildung ist modifiziert nach Bazan [24].

Die größte Homologie zeigt p19 innerhalb der IL-12 Familie zu p35 (25%) [5]. P19 und p35 verfügen auch über ein vergleichbares Interaktionsmuster zu ihren β -Untereinheiten wie IL-6 zu dem IL-6 Rezeptor (IL-6R) α , weshalb diese α -Untereinheiten auch als Zytokinuntereinheiten bezeichnet werden [5,8].

Die Vier-Helix-Bündel Zytokine werden in zwei Untergruppen differenziert, wobei die sogenannten Klasse I Zytokine in einem Bündel aus vier dicht gepackten Helices falten und die Klasse II Zytokine mehr als vier Helices enthalten [21,25,26].

Die Tertiärstruktur von p19 besteht aus vier amphipathischen α -Helices, wobei die hydrophilen Bereiche nach außen gerichtet sind [4]. Die hydrophoben Regionen bestimmen den Kern der Struktur, so dass die Helices sich in einer sogenannten stereotypischen auf-auf-ab-ab Orientierung ausrichten, welche das Resultat einer antiparallelen Anordnung konsekutiver Helixpaare ist [4,21]. Die Helices werden hierbei durch Schleifen unterschiedlicher Länge in der Reihenfolge lang-kurz-lang miteinander verknüpft [22].

Aus diesem Grund wird p19 zur Klasse I der Zytokine gezählt, wobei diese weiterhin in kurz- und langkettige Zytokine unterteilt werden. Kurzkettige Zytokine überschreiten nicht mehr als 160 Aminosäuren, wohingegen langkettige Zytokine typischerweise 170 bis 250

Aminosäuren umfassen [21]. Vor diesem Hintergrund wird p19 den langkettigen Zytokinen zugeordnet.

1.2.3 Die lösliche α -Rezeptoruntereinheit p40

Die humane p40 Untereinheit (UniProtKB: P29460) verfügt mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 37,17 kDa über 328 Aminosäuren und besitzt 4 potentielle N-Glykosylierungsstellen, sowie eine C-Mannose Modifikation [6,27,28]. Im Gegensatz hierzu weist das murine Molekül 335 Aminosäuren mit fünf potentiell glykosylierbaren N-Resten auf und besitzt ein kalkuliertes Molekulargewicht von 38,24 kDa (UniProtKB: P43432) [29].

Die lösliche p40 Untereinheit, welche sowohl einen Bestandteil von IL-12 als auch von IL-23 darstellt, zeigt keine strukturelle Verwandtschaft zu den kanonisch helikalen Klasse I Zytokinen [27,30].

Vielmehr charakterisiert sich diese Untereinheit aufgrund ihrer drei Domänen aus β -Faltblättern [30]. P40 besitzt eine homologe Primärstruktur zu den extrazellulären Domänen der Klasse I Zytokinrezeptoren, z.B. der IL-6R α Kette oder dem ziliären neurotrophen Faktor Rezeptor (*ciliary neurotrophic factor receptor*, CNTFR) [27,30,31]. Häufig werden diese Rezeptoren auch ohne Transmembrandomäne und zytosolische Domäne von den Zellen in löslicher Form freigesetzt, weshalb p40 ebenfalls als lösliche α -Rezeptoruntereinheit beschrieben wird [30]. In Analogie zu diesen Rezeptoren weist p40 eine N-terminale Immunglobulin (Ig) -ähnliche Domäne auf, welche eine S-Typ Anordnung einnimmt [30,32]. Die sieben antiparallelen β -Stränge bilden hierbei eine fassähnliche Struktur, deren zwei β -Faltblätter aus drei und vier Strängen in sandwichförmiger Orientierung bestehen. Im Gegensatz zum klassischen S-Typ ist jedoch der A-Strang Teil eines viersträngigen Faltblattes (A, B, E, D), wohingegen die Helices C, F und G das dreisträngige Faltblatt bilden [30]. Die Domäne D1 wird in annähernd orthogonaler Ausrichtung C-terminal mit zwei Fibronektindomänen (Domänen D2 und D3) des Strukturtyps III (FN-III) verknüpft, welche für die Zytokinbindung verantwortlich sind [5,30,33]. Die FN-III Domänen falten ebenfalls in der Topologie der Ig-ähnlichen Faltungen, da hier die sieben antiparallelen β -Stränge zwei Faltblätter aus den Helices A, B und E sowie C, D, F und G in sandwichförmiger Anordnung orientieren [34].

Die Domäne D2 weist vier konservierte Cysteinreste auf, die über intersträngige Disulfidbrücken die Stränge A und B (human: C131-142, murin: C128-C139) sowie D und E

(human: C170-C193, murin: C167-C191) miteinander verknüpfen. Außerdem besitzt die Domäne D2 eine N-verknüpfte Zuckermodifikation zweier N-Acetylglucosaminmoleküle mit Mannose, welche die relative Orientierung zu der Domäne D1 mittels Wasserstoffbindungen und Van-der-Waals Kontakten stabilisiert [30]. Der G-Strang der Domäne D3 enthält die Konsensussequenz WSXWS (human p40: WSEWA, murin: CSKWA), wobei X einer nicht konservierten Aminosäure entspricht (siehe Abbildung 3) [29,33].

Die Interaktion von p40 mit p19 oder p35 erfolgt in verschiedenen Bindungsprofilen, in welchen die Zytokinuntereinheiten unterschiedliche Orientierungen relativ zur p40 Bindungstasche einnehmen [33]. Diese Bindungstasche nimmt die Form eines „vulkanähnlichen“ Kraters mit hydrophober Oberfläche im Übergangsbereich der beiden FN-III Domänen ein. Das humane D322 (murin: D316) liegt in der Basis der Bindungstasche und eine periphere Gruppe apolarer und Hydrogen-bindender Aminosäurereste umgibt den Krater als Ring von *Peaks* (z.B.: R230, S267, E203, R313) [33]. Außerdem ist p40 in der Lage Homodimere zu bilden und wurde auch als Interaktionspartner des *cluster of differentiation 5 antigen like protein* (CD5L) gezeigt [35,36].

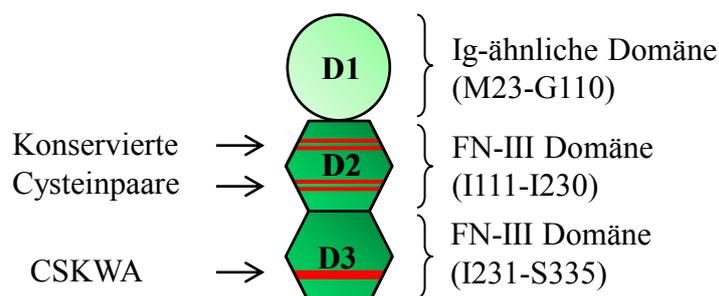


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänen der löslichen murinen α-Rezeptoruntereinheit p40. Die N-terminale Ig-ähnliche Domäne D1 wird durch einen Kreis dargestellt, die FN-III Domänen D2 und D3 werden durch Sechsecke repräsentiert. Konservierte Cysteinpaare der Domäne D2 sind durch doppelte rote Linien dargestellt. Das Motiv CSKWA in der Domäne D3 wird durch einen roten Balken symbolisiert. Domänenbegrenzende Aminosäureangaben sind dem Model in Publikation 1 (siehe Kapitel 3) entnommen. Die Darstellung ist modifiziert nach Langrish *et al.* [15].

1.3 Rezeptoren des Zytokins IL-23

1.3.1 Klasse I Zytokinrezeptoren

Bei Zytokinrezeptoren handelt es sich um Typ I Transmembranproteine, welche extrazelluläre Signale nach Bindung ihrer Liganden ins Zellinnere weiterleiten. Die N-terminalen Rezeptordomänen ragen hierbei in den extrazellulären Bereich, wohingegen der C-Terminus intrazellulär orientiert ist [22]. Sämtliche Rezeptoren der IL-12 Familie werden

den Zytokinrezeptoren der Klasse I zugeordnet, die ebenso wie die Klasse II Rezeptoren Zytokine mit einer Vier-Helix-Bündel Faltungstopologie binden [37]. Die Klasse I Rezeptoren weisen nicht nur eine geringfügige Sequenzhomologie auf, sondern variieren auch hinsichtlich ihrer Topologie [34,38].

Die modulare Architektur der glykosylierten, extrazellulären Domäne umfasst einen Bereich von 200 Aminosäuren, welcher für die Ligandeninteraktion erforderlich ist und als Zytokinrezeptor-Homologie-Region (ZHR) bezeichnet wird [34,39]. Dieser Bereich setzt sich aus zwei FN-III Domänen mit sieben β -Strängen antiparalleler Faltung zusammen, welche über eine *Hinge*-Region zu einer fassähnlichen Struktur miteinander verknüpft werden. Die Membran-distale Domäne verfügt, wie p40, über ein charakteristisches Muster aus vier konservierten Cysteinresten und dem WSXWS Motiv im C-terminalen Bereich der Membran-proximalen Domäne [34,40]. Die β -Faltblatt-verknüpfenden Schleifen der FN-III Domänen der ZHR ermöglichen den spezifischen Kontakt zum Liganden [34].

Die extrazelluläre Domäne wird über ein hydrophobes Segment von 20-26 Aminosäuren, der Transmembrandomäne, mit der zytoplasmatischen Domäne verknüpft [22].

1.3.2 Strukturelle Eigenschaften des IL-23R

Der IL-23R gehört zu den Zytokinrezeptoren der Klasse I und wird dabei der zweiten Untergruppe zugeordnet, wobei sich diese Gruppe über weitere Elemente wie einer zusätzlichen N-terminalen Ig-ähnlichen Domäne und/oder FN-III Modulen zwischen ihrer ZHR und der Transmembrandomäne auszeichnet (siehe Abbildung 4) [37]. Die Sequenz des humanen Proteins (UniProtKB: Q5VWK5) besteht aus 629 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 71,72 kDa und verfügt darüber hinaus über sieben potentielle N-Glykosylierungsstellen [9]. Der murine Rezeptor (UniProtKB: Q8K4B4) besitzt dagegen acht potentiell glykosylierbare N-Reste, eine Sequenzlänge von 644 Aminosäuren und ein kalkuliertes Molekulargewicht von 73,45 kDa. Außerdem zeigt dieser Rezeptor die größte Homologie innerhalb der Klasse I Zytokinrezeptoren zu gp130 und IL-12R β 2.

Die extrazelluläre Domäne des IL-23R verfügt neben den zwei Zytokinrezeptordomänen der ZHR über eine N-terminale Ig-ähnliche Domäne (siehe Abbildung 4). Die ZHR Domänen beinhalten ebenfalls charakteristische konservierte Cysteinreste und sowohl das murine als auch das humane Rezeptormolekül weisen die Zytokinrezeptorsignatur WQPWS auf, welche mit dem WSXWS Motiv vergleichbar ist. Außerdem besitzt die murine Sequenz eine Duplikation von 20 Aminosäuren, die dieses Motiv ebenfalls enthält [9].

Die extrazellulären Rezeptordomänen werden über eine lange Peptidkette, welche auch als *Stalk* Region bezeichnet wird, mit der Transmembrandomäne verknüpft [5,9,41]. Darüber hinaus verfügt dieser Rezeptor über eine einzelne Transmembrandomäne sowie über eine C-terminale zytoplasmatische Region [9]. Der humane intrazelluläre Bereich setzt sich aus 252 Aminosäuren zusammen, wohingegen die murine Sequenz 247 Aminosäuren aufweist. Der humane Rezeptor verfügt dabei über sieben Tyrosinreste, wobei mit Ausnahme von Y463 sechs davon im murinen Protein konserviert sind. Zusätzlich besitzt die intrazelluläre murine Struktur den nicht konservierten Aminosäurerest Y542. Drei dieser Tyrosinreste (human: Y397, Y484, Y611; murin: Y416, Y504, Y626) werden hierbei als potentielle Bindungsstellen für *steroid receptor co-activator homology 2* (SH2) Domänen betrachtet [9].

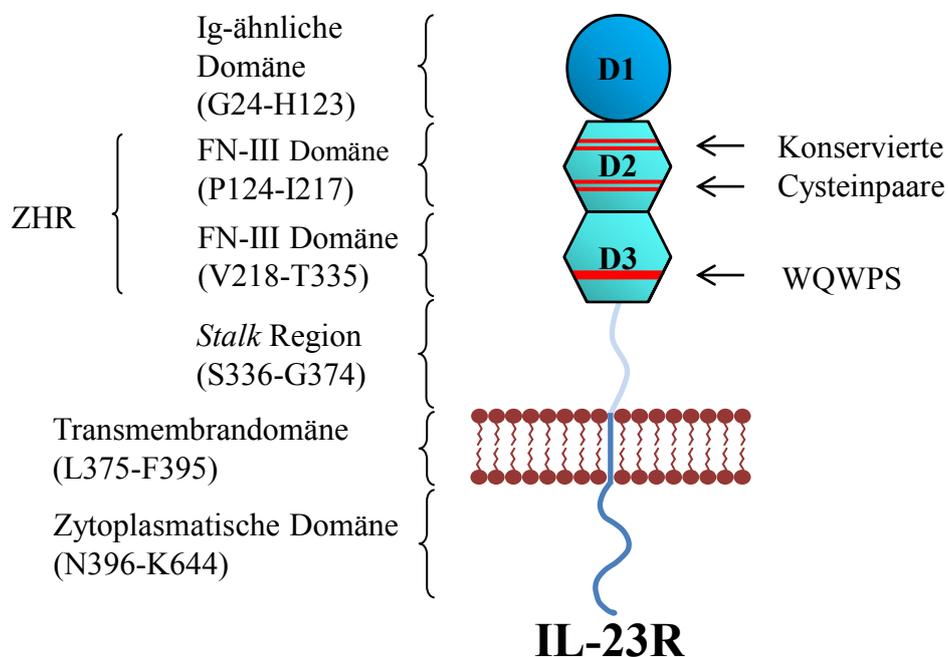


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Domänen des murinen IL-23 Rezeptors.

Die N-terminale Ig-ähnliche Domäne D1 wird durch einen Kreis dargestellt, die Sechsecke repräsentieren die FN-III Domänen (D2, D3) der ZHR. Konservierte Cysteinpaare in Domäne D2 werden durch doppelte rote Linien dargestellt. Das Motiv WQWPS in Domäne D3 wird durch einen roten Balken symbolisiert. Domänenbegrenzende Aminosäureangaben entsprechen dem in Publikation 1 (siehe Kapitel 3) verwendeten Model. Die Abbildung ist modifiziert nach Langrish *et al.* [15].

1.3.3 Strukturelle Eigenschaften des IL-12R β 1

Auch der zweite IL-23 bindende Rezeptor, welcher als IL-12R β 1 bezeichnet wird, zählt zu den Klasse I Zytokinrezeptoren der Untergruppe 2 [5,37]. Dieses Molekül weist in der humanen Sequenz (UniProtKB: P42701) eine Länge von 662 Aminosäuren und ein kalkuliertes Molekulargewicht von 73,11 kDa auf [42]. Der murine Rezeptor (UniProtKB:

Q60837) verfügt mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 81,79 kDa über 738 Aminosäuren [43]. Die humane extrazelluläre Domäne enthält 6 potentiell glykosylierbare N-Reste, welche im murinen Molekül konserviert sind [42,43]. Das murine Molekül besitzt außerdem sieben zusätzliche potentielle N-Glykosylierungsstellen [43]. Weiterhin zeigt der Rezeptor eine enge Verwandtschaft zu gp130, dem Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor Rezeptor (*granulocyte-colony stimulating factor receptor*, G-CSFR) sowie dem leukämischen inhibitorischen Faktor Rezeptor (LIFR) [42].

Im Gegensatz zu gp130 besitzt IL-12R β 1 jedoch keine Ig-ähnliche Domäne, so dass die Signalsequenz eine direkte C-terminale Verknüpfung mit fünf FN-III Domänen erhält (siehe Abbildung 5) [42,44]. Die ersten beiden N-terminal orientierten FN-III Domänen weisen hierbei die typischen Charakteristika der ZHR auf. Die Domäne D1 enthält zwei konservierte Cysteinpaare (human: C52-C62, C80-C87; murin: C53-C63, C81-C95), wohingegen die Domäne D2 das charakteristische WSXWS Motiv (human: X=K, murin: X=D) besitzt [42,43].

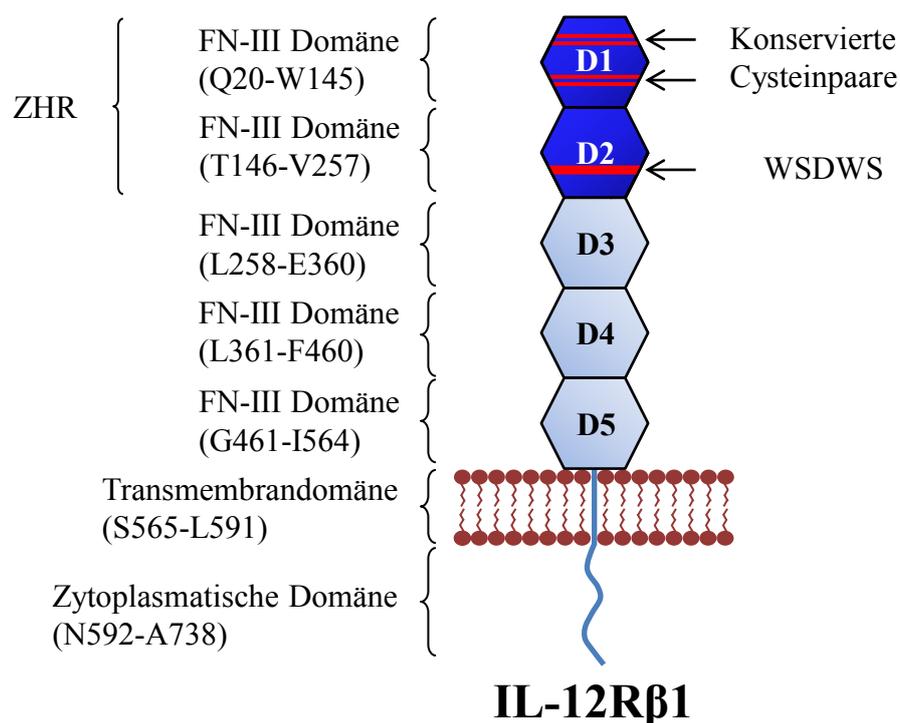


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Domänen des murinen Rezeptors IL-12R β 1.

Die Sechsecke stellen die FN-III Domänen (D1-D5) dar. Konservierte Cysteinpaare in der Domäne D1 der ZHR werden durch doppelte rote Linien repräsentiert und das Motiv WSXWS in Domäne D2 der ZHR wird durch einen roten Balken dargestellt. Domänenbegrenzende Angaben der Aminosäuren entsprechen dem in Publikation 1 (siehe Kapitel 3) verwendeten Modell. Die Darstellung ist modifiziert nach Langrish *et al.* [15].

Die extrazelluläre murine Domäne wird über die Transmembranregion mit einer intrazellulären Domäne von 147 Aminosäuren (human: 91 Aminosäuren) verknüpft. Im Gegensatz zu IL-23R weist diese verhältnismäßig kurze Region lediglich im murinen Rezeptor einen Tyrosinrest (Y635) auf und zeigt außerdem die Präsenz sogenannter Box 1 und Box 2 Motive, welche in der humanen und murinen Sequenz konserviert vorliegen [42,43]. Diese Sequenzen ermöglichen wahrscheinlich die Assoziation mit Jaks, wobei Box 1 ein prolinreiches Motiv aus 6 bis 10 Aminosäuren bildet und unmittelbar im C-terminalen Bereich der Transmembrandomäne lokalisiert ist [42,45]. Das zweite Motiv Box 2 ist bislang nicht eindeutig definiert, weist jedoch überwiegend hydrophobe Aminosäuren auf [42,45].

1.4 Postuliertes Bindungsparadigma des IL-23 Rezeptorkomplexes

Basierend auf der Kristallstruktur von IL-6 in Komplex mit IL-6R α und den beiden signaltransduzierenden gp130 Rezeptoren, wird für die Mitglieder der IL-12 Familie ein Interaktionsmodell postuliert, welches als *site I-II-III* Paradigma bezeichnet wird [5,31].

Bei diesem Modell handelt es sich um eine Erweiterung des *site I-II* Paradigmas für das humane Wachstumshormon (*growth hormone*, GH), welches zunächst einen Rezeptor (*growth hormone receptor*, GHR) über die sogenannte *site I* bindet, und im nächsten Schritt ein identisches GHR Molekül über die *site II* rekrutiert [46,47].

Für die Interaktionen der IL-6 Familie wird das α -helikale Zytokin bzw. die α -Untereinheit der heterodimeren Zytokine der IL-12 Familie als Zentrum der oligomeren Komplexe betrachtet [5]. Die Wechselwirkungen mit den Rezeptoren erfolgen über drei konservierte Bereiche (*site I*, *II* und *III*). Während IL-6 mit IL-6R α über die sogenannte *site I* interagiert, übernimmt die strukturell verwandte β -Untereinheit der IL-12 Familie (p40, EBI-3) die Funktion des IL-6R α und bindet die Zytokinuntereinheit. Das Dimer bindet anschließend die ZHR einer Rezeptorkette über die *site II*, die auf der gegenüberliegenden Seite der helikalen Komponente lokalisiert ist. *Site III* wird dagegen als Interaktionsfläche zwischen der Zytokinuntereinheit und der N-terminalen Ig-ähnlichen Domäne der zweiten Rezeptorkette vorausgesagt. Bei den Vertretern der IL-12 Familie werden *site II* und *site III* Interaktionen über zwei unabhängige Rezeptorketten ausgebildet, wie z.B. bei IL-23 über die Rezeptoren IL-12R β 1 und IL-23R (siehe Abbildung 6) [5].

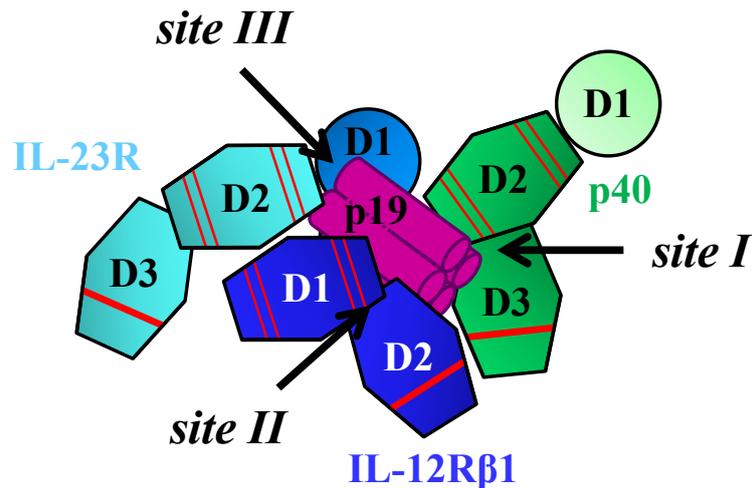


Abbildung 6: Postuliertes *site I-II-III* Paradigma des heterodimeren Zytokins IL-23.

Im Zentrum der Interaktionen bildet die Zytokinuntereinheit p19 mit p40 *site I*. *Site II* entsteht durch die Wechselwirkung von p19 mit der ZHR von IL-12R β 1 und die Interaktion von p19 mit der Ig-ähnlichen Domäne von IL-23R formt *site III* [5]. Die Ig-ähnlichen Domänen von p40 und IL-23R werden durch Kreise dargestellt. Sechsecke repräsentieren die FN-III Domänen der ZHR von p40, IL-23R und IL-12R β 1. Die Darstellung ist modifiziert nach Vignali *et al.* [14].

1.4.1 *Site I* Interaktion von p19 mit p40

Gemäß des Paradigmas steht die Zytokinuntereinheit p19 des dimeren IL-23 im Zentrum der Interaktionen, wobei *site I* über die Wechselwirkung von p19 mit der löslichen α -Rezeptoruntereinheit p40 gebildet wird [5,33].

In der Kristallstruktur von IL-23 interagieren die Schleifen 1 und 3 der p40 Domäne D2 sowie die Schleifen 5 und 6 der Domäne D3 mit den Helices A und D von p19 sowie der C-terminalen Hälfte der p19 AB-Schleife [33]. Im humanen Molekül wird die Interaktion von p19 vorwiegend über die Aminosäure R178 (murin: R182) vermittelt. Dieser Aminosäurerest ist in der Helix D von p19 lokalisiert und ragt in die Bindungstasche von p40. Die Guanidiniumgruppe bildet ein ausgedehntes Interaktionsnetzwerk, welches unter anderem eine Salzbrücke zu D312 (murin: D316) und eine Wasserstoffbrückenbindung zu Y136 (murin: Y133) von p40 einschließt. Das ϵ -Stickstoffatom der Guanidiniumgruppe bildet außerdem Wasserstoffbrückenbindungen zu Y268 (murin: Y265) sowie D312, welche über Wassermoleküle vermittelt werden.

Weiterhin wird die Bindungstasche von p40 mit aromatischen Resten ausgekleidet, die multiple Van-der-Waals Interaktionen mit dem Rückgrat und Seitenkettenatomen der Helices A und D von p19 ermöglichen, die das hervorstehende, zentrale R178 umgeben. Die wesentlichen Interaktionen werden hierbei hydrophoben Kontakten von p40_Y314 (murin: Y315) mit p19_A174 (murin: A175) und p19_A177 (murin: A178) der Helix D

zugeschrieben sowie Wechselwirkungen von p40_Y315 (murin: Y319) mit p19_A171 (Helix D, murin: A172) und p19_W45 (Helix A, murin: W45).

Im Vergleich zu den übrigen Mitgliedern der IL-12 Familie werden bei IL-12 und IL-23 die Zytokinuntereinheiten und die lösliche α -Rezeptoruntereinheit p40 über eine Disulfidbrücke verknüpft. Diese periphere Wechselwirkung wird bei IL-23 über ein Cystein in Position 73 (murin: C74) innerhalb der AB-Schleife der p19 Untereinheit und C199 (murin: C197) in der D2 Domäne des p40 ausgebildet [33]. In IL-12 wird die Interaktion der Zytokinuntereinheit p35 ebenfalls über eine solche Disulfidbrücke des Cysteins p35_C74 (murin: C92) mit p40_C199 stabilisiert [30].

In Publikation 1 (siehe Kapitel 3) dieser Arbeit werden kritische Aminosäuren in p19 für die Interaktion mit p40 identifiziert (p19_I176/A178/R179) [48]. Weiterhin wird gezeigt, dass die Interaktion zwischen p19 und p40 lediglich die Domäne D2 von p40 erfordert. Die als kritisch identifizierten Aminosäuren in p40 (p40_Y265/Y318) werden dagegen innerhalb der Domäne p40_D3 lokalisiert, welche außerdem eine vermittelnde Rolle für die *site II* Interaktion von p19 mit IL-23R übernimmt [48].

In Publikation 2 (siehe Kapitel 4) wird außerdem die Relevanz der Disulfidbrücke für die *site I* Interaktion von p40 mit p35 betrachtet, wobei dieser lediglich eine stabilisierende Rolle zugesprochen wird und diese für die Bildung des IL-12 Heterodimers sowie der biologischen Aktivität verzichtbar ist. Weiterhin wird die Rolle des Disulfids bezüglich der Bildung des p40 Homodimers untersucht und gezeigt, dass die Mutation des entsprechenden Cysteins in p40 eine Disulfid-vermittelte Interaktion verhindert [49].

1.4.2 Site II Interaktion von p19 mit IL-12R β 1

Beide Rezeptoren des IL-23 Rezeptorkomplexes weisen die notwendige ZHR für die Ausbildung der *site II* Interaktion auf [5,9,42]. Da die *site III* Interaktion auf der Wechselwirkung mit einer Ig-ähnlichen Domäne beruht und daher IL-23R zugesprochen wird, muss die Rekrutierung des IL-12R β 1 folglich über *site II* erfolgen [5].

Für die Rezeptoren der IL-12 Familie sind keine kristallographischen Daten und nur wenige Mutagenesestudien verfügbar, weshalb lediglich theoretische Aussagen über die Natur dieser Interaktionen möglich sind. Im Gegensatz hierzu sind die Interaktionen der IL-6 Familie mit ihren Rezeptoren gut charakterisiert und *site II* Studien bezüglich der Rolle der ZHR dieser Rezeptoren konzentrieren sich auf den Rezeptor gp130 [5]. Vor Ausbildung der *site II* Interaktion benötigt IL-6 zunächst die Bindung des α -Rezeptors (IL-6/IL-6R α : *site I*). Erst

infolge dieser Interaktion wird die *site II* Bindungsfläche gebildet [5,39]. Beide Moleküle interagieren im nächsten Schritt mit dem β -Rezeptor gp130, weshalb ebenfalls für das heterodimere IL-23 eine Beteiligung der Zytokinuntereinheit p19 und der löslichen α -Rezeptoruntereinheit p40 angenommen wird [5]. Im Gegensatz hierzu steht jedoch, dass die Interaktion von IL-12 und IL-12R β 1 vorwiegend über Regionen von p40 erfolgt [50]. Die Bindung von p40 erfordert weder die Beteiligung der Zytokinuntereinheit p35 noch die Generierung einer Bindungsfläche, die erst aufgrund spezifischer Paarung der beiden Untereinheiten p40 und p35 entsteht [5,50,51].

Mutagenesestudien deuten darauf hin, dass die Erkennung multipler Zytokine durch gp130 und andere Vertreter dieser Rezeptorklasse sogenannte *hot spots* involvieren, aber auch Interaktionen nutzen, die spezifisch für die verschiedenen Zytokine sind [5]. So bildet bei dem amphipatischen gp130 ein zentraler Phenylalaninrest einen solchen *hot spot* für die Bildung des Komplexes, bei dem die umgebenden Reste individuell in Abhängigkeit des gebundenen Zytokins verschiedene intermolekulare Kräfte nutzen [52,53]. Da die homologen Rezeptoren der IL-12 Familie, wie IL-12R β 1, ebenfalls mit verschiedenen Zytokinen interagieren, wird ein ähnlicher Mechanismus für die Wechselwirkung vermutet [5]. Die hydrophoben gp130 Aminosäuren, die zur Interaktion mit dem Zytokin beitragen, sind innerhalb der IL-12 Rezeptorfamilie annähernd konserviert. Allerdings weisen sie keine Aminosäurereste auf, die mit dem *hot spot* bildenden Phenylalanin des gp130 vergleichbar sind. Daher wird für die *site II* von IL-23 und IL-12R β 1 angenommen, dass diese von einer höheren Anzahl spezifischer Wechselwirkungen zwischen Zytokin und Rezeptor dominiert wird und weniger Kreuzreaktivitäten innerhalb dieser Interaktionen erfolgen [5].

In Publikation 1 (siehe Kapitel 3) dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Bindung von IL-23 und IL-12R β 1 über die Domänen D1 und D2 von p40 vermittelt wird und keine Beteiligung von p19 erfordert [48]. Dementsprechend wird das Paradigma der klassischen *site II* widerlegt und gezeigt, dass für die Interaktion von p40 mit dem Rezeptor die Domänen D1 und D2 von IL-12R β 1 benötigt werden. Des Weiteren wurden mit IL-12R β 1_Y143 und V116/L117/S118 kritische Aminosäuren dieser Interaktion in der Domäne D1 des Rezeptors identifiziert [48].

1.4.3 *Site III* Interaktion von p19 mit IL-23R

Für die *site III* Interaktion des IL-23 Rezeptorkomplexes wird eine Wechselwirkung der helikalen Zytokinuntereinheit p19 und der Ig-ähnlichen Domäne des IL-23R angenommen [5]. Bei Betrachtung der *site III* Interaktion von gp130 zeigt dessen Ig-ähnliche Domäne eine starre Struktur ohne Flexibilität zur Zytokinbindung. Aus diesem Grund wird der Kontakt zwischen den Proteinen vermutlich über die flexiblen Schleifen des Zytokins vermittelt, wobei die amphipathische Interaktionsfläche der Ig-ähnlichen Domäne des Rezeptors multiple Wechselwirkungen ermöglicht [52].

In verschiedenen Studien bezüglich der *site III* Interaktion des gp130 Rezeptors wurden hydrophobe Reste in der jeweiligen N-terminalen Region von Helix D der interagierenden Zytokine identifiziert [54,55]. Für virales IL-6 wurde hierbei ein Tryptophan als kritischer Rest nachgewiesen, wobei diese aromatische Aminosäure ebenfalls innerhalb der IL-12 Familie konserviert ist [5,52]. Auch in p19 befindet sich ein solches Tryptophan, das eine ähnliche Position einnimmt, wie bei den IL-6 verwandten Zytokinen (human: p19_W156, murin: p19_W157) [5,33]. Da IL-12R β 1 nicht über eine N-terminale Ig-ähnliche Domäne verfügt, wird angenommen, dass die *site III* Interaktion von IL-23 und IL-23R über p19_W156 und die Ig-ähnliche Domäne des IL-23R vermittelt wird [5].

Die Rolle des Tryptophans im murinen p19 (W157) wird in Publikation 1 (siehe Kapitel 3) untersucht, wobei bestätigt wird, dass diese Aminosäure eine kritische Funktion für die Ausbildung der klassischen *site III* übernimmt [48].

1.5 IL-23 induzierte Signaltransduktion: Aktivierung des IL-23 Rezeptorkomplexes

Zytokine, die Klasse I Rezeptoren binden, spielen eine kritische Rolle in der Entwicklung und Differenzierung verschiedener Zellen [56]. Infolge der spezifischen Bindung des Liganden IL-23 an die membrangebundenen Rezeptoren werden Letztere aktiviert und vermitteln ihr Signal von dem extrazellulären in den intrazellulären Bereich der Zelle [22]. Da hierbei zwei unterschiedliche Rezeptoren involviert sind, erscheint deren Dimerisierung als ausschlaggebender Schritt der Signalweiterleitung über die Membran, wobei eine spezifische Orientierung der involvierten Rezeptorketten unabdingbar ist [22,57,58].

Diesbezüglich zeigt sich das WSXWS Motiv als kritischer Faktor der Rezeptoraktivierung, da Mutationen dieses Motivs im Erythropoietin Rezeptor (EpoR) auf eine essentielle Rolle

für die erforderliche Konformation der Ligandenbindedomänen deuten und die Aktivierung des Rezeptors beeinflussen [59].

Anhand des Prolaktinrezeptors wurde bereits gezeigt, dass dieses Motiv als molekularer Schalter zwischen dem ungebundenen und gebundenen Zustand des Rezeptors agiert. Die π - π Wechselwirkung der beiden Tryptophanreste nimmt in dem ungebundenen Molekül eine T-förmige Anordnung an, wobei sich diese während der Ligandenbindung zugunsten anderer Interaktionen verschiebt [60].

IL-12R β 1 und weitere Mitglieder der Klasse I Rezeptoren weisen darüber hinaus zusätzliche FN-III Domänen auf [22]. In dem strukturell verwandten gp130 führt die Deletion der vierten und sechsten Domäne zum vollständigen Verlust der Bindungsfähigkeit des Liganden [61].

Daher scheinen diese extrazellulären Domänen die N-terminalen Domänen des Rezeptors so zu positionieren, dass die Bindung des Liganden ermöglicht wird [22]. Die Deletion der fünften Domäne ermöglicht zwar weiterhin die Ligandeninteraktion, verhindert jedoch die Initiierung der Signalkaskade [61]. Für die Aktivierung des IL-23 Rezeptorkomplexes ist eine solche Involvierung dieser FN-III Domänen für IL-12R β 1 zu berücksichtigen, nicht jedoch für IL-23R, welcher anstelle der zusätzlichen FN-III Domänen über die sogenannte *Stalk* Region verfügt [5,9]. Die Bindung von IL-23 führt zu einer Konformationsänderung der extrazellulären Rezeptordomänen, welche die Juxtaposition der intrazellulären Domänen der signalisierenden Untereinheiten herbeiführt [4].

1.5.1 Signalweiterleitung des IL-23 Rezeptorkomplexes

Die Klasse I Rezeptoren und somit auch IL-23R und IL-12R β 1 weisen keine intrinsische enzymatische Kinaseaktivität auf [62]. Nach Bildung des hochaffinen oligomeren Komplexes mit den Transmembranrezeptoren werden intrazellulär assoziierte Tyrosinkinase der Jak Familie aktiviert [22].

Die Familie der Jaks besteht aus vier Mitgliedern, welche als Jak1, Jak2, Jak3 und Tyrosinkinase 2 (Tyk2) bezeichnet werden [63]. IL-23 aktiviert mit Jak2 und Tyk2 dasselbe Spektrum an Januskinasen wie IL-12 (siehe Abbildung 7) [9,64]. Bislang wurde IL-23R als die alleinige signalisierende Komponente betrachtet und interagiert mit Jak2, wobei der Tyk2 bindende IL-12R β 1 für die hochaffine Bindung von IL-23 benötigt wird [9,64-66].

Die Januskinasen weisen sieben Janus Homologie (JH) Domänen auf [63]. Die Kinasedomäne JH1 befindet sich hierbei im C-terminalen Bereich und wird N-terminal mit einer Pseudokinase JH2 verknüpft, welche zwar charakteristische katalytische Domänen

aufweist, jedoch keine kritischen Reste besitzt [67]. Die JH3-JH4 Region teilt hierbei strukturelle Ähnlichkeiten mit SH2 Domänen und die JH4-JH7 Region enthält eine *Four-point-one/Ezrin/Radixin/Moesin* (FERM) Domäne, welche Protein-Protein-Interaktionen vermittelt [68,69]. Jaks binden hierbei an spezifische Regionen der Rezeptoren, welche als Box 1 und Box 2 Motive bezeichnet werden [70].

In Publikation 4 (siehe Kapitel 6) dieser Dissertation wird gezeigt, dass die Assoziation von Jak2 mit IL-23R über ein bislang unbekanntes Sequenzmotiv erfolgt. Für die effiziente Signaltransduktion wird die Bindung der Kinase Tyk2 an das Box 1 Motiv der intrazellulären Domäne des IL-12R β 1 benötigt [71].

Anschließend werden die assoziierten Januskinasen, infolge der Rezeptoraktivierung, innerhalb der katalytischen Domäne autophosphoryliert und somit die Aktivierung ihrer Kinaseaktivität induziert (siehe Abbildung 7) [72-74]. Dies wiederum ermöglicht die Phosphorylierung intrazellulärer Tyrosinreste der Rezeptoren, welche als Bindungsstellen für STAT Proteine dienen können [75]. Auch hier aktivieren IL-12 und IL-23 mit STAT1, -3, -4 und -5 dasselbe Spektrum an STAT Proteinen, wobei IL-12 vorwiegend STAT4 und IL-23 hauptsächlich STAT3 rekrutiert [9].

Die Mitglieder der STAT Familie besitzen gemeinsame strukturelle Eigenschaften wie eine N-terminale STAT Dimerisierungsdomäne, eine *coiled-coil* Domäne mit multiplen herausragenden α -Helices, gefolgt von einer DNA-Bindedomäne und einer Linkerdomäne. Diese wird C-terminal mit einer SH2 Domäne verknüpft. Weiterhin verfügen sie über einen konservierten Tyrosinrest und eine variable C-terminale Transaktivierungsdomäne [62].

Die Bindung der STAT Moleküle an die phosphorylierten Tyrosine des Rezeptors erfolgt über ihre SH2 Domäne. Anschließend wird die Phosphorylierung des konservierten Tyrosins im STAT Protein durch die Kinaseaktivität der aktivierten Januskinasen vermittelt [75].

Die Identifizierung der beteiligten Tyrosinreste der intrazellulären Domäne des IL-23R wird in Publikation 3 (siehe Kapitel 5) gezeigt (IL-23R_Y504/Y542/Y626). Neben der Phosphorylierung dieser Aminosäuren wird ebenfalls die Präsenz eines nicht-kanonischen Aktivierungsmotivs für die Vermittlung der STAT3 Phosphorylierung bewiesen [76].

In Publikation 4 (siehe Kapitel 6) wird gezeigt, dass auch die intrazelluläre Domäne des IL-12R β 1 eine Rolle im Rahmen der Signaltransduktion übernimmt, da diese Tyk2 über dessen Interaktion mit den Box 1 und Box 2 Motiven bindet [71].

Im Anschluss an die Phosphorylierung und Aktivierung der STAT Moleküle erfolgt deren Homodimerisierung, wobei prinzipiell auch Heterodimere von STAT1/2 und STAT1/3 und STAT5a/5b möglich sind [77-79]. Die Dimerisierung wird hierbei durch die intermolekulare

Assoziation einer SH2 Domäne mit dem konservierten Phosphotyrosin eines anderen STAT Moleküls vermittelt [75].

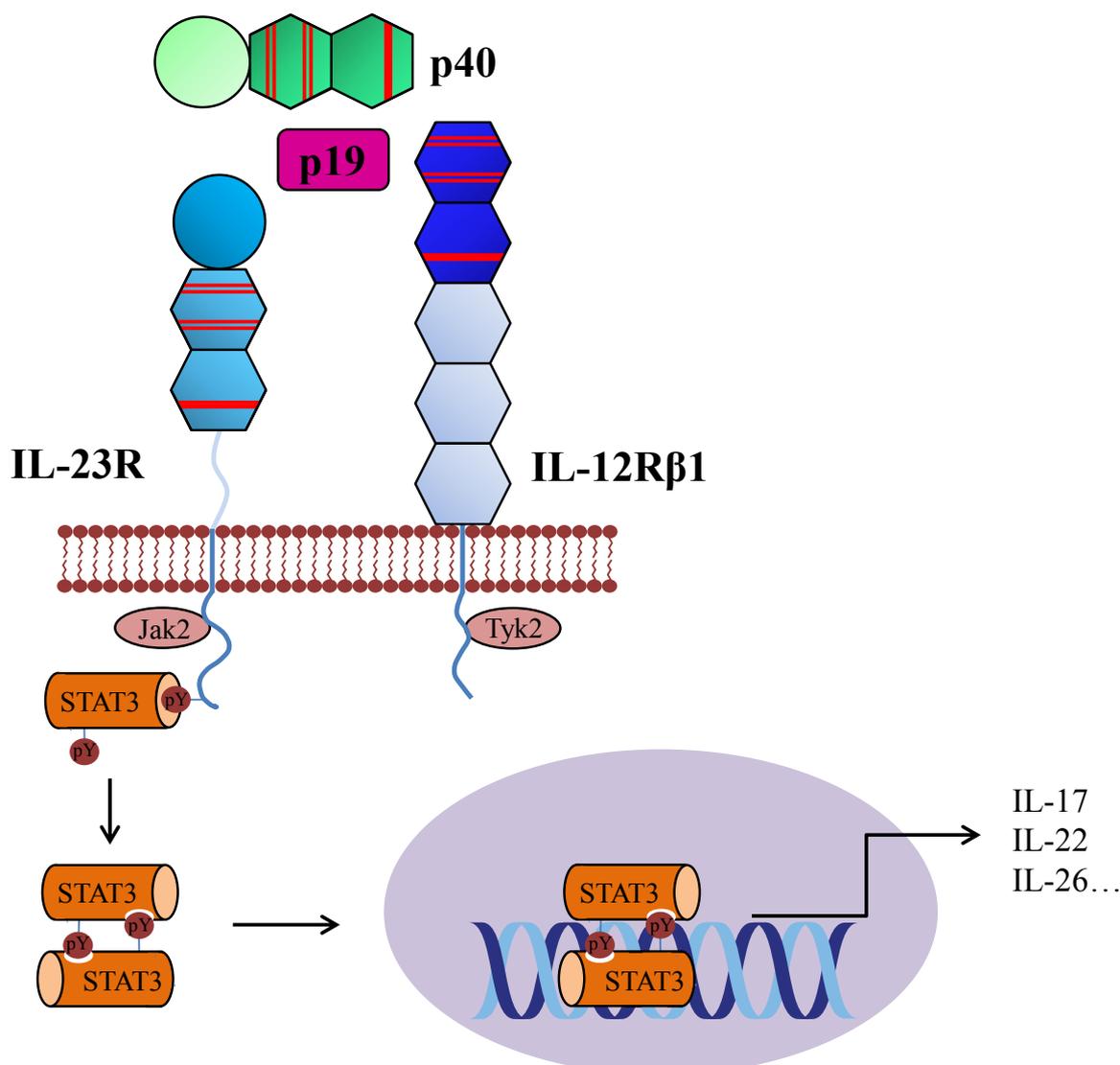


Abbildung 7: IL-23 induzierte Signalkaskade.

Infolge der Bindung von IL-23 an die extrazellulären Rezeptordomänen wird das Signal über die Transmembran in den zytoplasmatischen Bereich transferiert. Die intrazellulären Rezeptordomänen sind mit Januskinasen assoziiert, wobei IL-23R Jak2 bindet und IL-12Rβ1 Tyk2 aktiviert [9,65]. Nach ihrer Autophosphorylierung und Aktivierung phosphorylieren Jaks C-terminale Tyrosinreste der intrazellulären Rezeptordomäne, die anschließend der Bindung und Aktivierung von STAT Molekülen dienen [74,75]. Im IL-23 vermittelten Signalweg wird dabei überwiegend STAT3 rekrutiert [9]. STAT3 dimerisiert anschließend und transloziert in den Nukleus [62,77]. Durch Bindung an die DNA regulieren diese Transkriptionsfaktoren die Transkription ihrer Zielgene [62]. Die Darstellung ist modifiziert nach Di Cesare *et al.* sowie Langrish *et al.* [15,80].

Entgegen diesem klassischen Modell der STAT Aktivierung wurde gezeigt, dass nicht-phosphorylierte STAT Moleküle ebenfalls in der Lage sind *in vivo* Dimere zu bilden und dies bereits vor der Aktivierung durch Zytokine erfolgen kann [75,81].

Im darauffolgenden Schritt translozieren die Dimere in den Nukleus, wobei dies möglicherweise auch im Fall der nicht-phosphorylierten Dimere erfolgt, und binden an spezifische Erkennungssequenzen der DNA [62,75]. Für STAT1, -3, -4 und -5 ist die Bindungssequenz, welche als γ -aktivierte Sequenz (GAS) bezeichnet wird, als TTCN₃GAA definiert. STAT1 erkennt außerdem IFN stimulierte Antwortsequenzen [62]. Die STAT Dimere binden hierbei in einer C-förmigen Klammer an die DNA, wobei die N-terminale Domäne die Ausbildung von Dimer-Dimer Interaktionen von STAT Molekülen stabilisiert und die Engagierung von Transkriptionsfaktoren über die *coiled-coil* Domäne möglich ist [75,82-86]. Auf diese Weise führt die Aktivierung des IL-23 Rezeptorkomplexes und die Homodimerisierung von STAT3 zur Expression weiterer Zytokine wie IL-17A, IL-17F, IL-22 und IL-21 [87]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass in der IL-23 vermittelten Produktion von IL-17 die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) einen Einfluss auf die STAT3 Aktivierung nimmt und über die Phosphorylierung von *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha* (I κ B- α) der *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells* (NF- κ B) Signalweg stimuliert wird [88].

In Publikation 3 (siehe Kapitel 5) wird die Aktivierung der PI3K durch IL-23R bestätigt und auch gezeigt, dass dieser Rezeptor die *extracellular signal-regulated kinases* (Erk) 1/2 phosphoryliert und daher eine Rolle in der Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Kaskade spielt [76]. Die Aktivierung der PI3K durch IL-12R β 1 wird in Publikation 4 (siehe Kapitel 6) bestätigt [71].

1.6 IL-23 vermittelte Immunantwort

IL-23 spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung humaner und muriner T-Helferzellen (TH-Zellen), wobei naive T-Zellen keinerlei Reaktivität gegenüber IL-23 besitzen, da sie den IL-23R nicht oder nur in geringem Maß exprimieren [8,9]. Hierbei fördert IL-23 die Entwicklung sogenannter TH17-Zellen, welche durch die Expression von IL-17 (IL-17A) und verwandten proinflammatorischen Zytokinen charakterisiert werden [15]. Die Entwicklung von TH17-Zellen wird durch mikrobielle Faktoren und Signalwege stimuliert. Eine Produktion von IL-17 ist wichtig für die Kontrolle und Abwehr verschiedener Pathogene wie z.B. das extrazelluläre Bakterium *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter rodentium* und *Borrelia burgdorferi* oder systemische Infektionen mit dem fungalen Pathogen *Candida albicans* [89-92].

Nach der Aktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen differenzieren Antigen-spezifische *cluster of differentiation* (CD) 4⁺-Zellen in Effektorzellen in Abhängigkeit des Zytokinmilieus und spezialisieren sich in Abhängigkeit ihrer sekretierten Zytokine [80].

1.6.1 Entwicklung naiver T-Zellen

T-Zellen entstehen aus Vorläuferzellen innerhalb des Knochenmarks, die zur weiteren Entwicklung in den Thymus wandern und dort deren Differenzierung zu naiven T-Zellen eingeleitet wird [93]. In diesem Prozess produzieren die Zellen beispielsweise das Oberflächenmolekül CD3, aber auch die beiden Ko-Rezeptoren CD4 und CD8 [94].

Bereits vor einem ersten Kontakt mit ihrem entsprechenden Antigen erfolgt eine Reorganisation ihrer Rezeptor-kodierenden Gene [93]. Die Produktion Antigen-spezifischer Rezeptoren ist daher das Ergebnis zufälliger Reorganisation und dem Spleißen multipler DNA-Segmente, die für die Antigen-bindenden Regionen der Rezeptoren codieren.

In T-Zellen gibt es zwei Formen dieser Rezeptoren, wobei die häufigste ein Heterodimer aus einer α - und einer β -Kette ist. Eine weitere Form besitzt eine γ - und eine δ -Kette [93]. Der Einfluss von IL-23 wurde nicht nur bei T-Zellen, die T-Zellrezeptoren (*T cell receptor*, TCR) mit den $\alpha\beta$ -Ketten tragen gezeigt, sondern auch bei Zellen des angeborenen Immunsystems [95]. Die $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimieren IL-23R konstitutiv und zeigen eine Anreicherung innerhalb epithelialer Zellschichten der Haut und des Darms [95,96]. Aufgründessen spielen diese Zellen eine wesentliche Rolle in der Bildung der aufkommenden adaptiven Immunantwort, da sie die ersten Zellen darstellen, die durch den Kontakt mit IL-23 eine direkte Ausschüttung von Zytokinen ermöglichen und somit das lokale Zytokinmilieu für die folgende adaptive Immunantwort vermitteln [95].

Nach der Reorganisation der Rezeptoren differenzieren die naiven Zellen schließlich je nach Expressionsmuster in CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen, wobei die TH17-Zellen aus naiven CD4⁺-Zellen gebildet werden [80,94].

Diese Zellen besiedeln im nächsten Schritt die sekundären lymphoiden Gewebe, wo sie auf Antigen-präsentierende Zellen treffen [93].

1.6.2 Entwicklung von Effektorzellen

Der Kontakt mit den Antigen-präsentierenden Zellen hängt nicht nur von dem spezifischen Antigen ab, sondern auch von den sogenannten *major histocompatibility complex* (MHC) Molekülen, welche sich ebenfalls auf der Oberfläche befinden [93]. CD4⁺-Zellen interagieren nur mit solchen Antigen-präsentierenden Zellen, die mit MHC Klasse II Molekülen gekoppelt sind [93,97]. Nach der Bindung des Antigen/MHC Klasse II Komplexes an den TCR assoziiert Letzterer mit den CD3 Molekülen CD3 $\gamma\epsilon$ und CD3 $\delta\epsilon$, sowie mit dimeren ζ Modulen und vermittelt das Signal über Immunrezeptor-basierte Tyrosinaktivierungsmotive (ITAM) in der zytoplasmatischen Domäne [98-100].

Dieser supramolekulare Aktivierungskomplex assoziiert weiterhin mit dem CD4 Ko-Rezeptor, welcher mit der Lymphozyt-spezifischen Proteintyrosinkinase (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*, Lck) der *steroid receptor co-activator* (SRC) Familie assoziiert. Die Kinase phosphoryliert anschließend Tyrosinreste in den zytosolischen ITAM der TCR-assozierten Ketten [101].

Dies führt zur Rekrutierung und Phosphorylierung des 70 kDa ζ -assozierten Proteins (ZAP-70), welches eine Vielzahl zytosolischer Proteine phosphoryliert und somit verschiedene Signalkaskaden zur Transkription verschiedener Gensequenzen einleitet [101,102].

1.6.3 Differenzierung von TH17-Zellen

Infolge vielfältiger *in vivo* und *in vitro* Studien humaner und muriner Modelle werden verschiedenste Zytokine und Transkriptionsfaktoren im Rahmen der TH17-Zelldifferenzierung beschrieben, wobei einige Faktoren als essentielle Schlüsselproteine betrachtet werden. IL-23, welches durch Antigen-präsentierende Zellen produziert wird, wird nicht für die frühe Entwicklung der TH17-Zellen benötigt, sondern spielt eine Rolle in der terminalen Differenzierung und ist daher wichtig für die Entwicklung und Expansion dieser Zelllinie [15].

So umfasst der grundlegende Mechanismus zunächst eine initiale Differenzierung naiver CD4⁺-Zellen, die ohne die Beteiligung von IL-23 auskommt.

Dendritische Zellen, die über verschiedene *Toll-like* Rezeptoren stimuliert werden, stellen ein breites Spektrum proinflammatorischer Zytokine bereit, welche die Entwicklung von T-Helferzellen fördern [103]. Für die Differenzierung muriner TH17-Zellen spielen insbesondere die Zytokine IL-6, IL-21, IL-23 sowie die Transkriptionsfaktoren STAT3 und

der *retinoic acid-related orphan receptor* (ROR) γ t eine wichtige Rolle (siehe Abbildung 8) [104].

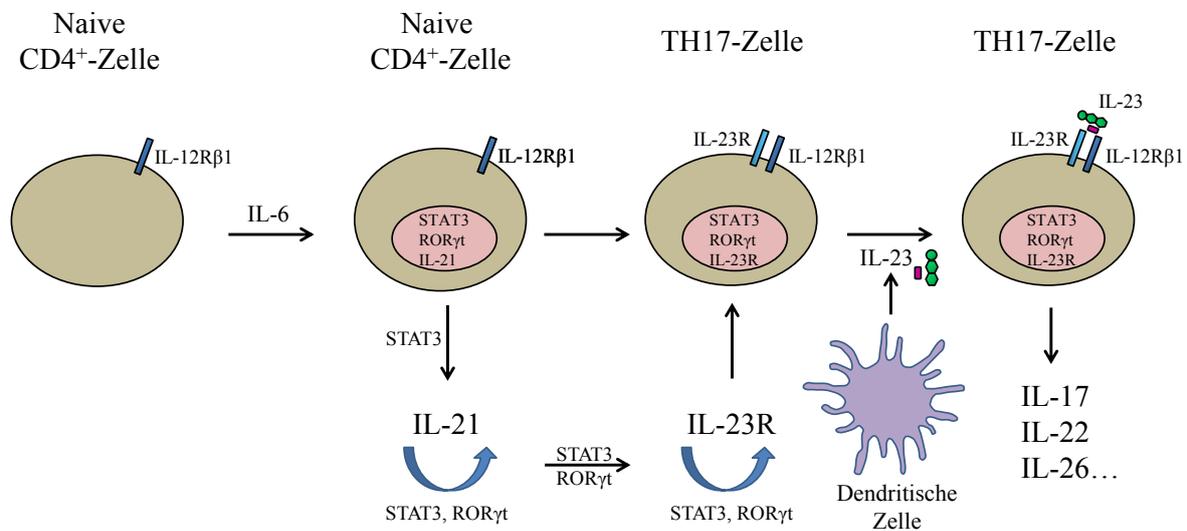


Abbildung 8: Differenzierung muriner TH17-Zellen.

In Abhängigkeit von STAT3 induziert IL-6 die Expression des Zytokins IL-21, welches in einem STAT3 abhängigen Prozess die eigene Expression reguliert [104-106]. IL-21 induziert die Expression des IL-23R, so dass IL-23 an seine Rezeptoren (IL-23R/IL-12Rβ1) bindet und die terminale Differenzierung der TH17-Zellen vermittelt wird [104]. Die Abbildung ist modifiziert nach Di Cesare *et al.* und Ivanov *et al.* [80,104].

IL-6 initiiert hierbei die Differenzierung der naiven CD4⁺-Zellen, indem zunächst die Expression eines weiteren Zytokins, IL-21, induziert wird [105]. In diesem Prozess vermittelt IL-6 zunächst die Aktivierung von STAT3 und RORγt, wobei jedoch nur STAT3 eine Rolle hinsichtlich der IL-21 Expression übernimmt. IL-21 reguliert in einem STAT3-abhängigen Prozess die eigene Expression und führt ebenfalls zur Hochregulierung des Transkriptionsfaktors RORγt, welcher ebenfalls die IL-21 Expression induziert und somit zur Ausbildung eines positiven autokrinen *Loops* beiträgt [104-106].

Im nächsten Schritt aktiviert IL-21 die Expression des IL-23R, wobei dies in Abhängigkeit von STAT3 und RORγt erfolgt. IL-21 wird daher auch als intermediärer Vermittler der IL-6 vermittelten Induktion des IL-23R betrachtet [105]. Die Aktivierung des IL-23 Signalwegs induziert ebenfalls RORγt, welches eine Hochregulation der IL-23R Expression, ähnlich wie bei dem autokrinen IL-21 *Loop*, bewirkt [104,105].

Sobald IL-23R auf der T-Zelloberfläche exprimiert wird, bindet IL-23 an seine Rezeptoren, wobei das codierende Gen des IL-12Rβ1 bereits von den CD4⁺-Zellen exprimiert wird [20,104]. Die Aktivierung von STAT3 in dem IL-6/IL-21/IL-23 Signalweg ermöglicht die direkte Bindung des Transkriptionsfaktors an die Promotoren von IL-21, IL-23R und IL-17 [107-109]. Bislang wurden keine Gene identifiziert, die direkt durch RORγt reguliert werden.

Dennoch weist der IL-17 Promotor die konservierte Konsensussequenz AGGTCA der sogenannten ROR *responsive elements* (ROREs) auf, welche der Bindung von ROR Proteinen dient [110,111].

Die terminal differenzierten TH17-Zellen exprimieren ein charakteristisches Zytokinprofil, welches nicht nur IL-21, sondern auch IL-17 (IL-17A), IL-17F, IL-22, IL-26 und CCL20 einschließt [112,113].

1.6.4 Unterschiede der murinen und humanen TH17-Zelldifferenzierung

Für die Regulierung der TH17-Zelldifferenzierung wurden unterschiedlichste Daten in murinen und humanen Systemen erhalten. So wird beispielsweise die Rolle des *transforming growth factor* (TGF) β diskutiert, wobei diesem Zytokin im Rahmen der initialen Differenzierung muriner Zellen eine kritische Rolle zugewiesen wurde [114]. IL-1 β und TNF- α verstärken die murine TH17-Zelldifferenzierung, wobei ohne die Anwesenheit von TGF- β keine Differenzierung der naiven T-Zellen stattfindet [103,104].

Andere Studien zeigen dagegen, dass die Differenzierung IL-6, IL-23 und IL-1 β erfordert, nicht aber TGF- β [115,116]. Die Differenzierung TCR stimulierter humaner T-Zellen wird nicht durch TGF- β und IL-6 induziert. Vielmehr wird die Expression von IL-17 durch IL-1 β induziert und durch die Anwesenheit von IL-6 verstärkt [117].

Dennoch sind IL-21 und TGF- β für die Differenzierung der naiven humanen T-Zellen erforderlich [118]. Die Notwendigkeit von TGF- β lässt sich hier aufgrund der inhibierenden Wirkung auf die Differenzierung von TH1-Zellen erklären [119].

Die Identifizierung humaner TH17-Zellen, die sowohl IL-17 als auch IFN- γ produzieren, führt zu einem Zelltyp, der als TH17/TH1-Zellen bezeichnet wird. Diese Zellen besitzen nicht nur das charakteristische Expressionsprofil der TH17-Zellen, sondern exprimieren neben IFN- γ auch den Transkriptionsfaktor der TH1-Zelldifferenzierung, welcher als *T-box transcription factor normally expressed in T cells* (T-bet) bezeichnet wird [120].

Sowohl TH17-Zellen als auch TH17/TH1-Zellen exprimieren den Rezeptor IL-12R β 2 und ermöglichen daher die IL-12 induzierte Signalweiterleitung [120,121]. Die Stimulation dieser Zellen mit IL-12 führt zu einer Änderung des Phänotyps. Die Zellen senken die Expression der charakteristischen Proteine der TH17-Zellen, stimulieren jedoch die Expression von T-bet und IFN- γ und weisen daher die Charakteristika von TH1-Zellen auf [120,121]. TGF- β zeigt eine inhibierende Wirkung auf die Expression von T-bet und unterstützt daher indirekt die Differenzierung der humanen TH17-Zellen [119]. Ein Wechsel des Phänotyps der

TH17-Zellen wurde auch in verschiedenen Studien für die Differenzierung muriner Zellen gezeigt [122,123].

Zusätzlich werden weitere Proteine genannt, die eine Beteiligung an dem Prozess aufzeigen. So wird ebenfalls in primären, humanen T-Zellen die Beteiligung weiterer Mitglieder der ROR Familie bezüglich der Expression von IL-17 beschrieben (human: ROR α d, ROR β ; murin: ROR α) oder auch die Expression des Aryl-Hydrocarbonrezeptors genannt [124-126]. Außerdem wurden weitere transkriptionelle Regulatoren wie zum Beispiel der Kruppel-ähnliche Faktor 4, der IFN-regulatorische Faktor 4 oder auch Eomesodermin identifiziert [127-129]. Der prägnanteste Unterschied zwischen murinen und humanen Zellen liegt jedoch in der Expression des Ko-Rezeptors CD161, welcher nur von humanen TH17-Zellen exprimiert wird [130,131].

1.7 Die Bedeutung von IL-23 in Autoimmunerkrankungen

Eine gemeinsame Eigenschaft von verschiedenen Autoimmunerkrankungen ist die Dysregulation der Antwort von T-Effektorzellen bei langwierigen Entzündungen [113]. IL-23 und IL-17 werden mit einer Vielzahl solcher humaner Autoimmunerkrankungen assoziiert. So weisen psoriatische Hautläsionen einen erhöhten Anteil der TH17-Zellfaktoren ROR γ t, IL-17, IL-22 und der IL-23 mRNA auf [132-135].

Bei der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell für multiple Sklerose (MS), zeigen p19- und p40-defiziente Mäuse ein resistentes Verhalten, da die lokale Expression von IL-23 für die Induktion von EAE erforderlich ist [136]. Auch anhand der Kollagen-induzierten Arthritis (*collagen-induced arthritis*, CIA) wurde gezeigt, dass eine Defizienz von p19 zu einer Resistenz gegenüber der Erkrankung führt und verdeutlicht die regulatorische Funktion von IL-23 im Rahmen der Pathogenese [137]. Die Expression von p19 in klinischen Proben von Patienten mit Morbus Crohn, rheumatoider Arthritis (RA) und MS unterstützen eine mögliche Rolle von IL-23 in humanen Autoimmunerkrankungen [80,138-140]. Des Weiteren wurde IL-23R als Krankheitsgen in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen identifiziert, wobei hier verschiedene Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) wie R381Q (human) innerhalb des Rezeptors mit dieser Erkrankung assoziiert werden und somit den Einfluss des IL-23 Signalwegs in der Regulation chronischer Gewebsentzündungen unterstreichen [141]. Derzeit ist jedoch nicht bekannt, ob es sich hierbei um einen

Funktionszugewinn oder Funktionsverlust zur Ausbildung der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen handelt. Weitere genetische Studien zeigen außerdem, dass SNP-Varianten von IL-23R mit Erkrankungen wie Psoriasis, Spondylitis ankylosans sowie MS verknüpft werden [142-146].

Diese Studien demonstrieren, dass IL-23 und/oder IL-23R potentielle Ziele für die Behandlung chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie Psoriasis oder Morbus Crohn darstellen [147]. Die Entwicklung von Antagonisten zur Inhibierung der Zytokinaktivität ist daher von größter Bedeutung. Die Verwendung von Fusionsproteinen extrazellulärer Rezeptordomänen, welche als *cytokine traps* bezeichnet werden, wurde bereits als effiziente Methode zur Blockierung der Zytokinaktivität gezeigt [148,149]. So führt beispielsweise die linker-verbundene Fusion der ligandenbindenden Domänen von gp130 (D1, D2 und D3) und IL-6R α (D1, D2) zur Blockierung der IL-6 vermittelten Aktivität [150]. Ebenso induziert die C-terminale Fusion von IL-6R α und von gp130 mit dem humanen Fc-Tag die Bildung eines IL-6 antagonisierenden Heterodimers beider Rezeptoren [149].

In Publikation 1 (siehe Kapitel 3) dieser Arbeit werden die strukturellen und funktionellen Eigenschaften einer IL-23 Deletionsvariante, p40_D2D3-p19, hinsichtlich der Funktion eines potentiellen Antagonisten für die IL-23 Signaltransduktion untersucht [48]. Diese Deletionsvariante interagiert ausschließlich mit IL-23R, zeigt jedoch keine Bindung an IL-12R β 1. Interessanterweise wird jedoch gezeigt, dass das Fc-getaggte Fusionsprotein, p40_D2D3-p19Fc, die Signaltransduktion allein über die Interaktion mit IL-23R induziert [48].

2 Zielsetzung

Das Zytokin IL-23 spielt eine wichtige Bedeutung in der Pathogenese entzündlicher Autoimmunerkrankungen, wie z.B. bei rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn oder multipler Sklerose [15,151]. IL-23 nimmt hierbei eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von TH17-Zellen ein [104]. Das Ziel dieser Doktorarbeit ist es daher, die molekularen Mechanismen dieses proinflammatorischen Zytokins aufzuklären und damit die Basis für die Entwicklung von Antagonisten zu errichten.

Als erstes Ziel dieser Arbeit wird die strukturelle Aktivierung der Rezeptoren, IL-23R und IL-12R β 1, durch die Interaktion mit IL-23 untersucht. Hierfür sollen die extrazellulären kritischen Aminosäuren und die relevanten Domänen, welche eine effiziente Bindung von IL-23 an die beiden Rezeptoren vermitteln, identifiziert werden. Anhand eines murinen Modells von IL-23 im Komplex mit den Rezeptoren werden zunächst die kritischen Aminosäuren des *site I-II-III* Paradigmas bestimmt. Die Interaktion zwischen p19 und p40 (*site I*) wird über die Beteiligung spezifischer Aminosäuren in beiden Untereinheiten untersucht. Analog hierzu werden diejenigen Aminosäuren analysiert, die in p19 die *site II* und *site III* Interaktionen mit IL-12R β 1 (*site II*) bzw. IL-23R (*site III*) vermitteln. Ebenfalls werden die notwendigen Domänen des Komplexes bestimmt, welche die Ausbildung der *site I-II-III* Bindungsflächen ermöglichen.

Die zweite Fragestellung dieser Arbeit betrachtet die *site I* Interaktion von p40 mit p35 (IL-12) sowie die p40 Homodimerisierung bezüglich der Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke. Anhand der Mutation des beteiligten Cysteinrestes in p35 wurde bereits gezeigt, dass diese Einzelmutation keinen kritischen Einfluss auf die Heterodimerisierung nimmt [30]. Durch Mutation des korrespondierenden Cysteins in p40 soll die Rolle der Disulfidbrücke im Hinblick auf die Dimerisierung von IL-12 untersucht werden.

Die dritte Fragestellung betrachtet die intrazelluläre Signaltransduktion des IL-23R, welcher als STAT-rekrutierende Komponente des IL-23•IL-23R•IL-12R β 1 Komplexes vermutet wird [9]. Die Aktivierung von STAT3 gilt als essentieller Bestandteil der TH17-Zelldifferenzierung, weshalb die intrazelluläre Domäne des IL-23R bezüglich der STAT3 Bindemotive analysiert wird [109]. Als Grundlage der Untersuchung dienen postulierte Tyrosinreste, die als Adapterstellen für die Bindung von STAT3 verantwortlich sein sollen [9]. Des Weiteren wird die Beteiligung weiterer Tyrosinreste untersucht, um die

Eingrenzung relevanter Motive zu ermöglichen. Außerdem wird eine mögliche Rolle bislang unbekannter intrazellulärer Signalmoleküle analysiert.

Als viertes Ziel wird die Aktivierung von Januskinasen durch die intrazellulären Domänen der Rezeptoren des IL-23 aktivierten Komplexes untersucht. Für die Interaktion von Jak2 und IL-23R soll die verantwortliche Bindungsstelle identifiziert werden. Ebenfalls soll die Wechselwirkung von Tyk2 mit der zytoplasmatischen Domäne des IL-12R β 1 analysiert und eine mögliche Beteiligung des IL-12R β 1 an der Signaltransduktion untersucht werden.

3 Publikation 1

Non-canonical interleukin 23 receptor complex assembly: p40 protein recruits interleukin 12 receptor β 1 via site II and induces p19/interleukin 23 receptor interaction via site III

Publiziert in: The Journal of Biological Chemistry

Impact factor: 4,600

Eigener Anteil

an dieser Arbeit: 90%

Klonierung der Mutations- und Deletionsvarianten

Transfektion und Selektion von CHO-K1 Zellen

Proteinexpression

Proteinreinigung

Zellviabilitätsassay

Ko-Immunopräzipitation

Western Blot

Coomassie

Inhibitionsassay

Datenanalyse

Schreiben des Manuskripts

Schröder, J, Moll, JM, Baran, P, Grötzinger, J, Scheller, J and Floss, DM (2015) Non-canonical interleukin 23 receptor complex assembly: p40 protein recruits interleukin 12 receptor β 1 via site II and induces p19/interleukin 23 receptor interaction via site III. *The Journal of Biological Chemistry* **290**: 359-370.

4 Publikation 2

Recombinant p35 from bacteria can form interleukin (IL-)12, but not IL-35

Publiziert in: PloS One

Impact factor: 3,534

Eigener Anteil

an dieser Arbeit: 10%

Zielgerichtete Mutagenese

Transfektion und Selektion von CHO-K1 Zellen

Proteinexpression

Ko-Immunopräzipitation

Western Blot

Proliferationsassay

Aparicio-Siegmund, S, Moll, JM, Lokau, J, Grusdat, M, Schröder, J, Plöhn, S, Rose-John, S, Grötzinger, J, Lang, PA, Scheller, J and Garbers, C (2014) Recombinant p35 from bacteria can form interleukin (IL-)12, but not IL-35. *PLoS One* 9: e107990.

5 Publikation 3

Identification of canonical tyrosine-dependent and non-canonical tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor

Publiziert in: The Journal of Biological Chemistry

Impact factor: 4,600

Eigener Anteil

an dieser Arbeit: 20%

Klonierung

Proliferationsassay

Floss, DM, Mrotzek, S, Klöcker, T, Schröder, J, Grötzinger, J, Rose-John, S and 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. *The Journal of Biological Chemistry* **288**: 19386-19400.

6 Publikation 4

Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor β 1 and interleukin 23 receptor to janus kinases

Publiziert in: Molecular Biology of the Cell

Impact factor: 4,548

Eigener Anteil

an dieser Arbeit: 25%

Transfektion und Selektion von CHO-K1 Zellen

Proteinexpression

Western Blot

Proliferationsassay

Floss, DM, Klöcker, T, Schröder, J, Lamertz, L, Mrotzek, S, Strobl, B, Hermanns, H and Scheller, J (2016) Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor β 1 and interleukin 23 receptor to janus kinases. *Molecular Biology of the Cell* doi: 10.1091/mbc.E14-12-1645 [Epub ahead of print].

7 Diskussion

Diese Doktorarbeit betrachtet die strukturelle und funktionelle Charakterisierung des tetrameren IL-23 Rezeptorkomplexes. Das Zytokin IL-23 bildet ein Dimer aus der Zytokinuntereinheit p19 und der löslichen α -Rezeptoruntereinheit p40, welches über die membrangebundenen Rezeptoren, IL-12R β 1 und IL-23R, die intrazelluläre Signalkaskade induziert [8,9].

Die Publikation 1 dieser Arbeit thematisiert die Interaktion der extrazellulären Komponenten des murinen IL-23 Rezeptorkomplexes gemäß des postulierten Bindungsparadigmas für Zytokine der IL-12 Familie [5]. Das *site I-II-III* Paradigma beschreibt die Interaktionsfläche der Dimerisierung von p19 und p40 als *site I*. Dieses Dimer interagiert im nächsten Schritt über die *site II* mit IL-12R β 1 und *site III* bezieht sich auf die Interaktion des Zytokins mit IL-23R [5]. Durch Verwendung von Deletionsvarianten wurden die beteiligten Domänen identifiziert und mittels zielgerichteter Mutationen die kritischen Aminosäuren bestimmt [48]. Ko-Immunoprecipitationsanalysen und Zellviabilitätsassays identifizierten p19_I176E, A178 und R179 sowie p40_Y265 und Y318 als kritische Aminosäuren der *site I* Interaktion. Die Wechselwirkung von p19 und p40 erforderte lediglich die p40_D2 Domäne. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die *site II* Interaktion von IL-23 nicht über eine klassische *site II* zwischen p19 und IL-12R β 1 vermittelt wird, sondern über p40 erfolgt. Als verantwortliche Aminosäuren dieser Wechselwirkung wurden IL-12R β 1_Y143 und die Kombination IL-12R β 1_V116_L117_S118 identifiziert. Diese Interaktion benötigte jeweils die Kombination der D1 und D2 Domänen beider Proteine (p40_D1D2, IL-12R β 1_D1D2). Für *site III* wurde p19_W157 als essentielle Aminosäure für die Interaktion mit IL-23R identifiziert, wobei die Ausbildung der *site III* erst durch Bindung von p19 mit p40_D2D3 ermöglicht wird [48].

In Publikation 2 (siehe Kapitel 4) wurde die Rolle der löslichen α -Rezeptoruntereinheit p40 im Hinblick auf dessen Interaktion mit der Zytokinuntereinheit p35 von murinem IL-12 untersucht [49]. Die Betrachtung dieser *site I* Interaktion richtete sich dabei auf die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen den beiden Untereinheiten. Anhand der Mutation der entsprechenden Cysteine p40_C197 und p35_C92 wurde gezeigt, dass die Interaktion der beteiligten Thiolgruppen keinen Einfluss auf die Heterodimerisierung und die biologische Aktivität von IL-12 nimmt. Außerdem wurde gezeigt, dass die Mutation

des p40_C197 die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Untereinheiten des p40 Homodimers verhinderte [49].

In den Publikationen 3 und 4 (siehe Kapitel 5 und 6) dieser Arbeit wurden die intrazellulären Rezeptorketten bezüglich ihrer Rolle in der Signaltransduktion untersucht. Der IL-23R wurde bislang als signalvermittelnde Komponente betrachtet und in Publikation 3 wurden die kritischen Aminosäuren der STAT3 Aktivierung untersucht [76]. Die Einführung zielgerichteter Mutationen bewirkte die Inhibition der STAT3 Phosphorylierung bei Verwendung der Kombinationen Y542F/Y626F und Y504F/Y542F/Y626F in HeLa Zellen.

Anhand der mutierten Deletionsvarianten mIL-23R/Y416F/Y504F/Y542F-Δ554 (m= murin) und mIL-23R/Y416F/Y504F/Y542F-Δ571 wurde ebenfalls ein nicht-kanonischer Bereich (L554-Q570) der STAT3 Aktivierung definiert, da nur die zweite Variante die Phosphorylierung induzierte [76]. Weiterhin wurde in Publikation 3 gezeigt, dass IL-23 ebenfalls die Aktivierung von Erk 1/2 und Akt induziert [71,76].

In Publikation 4 wurde die Aktivierung der Januskinasen Jak2 und Tyk2 durch die murinen Rezeptoren IL-23R und IL-12Rβ1 thematisiert [71]. Mit Hilfe der Deletionsvarianten IL-23RΔ455 und IL-23RΔ480 wurde hierbei ein nicht-kanonischer Sequenzbereich (E455-E479) definiert, der die Assoziation von Jak2 an IL-23R ermöglichte, da Δ455 im Gegensatz zu Δ480 keine Ko-Immünpräzipitation von Jak2 vermittelte. Für IL-12Rβ1 wurde gezeigt, dass für die Assoziation mit der Kinase Tyk2 das Box 1 Motiv essentiell ist, da sowohl Mutations- als auch Deletionsvarianten (Ba/F3-IL-23R-IL-12Rβ1/P601V/P603V/P605V, Ba/F3-IL-23R-IL-12Rβ1Δ595-606) die Phosphorylierung von STAT3 verhinderten [71].

7.1 Charakterisierung der *site I* relevanten Aminosäuren in p19

Für die Wechselwirkungen zwischen den IL-23 Untereinheiten p19 und p40 mit den entsprechenden Rezeptoren (IL-23R/IL-12Rβ1) wird das *site I-II-III* Bindungsparadigma vorausgesagt. Die *site I* Interaktion betrachtet hierbei die Wechselwirkung der helikalen Zytokinuntereinheit p19 mit der löslichen α-Rezeptoruntereinheit p40 [5].

In Publikation 1 (siehe Kapitel 3) wurde über *molecular modeling* ein Model des murinen IL-23 generiert und kritische Aminosäuren für die Interaktion mit p40 bestimmt [48]. Anhand gerichteter Mutationen dieser Aminosäuren in der Sequenz von p19 wurde die Interaktion beider Proteine gemäß einer klassischen *site I* bestätigt. Die Inhibition der Zellproliferation

von IL-23 abhängigen Ba/F3 Zellen, welche die murinen Rezeptoren (IL-23R/IL-12R β 1) stabil exprimieren, zeigte hierbei die Beteiligung der Aminosäuren p19_I176, p19_A178 und p19_R179 an der Ausbildung der biologischen Aktivität von IL-23. Das Ausbleiben der Zellproliferation deutet an, dass die Mutationen eine Interaktion mit p40 verhindern und somit keine Komplexbildung mit den signalvermittelnden Rezeptoren erfolgt. Dies wurde mittels Ko-Immunopräzipitation bestätigt, wobei mit Ausnahme von p19_K66A eine Mutation dieser einzelnen Aminosäuren die Dimerisierung mit p40 vollständig blockierte [48].

Dies steht im Einklang mit den von Jones *et al.* publizierten Beobachtungen, welche für die *site I* Interaktion in IL-12 (p35/p40) einzelne Aminosäuren in p35 zur Unterbrechung der Interaktion identifizierten [152]. Im Sequenzvergleich weisen p19 und p35 eine geringfügige Homologie auf (25%), jedoch zeigen die beiden Vier-Helix-Bündel Zytokine im evolutionären Dendrogramm die engste Verwandtschaft und interagieren beide mit der löslichen α -Rezeptoruntereinheit p40 [5,8]. Nach einem auf p40 basierenden *Alignment* überlappen p19 und p35, so dass ihre Vier-Helix-Bündel deckungsgleich sind [27].

Die in p19 mutierten Aminosäuren A178 und R179 entsprechen den korrespondierenden Mutationen des murinen p35 (p19_A178W= p35_N206W, p19_R179A/p19_R179E= p35_R207A) [8,152]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden diese Aminosäuren als kritisch bei der Ausbildung der *site I* Interaktion identifiziert (siehe Abbildung 9A) [48]. Lediglich die Mutation von p19_K66A (p35_E68A) bestätigte dieses Lysin nicht als essentielle Aminosäure für die Bildung des dimeren IL-23 [8,48,152].

Die Interaktion zwischen p19 und p40 wird, anhand von kristallographischen Daten, den Helices A und D sowie dem C-terminalen Bereich der AB-Schleife zwischen den Helices A und B von p19 zugesprochen. Die Arbeiten von Lupardus und Garcia weisen hierbei der humanen Aminosäure p19_R178 (murin: R179) die Hauptrolle bezüglich der Interaktion mit p40 zu, wobei das Arginin verschiedene intermolekulare Wechselwirkungen mit Aminosäuren der p40 Bindungstasche vermittelt [33]. Dieser Argininrest liegt, ebenso wie die in dieser Arbeit identifizierten kritischen Aminosäuren, in Helix D [33,48]. Auch p35 verfügt über eine solche Aminosäure, wobei das humane p35_R211 (murin: p35_R207) die Interaktion mit dem Asparaginrest D312 in der Basis der p40 Bindungstasche vermittelt [30]. Damit wurde die Beteiligung der Helix D nicht nur bestätigt, sondern weist dieser Helix aufgrund der vielfältigen Interaktionen eine wichtige Rolle für die *site I* Interaktion zu [33,48].

Die Interaktionsfläche von p19 zeigt eine geringere Polarität als die von p35, was hier durch die Beteiligung der ungeladenen Aminosäurereste p19_I176 und A178 unterstützt wird [27]. Die als unbeteiligt identifizierte Aminosäure p19_K66 befindet sich im N-terminalen Bereich der Schleife AB, so dass eine funktionelle Rolle dieser Region in diesem Fall nicht bestätigt wurde [48]. Für p19 wird anhand der Kristallstruktur des humanen IL-23 ebenfalls die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen dem humanen p19_C73 mit p40_C199 beschrieben [27,33]. Unveröffentlichte Daten (Zellviabilitätsassay, Ko-Immunopräzipitation) bestätigten, dass die Mutation des konservierten Cysteins p19_C74 in der Schleife AB des murinen p19 die Dimerisierung mit p40 verhinderte und diese Aminosäure daher eine Rolle bezüglich der *site I* Wechselwirkung übernimmt (siehe Abbildung 9A). Dementsprechend wurde auch die Beteiligung der Schleife AB bestätigt, bislang jedoch kein direkter Einfluss der Helix A gezeigt.

7.2 Charakterisierung der *site I* relevanten Aminosäuren in p40

7.2.1 Interaktion von p40 mit p19

Weiterhin wurden in Publikation 1 dieser Arbeit ebenfalls die Aminosäuren in p40 identifiziert, die anhand des Modells als kritische Komponenten für die *site I* Interaktion mit p19 eingestuft werden [48]. Die erhaltenen Resultate des Zellviabilitätsassays zeigten, dass im Gegensatz zu der Ko-Stimulation mit den Wildtyp-Proteinen p19 und p40, die Einführung der Mutationen p40_Y265K oder p40_Y318K keine Proliferation der IL-23 responsiven Zellen bewirkte. Dies deutet auch hier darauf hin, dass diese Aminosäuren eine kritische Funktion für die Ausbildung der biologischen Aktivität von IL-23 einnehmen (siehe Abbildung 9B). Die essentielle Rolle dieser Aminosäuren wurde mittels Ko-Immunopräzipitation bestätigt, da keine Präzipitation der mutierten Proteine p40_Y265K und p40_Y318K mit p19 erfolgte [48].

Für die Interaktion mit den Helices A und D, sowie der AB-Schleife von p19, werden die beteiligten Bereiche den Schleifen 1 und 3 der D2 Domäne und den Schleifen 5 und 6 von p40_D3 zugeordnet [27]. Die beiden Domänen p40_D2 und p40_D3 charakterisieren die ZHR Domänen in Klasse I Zytokinrezeptoren, welche bei den Rezeptoren als verantwortliche Domänen für die Interaktion mit dem jeweiligen Zytokin betrachtet werden [34,39]. Bei den heterodimeren Vertretern der IL-12 Familie werden die β -Untereinheiten p40 und EBI-3 mit den extrazellulären Domänen der Klasse I Rezeptoren verglichen, wobei sowohl die

Transmembrandomäne als auch der intrazelluläre Bereich fehlt [30]. In humanem p40 bildet D312 (murin: D316) die Basis der „vulkanähnlichen“ Bindungstasche, wobei die hauptsächlichsten Interaktionen hydrophoben Kontakten des p40_Y314 (murin: Y318), aber auch p40_Y315 (murin: Y319) zugeschrieben werden [33]. Die lösliche α -Rezeptoruntereinheit p40 nutzt für die Bindung von p19 und p35 dieselbe Bindungstasche, wobei die zur Dimerisierung mit p19 als essentiell bestimmten Aminosäuren in der D3 Domäne von p40 lokalisiert sind [48]. Unveröffentlichte Daten (Zellviabilitätsassay, Ko-Immunopräzipitation), die im Rahmen dieser Doktorarbeit erhalten wurden, bestätigten außerdem die Beteiligung der Domäne D2. Die Mutation des hier lokalisierten murinen Cysteins p40_C197A, welches für die Ausbildung der Disulfidbrücke mit p19 betrachtet wird, verhinderte ebenfalls die Dimerisierung beider Proteine [33].

Diese Ergebnisse führen daher zu der Schlussfolgerung, dass die identifizierten Aminosäuren Teil der *site I* Interaktion sind und bestätigten zugleich die Beteiligung der Domänen D2 und D3 von p40 (siehe Abbildung 9B).

Die Daten der Ko-Immunopräzipitation von p19 mit Deletionsvarianten von p40 zeigten, dass p19 mit den Varianten p40_D2, p40_D1D2 und p40_D2D3 interagiert und daher für die alleinige Interaktion mit p19 die D2 Domäne von p40 genügt. Überraschenderweise sind die kritischen Aminosäuren, mit Ausnahme von C197, in p40_D3 lokalisiert [48]. Die *site I* Interaktion von p35 und p40 führt zu einer Änderung der Konformation, wobei die Domäne D3 von p40 um $14,5^\circ$ gegenüber der Domäne D2 rotiert [30]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die *site I* Interaktion mit p19 sowohl die Domänen p40_D2 und D3 erforderte (siehe Abbildung 10) [48]. Dies deutet darauf hin, dass eine Änderung der Konformation nach der Bindung von p40_D2 und p19 die Interaktion mit p40_D3 ermöglicht. Obwohl die Interaktion von p19 und p40 keine notwendige Beteiligung der Domäne p40_D1 zeigte, induzierte keine der Deletionsvarianten bei Ko-Stimulation mit p19 die Proliferation der IL-23 responsiven Zellen. So ist die Domäne D3 zwar nicht die alleinige verantwortliche Komponente für die direkte Interaktion mit p19, jedoch verhinderten die Mutationen die Ausbildung eines biologisch aktiven Komplexes [48]. Aufgrund der Beteiligung der Domänen p40_D2 und D3 als verantwortliche Komponenten der Interaktion mit der Zytokinuntereinheit p19 bestätigte sich daher ebenfalls die charakteristische Funktion als ZHR Domänen.

7.2.2 Interaktion von p40 mit p35

Die Untereinheit p40 dient sowohl als heterodimerisierende Komponente von IL-23 (p40/p19) als auch von IL-12 (p40/p35) [6,8]. Die Interaktion der löslichen α -Rezeptoruntereinheit p40 und der Zytokinuntereinheit p35 folgt dabei der klassischen *site I* Definition [5]. Analog zu IL-23 wird hier ebenso die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen p40 (human: C199, murin: C197) und der Zytokinuntereinheit p35 beschrieben (human: C96, murin: C92) [27,30,33].

Die Relevanz dieser kovalenten Wechselwirkung in murinem IL-12 wurde in Publikation 2 (siehe Kapitel 4) dieser Arbeit untersucht [49]. Im Gegensatz zu p19 sekretierte p35 nur in Kombination mit p40 in Zellkulturüberstände ko-transfizierter HEK293 Zellen, wobei die Mutation p40_C197A eine verringerte p35 Sekretion bewirkte. Die entsprechende Mutation des zur Ausbildung der Disulfidbrücke erforderlichen Cysteins in p35 (p35_C92A, p35_C92S) und dessen Ko-Transfektion mit p40 oder die Kombination der mutierten Proteine p35_C92A oder p35_C92S mit p40_C197 führten jedoch weiterhin zur Sekretion beider Untereinheiten [49].

Dies steht in Übereinstimmung mit den von Yoon *et al.* publizierten Ergebnissen, deren Mutation des Cysteins im humanen p35_C74 und dessen Ko-Transfektion mit p40 die Sekretion von intaktem IL-12 in konditioniertes Medium induzierte [30].

Wie in Kapitel 7.1 beschrieben, weisen die von Jones *et al.* als kritisch identifizierten Aminosäuren in p35 teilweise Ähnlichkeiten mit den *site I* vermittelnden Aminosäuren in p19 auf (p19_A178= p35_N206, p19_R179= p35_R207) [8,48,152]. Für die Relevanz der Disulfidbrücke bestätigte sich jedoch keine solche Vergleichbarkeit zwischen p35 und p19, da diese nicht für die Ausbildung und Sekretion des heterodimeren IL-12 erforderlich war [49]. Diese Beobachtung lässt sich anhand der strukturellen Unterschiede beider Zytokinuntereinheiten erklären. So werden die *site I* Interaktionen von p35, wie bei p19, primär über die Helices A und D vermittelt [33]. Ein besonderer Unterschied besteht jedoch darin, dass p35 am C-terminalen Ende der AB-Schleife über eine zusätzliche Disulfid-verbrückte Schleife aus 11 Aminosäuren verfügt. Neben zahlreichen weiteren Kontakten zu p40 vermittelt diese Region ebenfalls die genannte Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen der beiden IL-12 Untereinheiten [30,33]. Dieser strukturelle Unterschied und die erhaltenen Daten deuten daher darauf hin, dass die Ausbildung der Disulfidbrücke für die Heterodimerisierung von p40 und p35 vernachlässigbar ist [49].

Auch die Untersuchung der biologischen Aktivität steht in Übereinstimmung mit dieser Annahme, da bei Verwendung der mutierten Proteine die Zellproliferation IL-12 responsiver

Ba/F3 Zellen (IL-12R β 1/IL-12R β 2) keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zur Stimulation mit den Wildtyp-Proteinen aufwies [49]. Dies bestätigte sich ebenso für die intrazelluläre Phosphorylierung von STAT3 oder die IL-12 typische IFN- γ Produktion. Lediglich die Kombination von p35 und p40_C197A führte zu einer geringeren Aktivität, wobei dies jedoch auf die verminderte Sekretion von p35 zurückzuführen ist. Die Verwendung von gereinigtem p35 oder p35_C92A mit p40_C197A aus Zellkulturüberständen bestätigte eindeutig die biologische Aktivität des rekonstituierten IL-12 [49]. Diese Ergebnisse lassen daher schlussfolgern, dass die Ausbildung der Disulfidbrücke keine essentielle Notwendigkeit für die Ausbildung der *site I* Interaktion aufweist.

Interessanterweise wurde bereits die Bildung von p40 Homodimeren im Kontext einer antagonistischen Wirkung bezüglich der IL-12 und IL-23 induzierten Signalwege beschrieben [35,153,154]. In Publikation 2 dieser Arbeit wurde gezeigt, dass diese Homodimerisierung in Abhängigkeit des p40_C197 steht, da dessen Mutation in nicht-reduzierenden SDS-Gelen die Disulfid-verbrückte Dimerisierung verhinderte [49].

Demzufolge übernimmt die Ausbildung der Disulfidbrücke für die Interaktion von p40_C197 mit p19 eine wichtige Rolle, wohingegen p40_C197 und p35_C92 nicht als kritische Aminosäuren der *site I* Interaktion von p40 mit p35 einzustufen sind. Da die erhaltenen Daten zeigten, dass die Interaktion von p35 und p40 keine Ausbildung der Disulfidbrücke für die biologische Aktivität erforderte, ist ebenfalls zu berücksichtigen, dass auch die Homodimerisierung von p40 weitere und möglicherweise essentiellere Wechselwirkungen einschließt.

7.3 Charakterisierung der *site II* Interaktion von p19 mit IL-12R β 1

Bei der Untersuchung der *site II* Interaktion zwischen IL-23 und IL-12R β 1 wurde das vorausgesagte Paradigma nicht bestätigt, sondern ein nicht-kanonischer Mechanismus identifiziert [48]. Bisher galt die Annahme, dass die *site II* zwischen der ZHR eines Rezeptors und der Zytokinuntereinheit, also p19, ausgebildet wird [5]. Sowohl IL-23R als auch IL-12R β 1 verfügen über diese zwei FN-III Domänen der ZHR. Da die *site III* Interaktion die Ig-ähnliche Domäne eines der Rezeptoren erfordert, kommt für diese Wechselwirkung nur IL-23R in Betracht [5]. Durch das Fehlen einer Ig-ähnlichen Domäne bei IL-12R β 1 erfolgt die *site II* Interaktion folglich zwischen p19 und IL-12R β 1.

Die in Publikation 1 erhaltenen Ergebnisse der Ko-Immunopräzipitationsassays zeigten erst bei Verwendung ko-transfizierter Lysate (p19/p40) eine Interaktion von p19 mit IL-12R β 1, jedoch nicht bei der alleinigen Ko-Präzipitation von p19 mit dem Rezeptor [48]. Die anhand des murinen Modells vorausgesagten Aminosäuren, die eine potentielle Interaktionsfläche mit dem Rezeptor liefern, wurden mittels Mutagenese-PCR in p19 eingeführt. Die Ergebnisse des Zellviabilitätsassays bei der Ko-Stimulation von p40 mit p19_L36E, p19_R38E oder p19_L135E führten, ebenso wie der Wildtyp, weiterhin zu der Bildung aktiver Komplexe, welche befähigt waren, die Signaltransduktion zu initiieren. Auch die Untersuchung der Ko-Immunopräzipitation von p40 und den mutierten p19 Varianten mit IL-12R β 1, zeigte weiterhin die Wechselwirkung der Proteine miteinander. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die klassische *site II* Definition nicht bestätigt. Auch die Verwendung dieser potentiell kritischen Aminosäuren als kombinierte Trippelmutante führte zu keinem gegenteiligen Resultat. Des Weiteren wurde in Publikation 1 dieser Arbeit gezeigt, dass p40 ohne die Interaktion mit p19 in der Lage war, IL-12R β 1 zu binden [48].

Wie in Kapitel 7.2.2 beschrieben, dimerisiert p40 nicht nur mit p19 und p35, sondern bildet ebenfalls Homodimere [49]. Dies steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass p40 Homodimere IL-12R β 1 binden und infolge dieser Antagonisierung die Weiterleitung des IL-12 und des IL-23 Signalwegs inhibieren [35,154]. Außerdem wurde bereits gezeigt, dass p40 Homodimere in der Lage sind, Makrophagen über die Bindung des IL-12R β 1 zu aktivieren und p40 daher nicht nur für die Bindung an den Rezeptor benötigt wird, sondern auch eine funktionelle Rolle übernimmt [153]. Anhand der verschiedenen Deletionsvarianten von p40 wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Interaktion von p40 mit IL-12R β 1 lediglich die Kombination der Domänen p40_D1 und p40_D2 erforderte [48]. Auch IL-12R β 1 verwendete für diese Interaktion nur seine Domänen D1 und D2 (siehe Abbildung 10). Zusätzlich wurden Mutationen in der Domäne D1 des IL-12R β 1 eingeführt, wobei Y143R eine deutliche Verringerung der Interaktion mit p40 bewirkte, welche durch die Kombination der Mutationen V116E/L117E/S118E sogar vollständig unterbunden wurde (siehe Abbildungen 9C, 13). Entgegen des postulierten Paradigmas zeigten die erhaltenen Ergebnisse, dass die Interaktion von IL-23 mit IL-12R β 1 keine Beteiligung von p19 benötigte.

Somit ergibt sich die Schlussfolgerung, dass diese Interaktion nicht durch die Ausbildung einer klassischen *site II* erfolgt, sondern vielmehr über einen nicht-kanonischen Mechanismus, der die Bindung von IL-23 über p40 an IL-12R β 1 vermittelt (siehe Abbildung 10) [48].

7.4 Charakterisierung der *site III* Interaktion von p19 mit IL-23R

Innerhalb des *site I-II-II* Paradigmas beschreibt *site III* die Interaktion zwischen der α -helikalen Zytokinuntereinheit mit der Ig-ähnlichen Domäne eines Rezeptors [5]. Dementsprechend erfolgt die *site III* Interaktion zwischen p19 und IL-23R. Für verschiedene Zytokine wird diese Interaktion hierbei hydrophoben Aminosäuren zugeordnet, die im N-terminalen Bereich der Helix D lokalisiert sind [54,55,155,156]. Im Fall von humanem IL-6 handelt es sich bei dieser kritischen Aminosäure um einen Tryptophanrest und bei Zytokinen, die mit LIFR interagieren (Onkostatin M (OSM), ziliärer neurotropher Faktor (*ciliary neurotrophic factor*, CNTF), leukämischer inhibitorischer Faktor (LIF)), um Phenylalanin [5].

Auch innerhalb der Struktur von IL-23_p19 existiert eine solche kritische und konservierte Aminosäure, wobei dieses Tryptophan (human: W156, murin: W157) in p19 eine ähnliche Lokalisierung wie die Aminosäure in IL-6 aufweist (humanes IL-6_W185, UniProtKB: P05231) [5,33,54]. Das Tryptophan p19_W157 ist innerhalb der Helix D des Vier-Helix-Bündels lokalisiert (siehe Abbildung 9A).

In Publikation 1 wurde die Beteiligung von p19_W157 an der Ausbildung der *site III* für die Komplexbildung zwischen IL-23 und IL-23R bestätigt [48]. Sowohl die Ko-Stimulation der Ba/F3-IL-12R β 1-IL-23R Zellen mit p19_W157A und p40, als auch die Verwendung des Fusionsproteins p40-p19_W157A-Fp, führten hierbei zum Ausbleiben der Zellproliferation. Auch die Präzipitation des IL-23R zeigte keine Interaktion mit den mutierten Proteinen (p19_W157A/p40, p40-p19_W157A-Fp), so dass diese Aminosäure als kritischer Rest für die *site III* zu betrachten ist (siehe Abbildung 9A) [48]. Humanes und murines p35 verfügen ebenfalls über eine solche Aminosäure, die jedoch hierbei durch Tyrosin repräsentiert wird [5]. Bei IL-27 (p28/EBI-3) zeigt die Mutation des konservierten Tryptophans in der Zytokinuntereinheit p28 zwar keinen Einfluss auf die Interaktion mit WSX-1 oder EBI-3, verhindert jedoch die Signalweiterleitung mittels gp130 und dient daher als Antagonist für IL-27 [157].

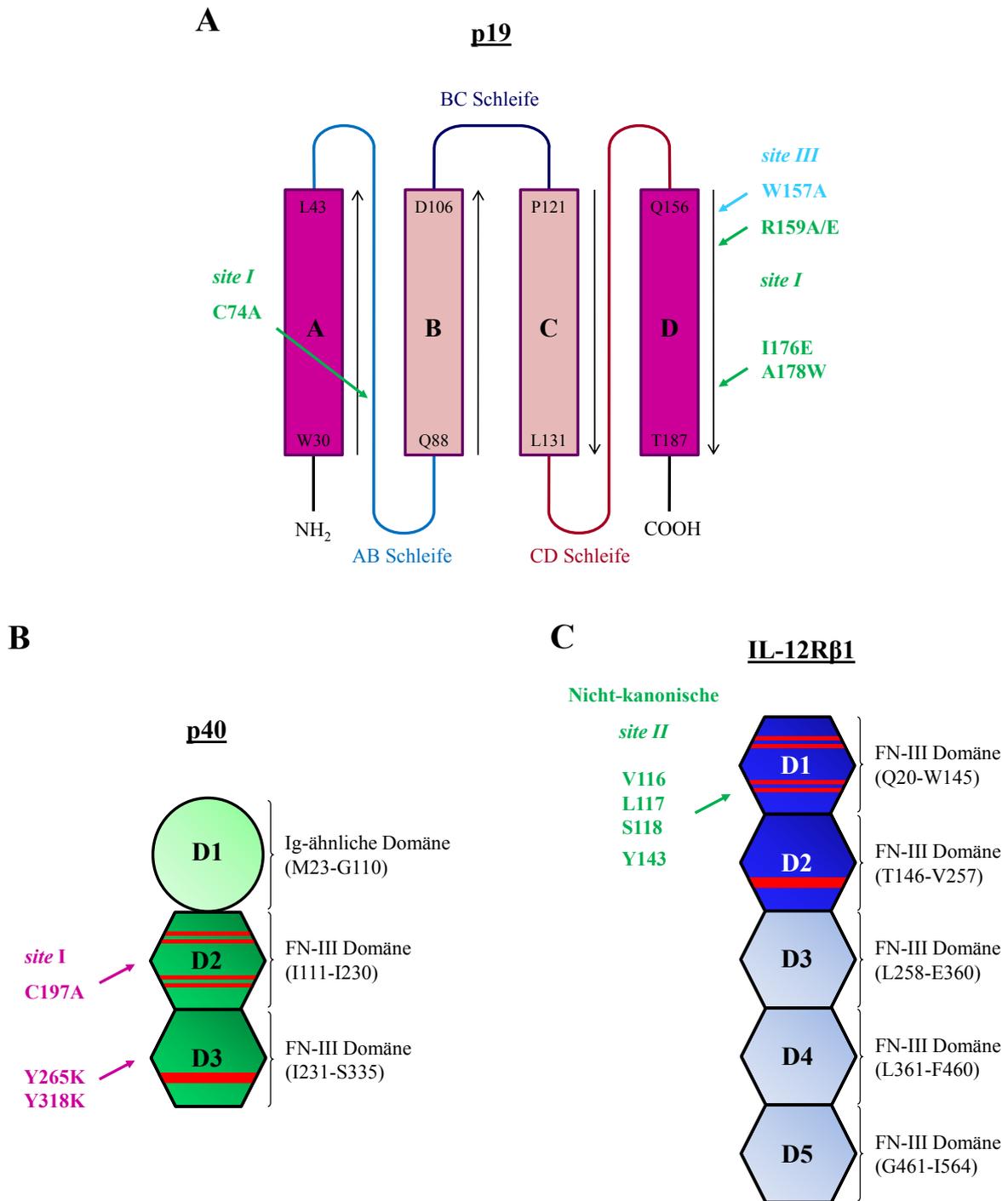


Abbildung 9: Schematische Darstellung identifizierter kritischer Aminosäuren in murinem IL-23.

A) Kritische Aminosäuren zur Ausbildung der *site I* und *site III* Interaktionen in p19. B) Kritische Aminosäuren zur Ausbildung der *site I* Interaktion in p40. C) Kritische Aminosäuren der nicht-kanonischen *site II* im IL-12Rβ1 zur Bindung von p40. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden lediglich die extrazellulären Domänen des Rezeptors dargestellt.

Interessanterweise wurde für die alleinige Verwendung von p19 keine Bindungsaffinität zu IL-23R nachgewiesen. Die Kombination von p19 und p40 führte jedoch zur Ko-Präzipitation beider Proteine mit dem Rezeptor [48]. Am Beispiel von IL-6 wurde gezeigt, dass dieses

Zytokin den Rezeptor gp130 erst mit hoher Affinität bindet, wenn zuvor die Interaktion mit IL-6R α erfolgt [39]. Auch die Bindung von IL-11 mit dem IL-11 Rezeptor (IL-11R) oder die Wechselwirkung von CNTF mit CNTFR ermöglicht erst die jeweilige Interaktion mit gp130. In jedem dieser Beispiele wird ein Rezeptor der nicht-signalisierenden Klasse benötigt, um die Interaktion mit dem signaltransduzierenden gp130 zu bewerkstelligen [39].

Da die Rekrutierung des IL-23R nicht allein durch p19 vermittelt wurde, sondern nur in Anwesenheit von p19 und p40 erfolgte, deutet dies darauf hin, dass auch p19 zunächst die lösliche, nicht-signalisierende α -Rezeptoruntereinheit p40 bindet und diese Interaktion die Bildung des hochaffinen Signalkomplexes induziert [48]. Anhand der Verwendung der p40 Deletionsvarianten wurde außerdem gezeigt, dass p40_D2D3 diese Interaktion von p19 mit IL-23R aufrecht erhielt. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls für das Fusionsprotein aus den beiden Untereinheiten p40_D2D3-p19 erhalten und zeigte daher, dass die p40_D1 Domäne nicht für die *site III* Interaktion benötigt wird (siehe Abbildung 10).

Anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Daten wird daher ein neues Model des *site I-II-III* Paradigmas definiert, in dem die *site I* und *site III* Interaktionen gemäß des kanonischen Musters erfolgen, die *site II* jedoch zwischen p40 und IL-12R β 1 gebildet wird (siehe Abbildung 10) [48].

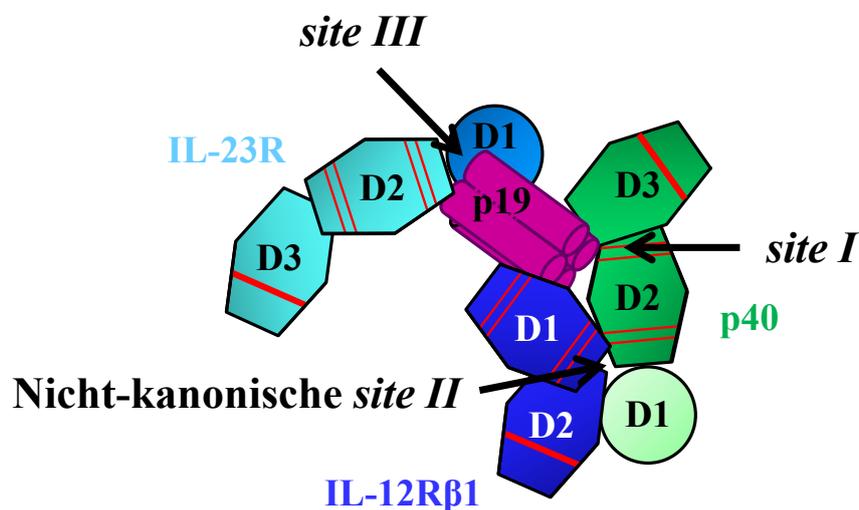


Abbildung 10: Experimentell bestimmte Definition des *site I-II-III* Paradigmas.

Die *site I* Interaktion wird über die Bindung der Domänen p40_D2D3 und p19 vermittelt. Erst infolge dieser Bindung entsteht die Interaktionsfläche zur Ausbildung der *site III* zwischen p19 und IL-23R. Die Bindung von IL-23 mit IL-12R β 1 erfordert keine Beteiligung von p19. Stattdessen erfolgt die Interaktion zwischen den Domänen p40_D1D2 und IL-12R β 1_D1D2 über eine nicht-kanonische *site II* [48].

7.5 Aktivierung eines homodimeren IL-23R Komplexes durch p40_D2D3-p19Fc

Die proinflammatorischen Eigenschaften von IL-23 basieren auf dessen Beteiligung an der terminalen Differenzierung und Proliferation von TH17-Zellen [158]. Auf diese Weise ist IL-23 in der Pathogenese verschiedener Autoimmun- und Entzündungserkrankungen, wie z.B. bei RA, MS oder entzündlichen Darmerkrankungen, involviert [151]. Daher stellt der IL-23 Signalweg ein wichtiges Ziel zur Entwicklung therapeutischer Substanzen dar. Die klinische Anwendung des p40 Antikörpers Ustekinumab, der zur Neutralisierung der Aktivität von IL-23 und IL-12 führt, zeigt jedoch keine reproduzierbare Effizienz bei Morbus Crohn [159,160]. Wie in Kapitel 7.3 beschrieben inhibieren Dimere von p40, durch ihre Bindung an IL-12R β 1, die Signaltransduktion, jedoch beeinflusst dies sowohl die IL-23 als auch die IL-12 induzierte Signalkaskade [35,154]. Anhand von Tiermodellen der EAE und CIA wurde gezeigt, dass die Zytokinuntereinheit p19 des IL-23 Heterodimers eine bedeutendere Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankungen spielt, als die ursprünglich angenommene p35 Zytokinuntereinheit von IL-12 [136,137]. IL-12 und IL-23 übernehmen außerdem vollkommen verschiedene Rollen bezüglich der Differenzierung von TH-Zellen, da IL-12 an der Entwicklung von TH1-Zellen beteiligt ist [80].

Weiterhin wurde gezeigt, dass p40, neben p19 und p35, auch CD5L bindet, aber dieser Komplex nicht in der Lage ist, die IL-12 typische Produktion von IFN- γ zu induzieren. Die Autoren vermuten daher, dass p40 verschiedene biologische Funktionen vermittelt [36]. Daher ist es von größter Bedeutung, Therapeutika mit spezifischen Fähigkeiten bezüglich der unterschiedlichen Signalwege zu entwickeln. So wurde bereits gezeigt, dass auch die ZHR Domäne des IL-23R *in vitro* IL-23 bindet, wodurch die Expression von ROR γ t unterdrückt und somit die Entwicklung von TH17-Zellen inhibiert wird [161].

In Publikation 1 wurde ein potentieller Antagonist, das Fusionsprotein p40_D2D3-p19-Fp, bezüglich seiner strukturellen und biologischen Eigenschaften charakterisiert [48]. Die zuvor diskutierten Ergebnisse der verschiedenen Deletionsvarianten von p40 zeigten, dass die Interaktion mit IL-23R die Bindung von p19 und den Domänen p40_D2D3 erforderte, jedoch keine Beteiligung der Domäne p40_D1 benötigte. Die Bindung von IL-23 an IL-12R β 1 erfolgte hingegen nur über die Domänen D1 und D2 von p40 (siehe Abbildung 11A). Eine Deletionsvariante des IL-23 Fusionsproteins p40-p19-Fp, die über p19 und die Domänen p40_D2D3 (p40_D2D3-p19-Fp) verfügt, stellt daher einen potentiellen Antagonisten für den

IL-23 Signalweg dar. Dieses deletierte Fusionsprotein verfügt über sämtliche Domänen zur Bindung des IL-23R, aber nicht über die Domäne p40_D1, welche für die Interaktion mit IL-12R β 1 erforderlich ist (siehe Abbildungen 11A, B). Die Ergebnisse der Ko-Immunopräzipitation bestätigten diese Annahme, da p40_D2D3-p19-Fp weiterhin mit IL-23R interagiert, jedoch keine Bindung an IL-12R β 1 nachgewiesen wurde [48].

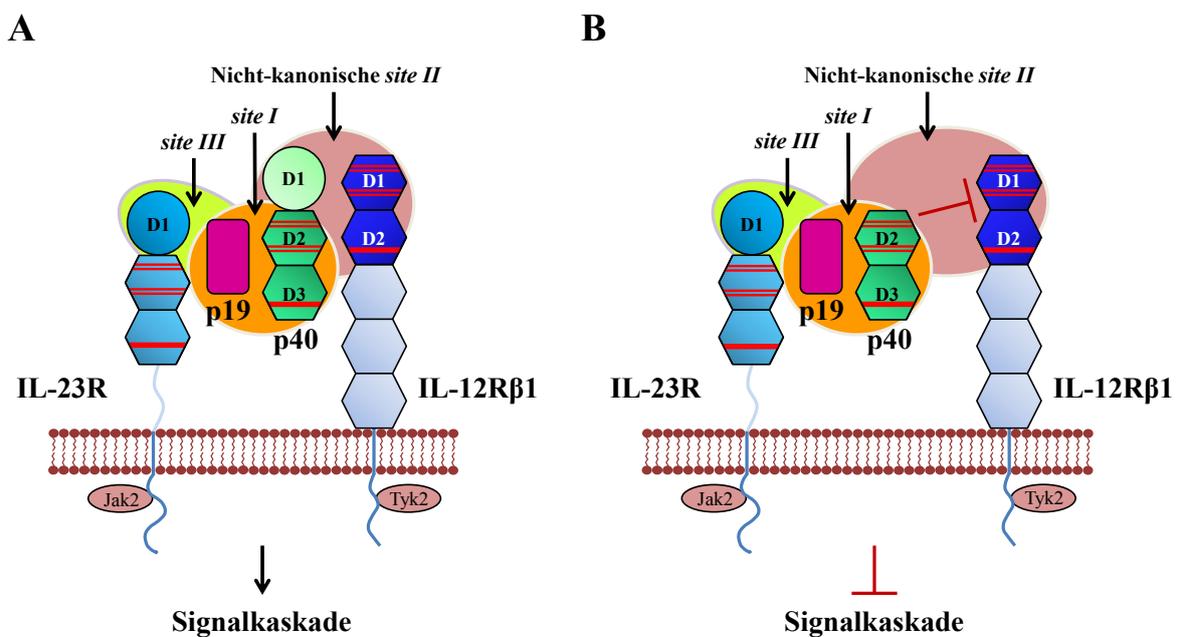


Abbildung 11: Domänenbasierte Entwicklung eines potentiellen IL-23 Antagonisten.

A) Schematische Darstellung relevanter Domänen von IL-23 zur Ausbildung der *site I-II-III* Interaktionen und zur effizienten IL-23 vermittelten Signaltransduktion. Die Bindung des IL-23R (*site III*) erfordert die Interaktion von p19 und p40_D2D3, wohingegen p40_D1D2 die Bindung des IL-12R β 1 über die nicht-kanonische *site II* vermittelt [48]. **B)** Schematische Darstellung der Domänen des potentiellen Antagonisten p40_D2D3-p19-Fp. Die Deletion von p40_D1 verhindert die Bindung des IL-12R β 1. Daher werden lediglich die *site I* und *site III* Interaktionen ausgebildet, nicht jedoch die nicht-kanonische *site II*. Somit soll die Weiterleitung der intrazellulären Signalkaskade unterbrochen werden [48]. Die Abbildungen sind modifiziert nach Di Cesare *et al.* [15,80].

Die Verwendung Fc-getaggtter Fusionsproteine findet vielfach Anwendung in der Entwicklung von Arzneimitteln [162]. Ein solches Beispiel ist unter Anderem die Fusion des TNF- α Rezeptors II (TNFR II) mit der Fc Domäne des humanen IgG1 (Enbrel[®], Etanercept), da dieses Fusionsprotein sowohl die Aktivität von membrangebundenem als auch von der löslichen Form von TNF- α neutralisiert [162-164]. Die Fc Domäne verlängert die Serum-Halbwertszeit von Proteinen, wobei dieser Effekt hauptsächlich infolge der pH-abhängigen Bindung durch den neonatalen Fc Rezeptor erfolgt, welcher die endosomale Degradierung des Proteins verhindert [162,165,166].

Interessanterweise wurde bei Untersuchung der biologischen Aktivität des gereinigten Fc-getaggtten p40_D2D3-p19 Fusionsproteins (p40_D2D3-p19Fc) die Weiterleitung des Signalwegs jedoch nicht inhibiert. Vielmehr wurde gezeigt, dass dieses Fusionsprotein in hohen Konzentrationen die Signaltransduktion sehr wahrscheinlich über die Rekrutierung von IL-23R Homodimeren induzierte [48].

Eine ähnliche Beobachtung wurde ebenfalls für ein verwandtes Zytokin der IL-12 Familie gefunden. So ist auch IL-35 (p35/EBI-3) in der Lage Hetero- und Homodimere seiner Rezeptoren gp130 und IL-12R β 2 zu rekrutieren [13]. Für IL-12R β 2 wurde gezeigt, dass Ba/F3 Zellen, die diesen Rezeptor stabil exprimieren, nach Stimulation mit IL-12 ebenfalls ein langsames Wachstum aufweisen [7]. Dies wurde jedoch nicht für IL-12R β 1 bestätigt und steht in Übereinstimmung mit den erhaltenen Daten dieser Arbeit, da p40_D2D3-p19Fc keine Proliferation von Ba/F3 Zellen bewirkte, die nur diesen Rezeptor stabil exprimieren [7,48]. Aufgrund der Bindung des gp130 Rezeptors verknüpft IL-35 die IL-12 Familie auch mit der IL-6 Familie der Zytokine [76].

IL-6 ist ebenfalls in der Lage über die Bindung des IL-6R α gleichzeitig mit zwei gp130 Rezeptoren zu interagieren. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass dieser Komplex sogar ein Hexamer aus zwei IL-6 Molekülen mit zwei IL-6R α und den beiden signaltransduzierenden β -Rezeptoren bildet [54]. Diesbezüglich lässt sich ebenfalls vermuten, dass die Aktivierung des IL-23R Homodimers über ein Dimer des Fusionsproteins p40_D2D3-p19Fc erfolgt. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass das Wildtyp p40-p19 Fusionsprotein lediglich die heterodimeren Rezeptoren aktivierte, jedoch keinen Einfluss auf die Aktivierung solcher Zellen nahm, die ausschließlich IL-23R exprimieren [48].

Die Fc Region verbessert häufig die biophysikalischen Eigenschaften ihrer Fusionspartner, z.B. die Löslichkeit und die Stabilität des Proteins. Außerdem sind Fc Proteine in der Lage Homodimere zu bilden [162]. Dies deutet daher ebenfalls auf eine mögliche Homodimerisierung des p40_D2D3-p19Fc, welche eine Aktivierung der IL-23R Homodimere induziert.

7.6 Kritische Tyrosinreste des IL-23R zur STAT3 Rekrutierung

IL-23 und IL-12 aktivieren das gleiche Spektrum an Jak und STAT Molekülen zur Initiierung der intrazellulären Signalkaskade (Jak2, Tyk2, Stat1, Stat3, Stat4, Stat5) [9]. Die intrazellulären Domänen von IL-23R und IL-12R β 2 interagieren hierbei mit Jak2, so dass infolge der Bindung des extrazellulären Liganden die Rekrutierung und Phosphorylierung der STAT Moleküle induziert wird. Im Vergleich zum IL-12 Signalweg, wobei hauptsächlich STAT4 aktiviert wird, stellt STAT3 die Hauptkomponente dieser Adapterproteine im IL-23 Signalweg dar [9].

In Publikation 3 (siehe Kapitel 5) wurden die an dieser Interaktion involvierten Tyrosin-Bindungsstellen des IL-23R identifiziert (siehe Abbildung 12B) [76]. Die intrazellulären Domänen von humanem und murinem IL-23R verfügen über sieben Tyrosinreste, wobei sechs dieser Aminosäuren konserviert vorliegen (siehe Abbildung 12A) [9].

Drei dieser Tyrosinreste repräsentieren hierbei potentielle Bindungsstellen für die Interaktion von Proteinen mit SH2 Domänen (human: Y397, Y484, Y611; murin: Y416, Y504, Y626). Bei Y542 handelt es sich um ein Tyrosin, das nur innerhalb der murinen Sequenz vorkommt, wohingegen Y636 nur in der intrazellulären Sequenz des humanen IL-23R vorhanden ist [9].

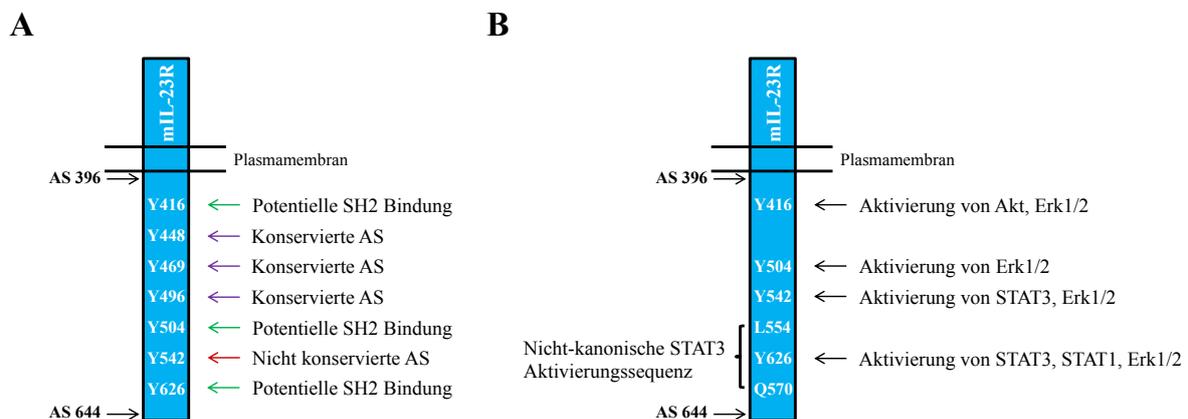


Abbildung 12: Schematische Darstellung beteiligter Aminosäuren zur Vermittlung der IL-23 induzierten Signaltransduktion im murinen IL-23 Rezeptor.

A) Darstellung der Tyrosinreste der intrazellulären IL-23R Domäne. Die Tyrosinreste Y416, Y504 und Y626 werden nach Parham *et al.* als potentiell beteiligte Aminosäuren zur Vermittlung der STAT Phosphorylierung beschrieben. Bei Y448, Y469 und Y496 handelt es sich um konservierte Tyrosinreste, wohingegen Y542 nicht konserviert ist [9]. **B)** Übersicht der in Publikation 3 identifizierten Aminosäuren zur Vermittlung der Signaltransduktion. Das nicht-konservierte Y542 und das vorausgesagte Y626 aktivieren die Phosphorylierung von STAT3, wobei Y626 ebenfalls STAT1 aktiviert. Bei der Sequenz L554 bis Q570 handelt es sich um eine nicht-kanonische Sequenz, die ohne Phosphorylierung des Y626 die Aktivierung von STAT3 induziert. Y416 aktiviert Akt und Erk1/2, wobei Y504/Y542/Y626 ebenfalls zur Erk1/2 Aktivierung beitragen [76]. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird der extrazelluläre Bereich des IL-23R nur angedeutet. (AS=Aminosäure).

Verschiedene Mutationen der Tyrosine zu Phenylalanin in der intrazellulären Domäne des murinen IL-23R zeigten, dass Y542 und Y626 die Phosphorylierung von STAT3 vermittelten [76]. Im Gegensatz hierzu wurde bei Mutation der einzelnen Aminosäuren kein Effekt beobachtet. Für Y504F wurde keine eindeutige Beteiligung gezeigt und auch für das postulierte Y416 wurde kein Effekt bezüglich der STAT3 Aktivierung bestätigt [76].

Die Sequenz, welche die Phosphorylierung von STAT3 Molekülen vermittelt, wird durch das Motiv YXXQ charakterisiert [167]. Das Glutamin spielt im Hinblick auf die Rekrutierung von STAT3 eine wichtige Rolle. Bei einer Chimäre des *neurotrophic tyrosine kinase receptor type 3* (NTRK3), dessen intrazelluläre Domäne gegen die des EpoR getauscht und N-terminal mit dem YMPQ Motiv des gp130 fusioniert wurde, verhindert die Mutation des Glutamins die Phosphorylierung von STAT3 [167].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass weder die einzelnen Mutationen von Y504, Y542 oder Y626 zu Phenylalanin bzw. die Kombinationen Y504F/Y542F und Y504F/Y626F zu einer Verringerung der STAT3 Phosphorylierung führten [76].

Das Tyrosin in Position 504 (GYKPQISN) des IL-23R repräsentiert zwar das Motiv für STAT3 in seiner Sequenz und ähnelt auch der zur Aktivierung von STAT4 erforderlichen Sequenz des IL-12R β 2 (GYLPSNID), wurde aufgrund der erhaltenen Ergebnisse jedoch nicht für die Phosphorylierung von STAT3 bestätigt [168].

Interessanterweise nimmt die Mutation des Y542 einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung von STAT3. Erst die Kombinationen von Y542F/Y626F und Y504F/Y542F/Y626F bewirkten eine Unterbindung der Phosphorylierung [76]. Das Y542 umgebene Motiv YPNFQ zeigt keine Konservierung im Vergleich mit anderen Organismen wie z.B. dem humanen Rezeptor (HPNFA) oder der Ratte (YPNFT). Die Sequenz Y542PNFQ verfügt jedoch über eine Ähnlichkeit mit dem postulierten STAT3 Motiv, so dass in dieser Arbeit mit YXXXQ ein weiteres Motiv für die Interaktion mit STAT3 vorgeschlagen wird [76]. Mit der Sequenz YFPQ zeigt auch Y626 das typische STAT3 Motiv YXXQ, wobei diese Sequenz ebenfalls auch als potentielles Motiv für die STAT1 Aktivierung betrachtet wird [169]. Daher spielen die Tyrosinreste Y542 und Y626 gemeinsam eine wichtige Rolle in der IL-23 vermittelten Signalkaskade und bestätigten die Involvierung der vorausgesagten, potentiellen SH2 Bindungsstelle Y626 [76].

Auch in gp130 sind vier dieser YXXQ Motive vorhanden und LIFR sowie der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) verfügen zweimal über dieses Motiv, so dass solche Rezeptorketten entsprechend multiple Sequenzen für die Vermittlung der STAT3 Aktivierung aufweisen [167,170,171]. Für gp130 wurde die

jeweilige Funktion der verschiedenen intrazellulären Tyrosine bestimmt. Die vier humanen Phosphotyrosinmotive von Y767, Y814, Y905 und Y915 repräsentieren Bindungsstellen für STAT3, wobei auch die Mutation der einzelnen Aminosäuren eine STAT3 Rekrutierung im Vergleich zum Wildtyp Rezeptor verringerte [172]. Y905 und Y915 sind ebenfalls in der Lage STAT1 zu rekrutieren und Y759 (murin: Y757) rekrutiert sowohl *steroid receptor co-activator homology-2 domain-containing phosphatase 2* (SHP2) als auch *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) 3 [167,169,173].

Anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Daten wird daher angenommen, dass die Tyrosinreste von mIL-23R/Y542/Y626 und somit deren flankierende Motive gemeinsam die Phosphorylierung von STAT3 vermitteln, weshalb hierbei auf einen synergistischen Effekt geschlossen werden kann [76]. In gp130 führt die Mutation der STAT3 rekrutierenden Tyrosine in den entsprechenden Bindemotiven von gp130 zu einer vollständigen Unterbrechung der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) [174].

Im Gegensatz hierzu bewirkte die Mutation der Aminosäuren Y504F/Y542F/Y626F bzw. Y542F/Y626F im IL-23R nur eine verringerte STAT3 Aktivierung bei Verwendung des murinen IL-23R in humanen HeLa Zellen, nicht aber beim humanen IL-23R oder murinen Ba/F3 Zellen [76]. Interessanterweise unterdrückten diese Mutationsvarianten des IL-23R nicht die IL-23 induzierte Proliferation von Ba/F3 Zellen, welche ebenfalls IL-12R β 1 stabil exprimieren. Dies deutet auf eine Beteiligung weiterer intrazellulärer Mechanismen, welche diesen Prozess induzieren. Diese Beobachtung zeigt, dass dieser Mechanismus deutlich komplexer ist als bei gp130 und deutet auch darauf hin, dass weitere nicht-kanonische Prozesse in die IL-23 vermittelte Signalweiterleitung involviert sind [76].

7.7 IL-23 abhängige STAT1 Aktivierung

Ebenso wie IL-23 induzieren auch andere Zytokine der IL-12 Familie die Aktivierung verschiedener Vertreter der STAT Proteine. Auch IL-6 induziert sowohl die Aktivierung von STAT1 als auch von STAT3, wobei diese über den Rezeptor gp130 erfolgt [1,167,169].

In Publikation 3 dieser Arbeit wurde daher ebenfalls die Rolle von IL-23 und IL-23R bezüglich der Aktivierung von STAT1 untersucht [76]. Die Sequenz YFPQ von Y626 spielt dabei eine besonders interessante Rolle, da sie nicht nur dem typischen STAT3 Motiv entspricht, sondern auch als potentielles Motiv für die STAT1 Aktivierung vorgeschlagen

wird. Dies lässt sich anhand des gp130 Rezeptors begründen, da dessen STAT3 rekrutierende Tyrosinreste mit der Sequenz YXPQ ebenfalls STAT1 aktivieren (humanes gp130: Y905LPQ, Y915MPQ) [169].

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass mIL-23R/Y626F, im Gegensatz zum Wildtyp, nur eine geringe Phosphorylierung von STAT1 bewirkte [76]. Dies deutet darauf hin, dass Y626 sowohl eine Rolle bezüglich der Aktivierung von STAT1 als auch von STAT3 übernimmt. Auch die Variante mIL-23R/Y416F/Y504F/Y542F/Y626F führte, im Gegensatz zu mIL-23R/Y416F, zu einer verringerten STAT1 Phosphorylierung. Daher bestätigten die Ergebnisse die Notwendigkeit einer kanonischen Sequenz für die Tyrosin-abhängige Bindung der SH2 Domäne zur Phosphorylierung von STAT1 [76].

7.8 Identifizierung eines nicht-kanonischen Aktivierungsmotivs für STAT3

Die Generierung verschiedener Deletionsvarianten des IL-23R ermöglichte in Publikation 3 die Identifizierung eines Sequenzbereiches, welcher ebenfalls die Phosphorylierung von STAT3 vermittelt [76]. Die Variante mIL-23R/Y416F/Y504F/Y542F- Δ 554 induzierte keine Aktivierung von STAT3, wohingegen mIL-23R/Y416F/Y504F/Y542F- Δ 571 die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors vermittelte. Daher umfasst der nicht-kanonische Bereich 17 Aminosäuren des murinen Moleküls (L554-Q570), die entweder die direkte Interaktion mit SH2 Domänen ermöglichen oder als Bindungsbereich für bislang nicht-identifizierte Adapterproteine dienen, welche die Aktivierung von STAT3 vermitteln (siehe Abbildungen 12B, 13). Bei einem Vergleich von verschiedenen Säugetierspezies ist dieses Motiv innerhalb der zytoplasmatischen Domäne des IL-23R zwar konserviert, verfügt jedoch über keine bekannten Motive für die Interaktion mit intrazellulären Proteinen. Lediglich N-terminal der identifizierten Sequenz ist eine konservierte und potentielle Kaseinkinase (*casein kinase*, CK) 1 Phosphorylierungsstelle (S548ASS) vorhergesagt [76].

So wurde zwar für den OSM induzierten Signalweg eine Rolle des verwandten CK2 bezüglich der Aktivierung von STAT gezeigt, jedoch konnte bislang keine Interaktion dieser Proteine innerhalb der IL-12 Familie bestätigt werden [175]. Die Beteiligung eines nicht-kanonischen STAT Aktivierungsmotivs wurde bereits anhand des IL-22 Rezeptors (IL-22R) gezeigt [176]. Die hierbei identifizierte Sequenz umfasst 84 Aminosäuren, welche die konstitutive Aktivierung von STAT3 vermitteln.

In Übereinstimmung mit den in Publikation 3 erhaltenen Daten führt auch bei IL-22R die Mutation der zytoplasmatischen Tyrosine weiterhin zur STAT3 Phosphorylierung. Die Rekrutierung von STAT3 erfolgt stattdessen über dessen *coiled-coil* Domäne [176]. Dies unterstützt die Existenz eines nicht-kanonischen Aktivierungsmechanismus und lässt für IL-23R ebenfalls hinsichtlich einer solchen Interaktion spekulieren.

Eine Tyrosin-unabhängige Aktivierung von STAT3 wurde ebenfalls anhand des G-CSFR gezeigt. Hierbei vermuten die Autoren eine direkte Interaktion von STAT3 mit der Rezeptor-assoziierten Januskinase oder ziehen ebenfalls die Möglichkeit der Rekrutierung über eine bislang unbekannte Komponente des Rezeptors in Betracht [177].

7.9 IL-23 vermittelte Aktivierung von Erk1/2 und Akt

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich zudem mit der Interaktion der intrazellulären Domäne des IL-23R zur Aktivierung weiterer intrazellulärer Proteine. In Publikation 3 wurden Deletionsvarianten identifiziert, die ohne Phosphorylierung von STAT3 die Proliferation der entsprechenden Ba/F3 Zellen ermöglichen und daher andere Signaltransduktionswege den Prozess vermitteln [76]. Die IL-23 induzierte Phosphorylierung der PI3K wurde bereits von Cho *et al.* gezeigt, wobei hier keine Beteiligung der MAPK beobachtet wurde [88].

Anhand von mutierten und nicht-mutierten Deletionsvarianten des murinen und humanen IL-23R wurde in Publikation 3 gezeigt, dass die STAT3 Phosphorylierung nicht ausschlaggebend für die Induktion der Ba/F3 Zellproliferation ist [76]. Für den murinen Rezeptor wurde beobachtet, dass die Deletionsvariante mIL-23R- Δ 503 keine Phosphorylierung von STAT3 induzierte, aber die Proliferation der entsprechend transduzierten Ba/F3 Zellen (Ba/F3-IL-12R β 1-IL-23R- Δ 503) ermöglichte. Die Mutation des Tyrosins Y416F in der Deletionsvariante mIL-23R- Δ 503 (mIL-23R/Y416F- Δ 503) zeigte weder eine Aktivierung von STAT3, noch die Proliferation der entsprechenden Ba/F3 Zellen. Auch für die humane Chimäre des IL-23R, welche die murinen Domänen des extrazellulären Bereiches und der Transmembrandomäne mit der intrazellulären Domäne des humanen Rezeptors (mET/hC) verknüpft, wurde ein vergleichbares Ergebnis für die Deletionsvarianten hIL-23R(mET/hC)- Δ 476 (h= human) und hIL-23R(mET/hC)/Y397- Δ 476 erhalten. Dementsprechend wurde die Proliferation der Zellen daher über einen anderen Mechanismus

induziert, welcher in dem murinen IL-23R über Y416 und in dem humanen Rezeptor über Y397 vermittelt wurde [76].

Das Motiv YEDI (murin: Y416EDI, human: Y397EDI) ist am C-terminalen Ende einer putativen Jak2 Bindungsstelle lokalisiert und gilt als potentielle Interaktionsstelle für die Wechselwirkung mit der Tyrosinphosphatase SHP2 [9,87,178]. Auch für Zytokine der IL-6 Familie wurde eine Verknüpfung mit der Aktivierung der MAPK Signalkaskade gezeigt, da IL-6, LIF, OSM und IL-11 die MAPK Kaskade induzieren [179]. Die Phosphorylierung des humanen gp130_Y759 (murin: Y757) ermöglicht die Rekrutierung von SHP2, wobei die anschließende Phosphorylierung dieser Tyrosinphosphatase zur Rekrutierung des Adapterproteins *growth factor receptor-bound protein* (GRB) 2 führt und somit die Verknüpfung zur MAPK Signalkaskade herstellt [167,180,181]. Wie bereits in Kapitel 4.6 erwähnt, ermöglicht die Phosphorylierung dieses Tyrosins ebenfalls die Bindung von SOCS3 [173]. SOCS Proteine inhibieren die Aktivität von Zytokinen, da sie z.B. die Rekrutierung von STAT Molekülen verhindern oder durch die Bindung an Januskinasen deren Aktivierung unterdrücken [182]. So wurde bereits gezeigt, dass die Aktivität von SOCS3 die IL-6 induzierte STAT3 Rekrutierung an den Rezeptor gp130 ausschaltet [183].

In Publikation 3 wurde dagegen gezeigt, dass die IL-23 induzierte Aktivierung von STAT3 bei Ba/F3 Zellen, welche die murinen Rezeptoren IL-12R β 1 und IL-23R stabil exprimieren, mit zunehmender Zeit nicht verringert wurde [76]. Auch die Verwendung von Ba/F3 Zellen mit der mutierten Variante mIL-23R/Y416F/Y504F/Y542F/Y626F zeigte keine Verringerung der zeitabhängigen STAT3 Phosphorylierung, so dass Y416F keine Rolle bezüglich der Rekrutierung von SOCS Proteinen zugesprochen wird.

So verweisen die hier erhaltenen Ergebnisse auf eine IL-23 induzierte Beteiligung der MAPK Signalkaskade, da für IL-23 responsive Ba/F3 Zellen (IL-23R/IL-12R β 1) eine Phosphorylierung von Erk1/2 gezeigt wurde. Für diesen Aktivierungsprozess wurde die Beteiligung des Y416 bestätigt, da die Phosphorylierung von Erk1/2 in der Deletionsvariante mIL-23R- Δ 503 induziert wurde, aber nicht in der Variante mIL-23R/Y416F- Δ 503 beobachtet wurde (siehe Abbildungen 12B, 13). Die Mutation des Y416 in der Gesamtsequenz des IL-23R führte ebenfalls zur Aktivierung von Erk1/2. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung sowohl Y416 als auch ein zusätzliches C-terminales Motiv erfordert. Diesbezüglich wurde gezeigt, dass die Variante mIL-23R/Y416F/Y504F/Y542F/Y626F ebenfalls keine Phosphorylierung von Erk1/2 bewirkte und die Kombination der entsprechend mutierten Tyrosinreste Y504F/Y542F/Y626F daher Teil dieses C-terminalen Motivs darstellen. Hierbei ist jedoch nicht auszuschließen, dass innerhalb dieser Kombination

nicht alle Tyrosinreste für die Phosphorylierung von Erk1/2 erforderlich sind. Die Daten deuten ebenfalls darauf hin, dass die STAT3 unabhängige Zellproliferation möglicherweise durch die Aktivierung von Erk1/2 vermittelt wird [76].

Die molekulare Interaktion zwischen Jaks und SHP2 mit daraus resultierender SHP2 Phosphorylierung wurde bereits gezeigt und unterstützt ebenfalls die Involvierung von Y416 in der IL-23 vermittelten Signalkaskade [184].

In Publikation 4 (siehe Kapitel 6) wurde außerdem bestätigt, dass auch IL-12R β 1, infolge der IL-12 stimulierten Aktivierung, eine Phosphorylierung von Erk1/2 vermittelte [71].

Weiterhin wurde in Publikation 3 gezeigt, dass Y416 eine kritische Rolle im Hinblick auf die Aktivierung von PI3K/Akt übernimmt (siehe Abbildungen 12B, 13) [76]. Bereits Cho *et al.* zeigten eine solche IL-23 abhängige Aktivierung der PI3K, wobei im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen die Inhibition der PI3K auch die STAT3 Phosphorylierung unterdrückte [88].

Für Y416 wurde zwar keine Beteiligung an der Aktivierung von STAT3 gezeigt, jedoch liegt diese Aminosäure innerhalb der postulierten Jak2 Bindungsstelle, weshalb vermutet wird, dass dieses Y416 ebenfalls für die effiziente Jak Bindung erforderlich ist [71,76,87].

7.10 Charakterisierung der Bindung von Jak2 mit IL-23R

Die Aktivierung der Kinase Jak2 wurde bereits für verschiedene Zytokinrezeptoren gezeigt, wie z.B. für den Rezeptor gp130, den IFN- γ Rezeptor (IFN- γ R) 2 oder für die β -Kette des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor Rezeptors (*granulocyte-macrophage-colony stimulating factor receptor*, GM-CSFR), welcher die Signaltransduktion des Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierenden Faktors (*granulocyte-macrophage-colony stimulating factor*, GM-CSF), IL-3 und IL-5 vermittelt [185-187].

Auch die konstitutive Interaktion von Jak2 mit IL-23R wurde bereits demonstriert [9]. In Publikation 4 (siehe Kapitel 6) dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Stimulation Jak2 defizienter Fibrosarkom-Zellen (γ 2A), welche die Rezeptoren IL-12R β 1 und IL-23R transient exprimieren, keine IL-23 induzierte Phosphorylierung von STAT3 ermöglichte. Diese Beobachtung stellt den direkten Zusammenhang zwischen der Aktivierung dieser Proteine her und zeigt, dass die enzymatische Aktivität der Kinase Jak2 absolut notwendig für die IL-23 vermittelte Signaltransduktion ist [71]. Für eine mögliche Interaktion wurde hierbei der

Sequenzbereich von I403 bis E417 innerhalb der zytoplasmatischen Sequenz des IL-23R vorausgesagt [87].

Die Interaktion von Januskinasen erfolgt bei verschiedenen Rezeptoren über die sogenannten Box 1 und Box 2 Motive, die sich innerhalb der zytoplasmatischen Rezeptordomäne befinden [45]. Die hochkonservierte Membran-proximale Box 1 weist eine prolinreiche Sequenz auf, die allgemein als $\phi\phi\text{PX}[\text{I/V}]\text{PXP}[\text{E/K}]$ (ϕ = hydrophobe Aminosäure; P= Prolin; X= beliebige Aminosäure, I= Isoleucin, V= Valin; E= Glutaminsäure; K= Lysin) charakterisiert wird [45]. Box 2 hingegen ist C-terminal von Box 1 lokalisiert und wird durch die Sequenz $\phi\text{E}\phi\phi$ beschrieben [45].

Für die Identifizierung der Jak2 Bindungsstelle im IL-23R wurden in Publikation 4 verschiedene Deletionsvarianten des Rezeptors generiert, wobei weder die Deletion der postulierten Jak2 Bindungsstelle noch die Mutation des in dieser Sequenz enthaltenen Y416F die Bindung von Jak2 verhinderte [71]. Dementsprechend wurde die vorausgesagte Jak2 Bindungsstelle nicht bestätigt.

Vielmehr wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Interaktion im Bereich der Sequenz von E455 bis E479 vermittelt wird, wobei eine Sequenzanalyse weder die Präsenz eines Box 1 oder Box 2 Motivs nachweist (siehe Abbildung 13).

Daher wird auch für die Interaktion dieser Januskinase vermutet, dass ein nicht-kanonischer Mechanismus die Assoziation beider Moleküle vermittelt bzw. ein bislang nicht identifiziertes Motiv hierfür verantwortlich ist [71]. So wurde auch für die Interaktion von Jak1 mit IFN- γ R α und dem IL-10 Rezeptor (IL-10R) α ein alternatives Motiv, welches als Box 2B bezeichnet wird, identifiziert und bestätigt daher, dass die Signaltransduktion solcher Rezeptoren über unterschiedliche Sequenzbereiche vermittelbar ist [45].

7.11 Assoziation der Januskinase Tyk2 mit IL-12R β 1

Die Publikation 4 dieser Arbeit betrachtete unter Anderem die Beteiligung des IL-12R β 1 an der IL-23 vermittelten Signalkaskade [71]. Dieser Rezeptor dient sowohl als heterodimerisierende Komponente des IL-23R, bildet aber auch mit IL-12R β 2 einen funktionellen Komplex, der durch IL-12 aktivierbar ist [7,9]. Über die Verwendung von IL-12R β 1 Chimären, deren extrazelluläre Domänen gegen die des EGFR ausgetauscht wurden, wurde bereits die spezifische Interaktion der intrazellulären Domäne von IL-12R β 1 mit Tyk2 gezeigt [65].

Die Aktivierung von Tyk2 durch IL-12R β 1 wurde in Publikation 4 dieser Arbeit bestätigt (siehe Abbildung 13) [71]. Tyk2 defiziente Fibrosarkom-Zellen, welche die beiden Rezeptoren (IL-23R/IL-12R β 1) transient exprimieren, zeigten nach Stimulation mit IL-23 nur eine geringfügige Phosphorylierung von STAT3.

Die Tyk2 Defizienz verhinderte die STAT3 Aktivierung hierbei nicht vollständig, so dass die Phosphorylierung vermutlich über die Substitution einer anderen Januskinase erfolgt [71]. Ein solcher Mechanismus wurde bereits für Chimären des IFN- γ R2 gezeigt [188].

7.12 IL-23 induzierte Rolle Tyk2-bindender Motive des IL-12R β 1

Der murine IL-12R β 1 verfügt über einen einzelnen Tyrosinrest innerhalb der intrazellulären Domäne, wohingegen die humane Variante keine phosphorylierbaren Tyrosine besitzt [43]. Daher wurde für diesen Rezeptor bislang keine direkte Beteiligung bezüglich der Signalweiterleitung vermutet. So wurde gezeigt, dass IL-12R β 1 im IL-12 Signalweg hauptsächlich der Bindung des Zytokins dient, wohingegen IL-12R β 2 die biologische Antwort vermittelt [66]. Auch in der IL-23 vermittelten Signaltransduktion wird IL-23R als die einzige signaltransduzierende Rezeptorkette betrachtet und angenommen, dass der IL-12R β 1 lediglich der Ausbildung der hochaffinen Interaktion des Komplexes dient [76].

Im Gegensatz zu dieser Aussage steht jedoch die bereits in Kapitel 4.3 erwähnte Beobachtung, dass p40 Homodimere Makrophagen über IL-12R β 1 aktivieren und dieser Rezeptor daher eine funktionelle Rolle übernehmen muss [153].

In Publikation 4 dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Deletionen des C-terminalen Bereiches von IL-12R β 1 ab Position 628 die Proliferation der entsprechend mit IL-23R ko-transduzierten Ba/F3 Zellen und die Phosphorylierung von STAT3 verhinderten [71]. Innerhalb dieses Bereiches befindet sich ein potentiell Box 1 Motiv (Box 1: $\phi\phi$ PX[I/V]PXP[E/K]), welches für die Interaktion mit Januskinasen vorausgesagt wird [45]. Dieses Motiv umfasst mit der Sequenz LCPPLTPC die Aminosäuren 598 bis 606. Zwar führte die Verlängerung der intrazellulären Domäne in den Deletionsvarianten Δ 634 und Δ 638 zu einer leichten Rückgewinnung der biologischen Aktivität, jedoch wurde gezeigt, dass erst eine Wildtyp-ähnliche Aktivität bei einer Sequenzlänge bis einschließlich Q656 wiedererlangt wurde [71]. Innerhalb dieses Bereiches befindet sich eine weitere konservierte Sequenz, bestehend aus den Aminosäuren V641VEMPGDRGDGTE653, welche möglicherweise als Box 2 Motiv fungiert (Box 2: ϕ E $\phi\phi$) [45,71]. Dies deutet darauf hin, dass

nicht nur das Box 1 Motiv, sondern auch das Box 2 Motiv eine wichtige Rolle für die IL-23 induzierte Signaltransduktion des IL-12R β 1 spielt (siehe Abbildung 13).

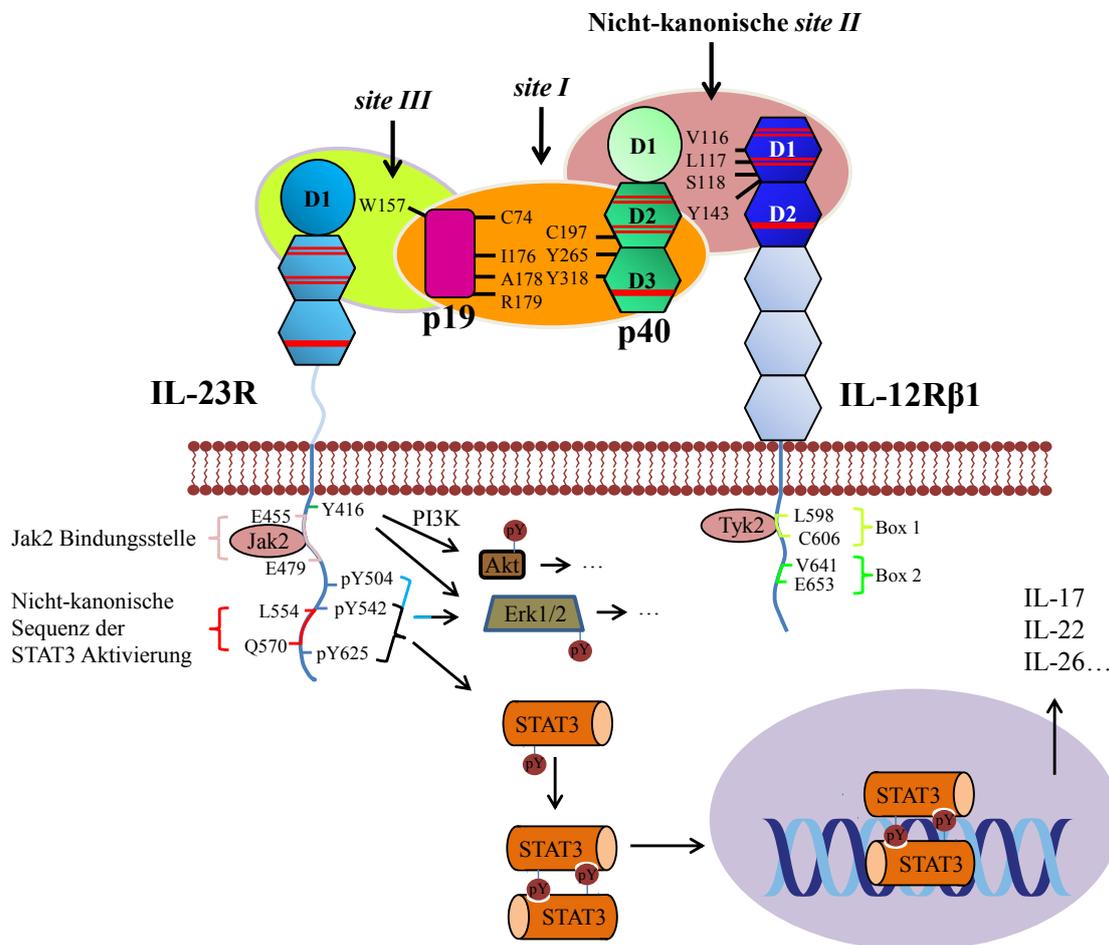


Abbildung 13: Zusammenfassende Darstellung signalvermittelnder Aminosäuren und Domänen des IL-23 Rezeptorkomplexes sowie der aktivierten Signalwege.

Die Aktivierung des IL-23 Rezeptorkomplexes erfordert zunächst die Interaktion von p19 mit p40_D2D3 über die *site I* (orange) [48]. Als kritische Aminosäuren dieser Interaktion wurden p19_C74, I176, A178, R179 und p40_C197, Y265 sowie Y318 identifiziert. Infolge dieser Bindung wird die Interaktionsfläche der *site III* (grün) gebildet, wobei p19_W157 die Bindung an die Ig-ähnliche Domäne D1 des IL-23R ermöglicht. Die Bindung an IL-12R β 1 erfordert lediglich die Domänen p40_D1D2, welche über eine nicht-kanonische *site II* (lila) mit den Domänen D1 und D2 des IL-12R β 1 interagieren. Als kritische Aminosäuren dieser Interaktion wurden IL-12R β 1_Y143 sowie die Kombination aus IL-12R β 1_V116_L117_S118 identifiziert [48]. Anschließend ermöglicht die Aktivierung des Rezeptorkomplexes die Aktivierung der assoziierten Januskinasen Jak2 und Tyk2. Jak2 bindet im Bereich der zytoplasmatische Sequenz E455-E479 des IL-23R, wohingegen Tyk2 an das Box 1 Motiv bindet, das sich im intrazellulären Bereich der Sequenz L598 bis C606 des IL-12R β 1 befindet [71]. Außerdem bewirkt die Präsenz des Box 2 Motivs in der intrazellulären Domäne des IL-12R β 1 die maximale Aktivierung der Signaltransduktion [71]. Die gegenseitige Phosphorylierung der Januskinasen führt zur Aktivierung ihrer Kinaseaktivität und ermöglicht anschließend die Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste IL-23R_Y542 und Y626 [72-76]. Diese phosphorylierten Tyrosinreste dienen als Adapterstellen für STAT3 Proteine, wobei Y626 ebenfalls eine Rolle in der Aktivierung von STAT1 übernimmt [75,76]. Des Weiteren vermittelt auch die nicht-kanonische Sequenz L554 bis Q570 die Aktivierung von STAT3 [76]. Die STAT Proteine werden durch die Januskinasen phosphoryliert, dimerisieren anschließend und translozieren in den Nukleus [62,77]. Dort regulieren sie die Transkription ihrer Zielgene nach Bindung an die entsprechenden Sequenzen der DNA [62]. Das Tyrosin Y416 in der zytoplasmatischen IL-23R Domäne übernimmt eine Rolle in der Aktivierung von Akt und vermittelt in Kombination mit Y504/Y542/Y626 ebenfalls die Phosphorylierung von Erk1/2 [76]. Die schematische Darstellung ist modifiziert nach Di Cesare *et al.* sowie Langrish *et al.* [15,80].

Bereits für den humanen GHR wurde mit Hilfe von Deletionsvarianten gezeigt, dass ein Großteil der intrazellulären Domäne nicht für die Signalweiterleitung benötigt wird [189]. Die effiziente Signaltransduktion erfordert hierbei lediglich 54 Aminosäuren, die sich direkt im C-terminalen Bereich der Transmembrandomäne befinden. Auch innerhalb dieser Aminosäuren lokalisiert sich ein Box 1 Motiv und die Verwendung einer verlängerten Sequenz, welche ebenfalls ein Box 2 Motiv einschließt, führt hier zu einer verstärkten Antwort. Die Autoren vermuten daher, dass die ersten 54 Aminosäuren für die Signaltransduktion ausreichend sind, aber dass zusätzliche zytoplasmatische Sequenzen die Signalübertragung der Rezeptoren modulieren bzw. für die Erreichung der maximal erreichbaren Signaltransduktion erforderlich sind [189].

Die in Publikation 4 dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse deuten auf eine vergleichbare Relevanz der Box 1 und Box 2 Motive für die Signaltransduktion des IL-12R β 1 hin [71]. Die Deletion der Box 1 Sequenz oder die Mutation der konservierten Prolinreste dieser Region (P601V/P603V/P605V) des IL-12R β 1 verhinderten hierbei die Proliferation der entsprechend mit IL-23R ko-transduzierten Ba/F3 Zellen. Die Deletion des potentiellen Box 2 Motivs führte dagegen nur zu einer Verringerung der Zellviabilität und setzte auch das Maß der STAT3 Aktivierung herab. Daher ermöglicht dieses Motiv wahrscheinlich die Induktion der maximal erreichbaren Signaltransduktion [71].

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Deletion der Box 1 die Präzipitation von Tyk2 mit IL-12R β 1, im Vergleich zum Wildtyp, deutlich verringerte, so dass dieses Motiv entsprechend für die Interaktion verantwortlich ist (siehe Abbildung 13) [71].

Die Notwendigkeit der Box 1 Motive für die effiziente Weiterleitung des intrazellulären Signals wurde auch anhand von Deletionsanalysen der zytoplasmatischen Domänen von humanen Klasse I Zytokinrezeptoren wie z.B. für GM-CSFR, der als signalvermittelnde Rezeptorkette in Kombination mit GM-CSF/GM-CSFR α , IL-3/IL-3 Rezeptor (IL-3R) α sowie IL-5/IL-5 Rezeptor (IL-5R) α dient, bestätigt [190]. Die Rolle der Box 1 und Box 2 Motive für IL-12R β 1 wurde in Publikation 4 anhand vergleichbarer Ergebnisse für die Zellproliferation infolge der Stimulation mit IL-12 bestätigt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen daher, dass die Bindung von Tyk2 an IL-12R β 1 zur Vermittlung der intrazellulären Signalkaskade unbedingt notwendig ist [71].

IL-12 und IL-23 aktivieren dasselbe Spektrum an STAT Molekülen, wobei die Rekrutierung jedoch in unterschiedlicher Favorisierung erfolgt [9]. Obwohl beide Zytokine STAT3 aktivieren, wird dieses Adapterprotein vielmehr durch den IL-23 Rezeptorkomplex rekrutiert, wobei das Box 1 Motiv des IL-12R β 1 essentiell ist [9,71].

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit erhaltenen Daten deuten an, dass die STAT3 Phosphorylierung der IL-12 vermittelten Signalkaskade möglicherweise eine zusätzliche Beteiligung von Box 2 erfordert [71]. Dies führt zu der Annahme, dass das Box 2 Motiv hierbei eine vermittelnde Rolle übernimmt und ist daher weiter zu untersuchen. IL-12R β 1 kontrolliert hierbei möglicherweise das Maß der rekrutierten STAT Moleküle und dient eventuell als entscheidender Faktor, der den Einfluss beider Zytokine in der Differenzierung von TH-Zellen reguliert. Auch andere Rezeptoren der IL-12 Familie werden über verschiedene Zytokine aktiviert. So verwendet beispielsweise IL-35 sowohl gp130 als auch IL-12R β 2 und bewirkt dabei die Phosphorylierung von STAT1 und STAT4 [5,13]. IL-27 signalisiert über gp130 und WSX-1 und aktiviert dabei STAT1 und STAT3 [5,18].

Die Tatsache, dass auch andere Zytokine dieselben Rezeptorketten nutzen und teilweise identische STATs aktivieren, deutet auf einen komplexen Mechanismus der Rekrutierung von STAT Molekülen hin, der möglicherweise über die, bislang als nicht-regulierend geltenden, Rezeptorketten beeinflusst wird.

Für die Aktivierung von Januskinasen innerhalb des IFN- γ Signalwegs wurde ein Model beschrieben, in dem die Rezeptoren in zwei Klassen eingeteilt werden [188]. Hierbei werden zum Einen solche Rezeptorketten betrachtet, die Bindungsstellen für STAT bzw. SH2 Domänen enthaltende Proteine und für Januskinasen aufweisen. Diese Rezeptorketten werden als *actual signal transducers* (ST) bezeichnet. Zum Anderen werden die Helferrezeptoren (HR) unterschieden, welche nur Januskinasen binden. Diesem Model entsprechend, ist IL-12R β 1 als HR zu betrachten, wohingegen IL-23R bzw. IL-12R β 2 die Funktion der ST übernehmen. Die Rolle der HR, welche keine funktionell wichtigen Tyrosinreste besitzen, wird darin gesehen, dass diese Rezeptoren eine zusätzliche Phosphotyrosinkinase-Aktivität einbringen [188]. Diese Hypothese wird in dieser Arbeit insofern unterstützt, dass die Deletion der identifizierten Bindungsstelle für Tyk2 (Box 1) die STAT3 Phosphorylierung unterdrückte [71].

Die Autoren postulieren, dass die intrazellulären Domänen der HR mit jeglicher Januskinase assoziieren können und keine Spezifität für die Signaltransduktion liefern [188]. Dies ist ebenfalls im Hinblick auf die Rezeptoren der IL-12 Familie weiter zu untersuchen.

8 Literaturverzeichnis

1. Heinrich, P, Behrmann, I, Müller-Newen, G, Schaper, F and Graeve, L (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical Journal* **334**: 297-314.
2. Belladonna, ML, Renauld, JC, Bianchi, R, Vacca, C, Fallarino, F, Orabona, C, Fioretti, MC, Grohmann, U and Puccetti, P (2002) IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells. *Journal of Immunology* **168**: 5448-5454.
3. Tisoncik, JR, Korth, MJ, Simmons, CP, Farrar, J, Martin, TR and Katze, MG (2012) Into the eye of the cytokine storm. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**: 16-32.
4. Wang, X, Lupardus, P, Laporte, SL and Garcia, KC (2009) Structural biology of shared cytokine receptors. *Annual Review of Immunology* **27**: 29-60.
5. Jones, L and Vignali, DA (2011) Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunologic Research* **51**: 5-14.
6. Wolf, SF, Temple, PA, Kobayashi, M, Young, D, Dicig, M, Lowe, L, Dzialo, R, Fitz, L, Ferez, C, Hewick, RM, Kelleher, K, Herrmann, SH, Clark, SC, Azzoni, L, Chan, SH, Trinchieri, G and Perussia, B (1991) Cloning of cDNA for natural-killer-cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T-cells and natural-killer-cells. *Journal of Immunology* **146**: 3074-3081.
7. Presky, DH, Yang, H, Minetti, LJ, Chua, AO, Nabavi, N, Wu, C-Y, Gately, MK and Gubler, U (1996) A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two β -type cytokine receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 14002-14007.
8. Oppmann, B, Lesley, R, Blom, B, Timans, JC, Xu, Y, Hunte, B, Vega, F, Yu, N, Wang, J, Singh, K, Zonin, F, Vaisberg, E, Churakova, T, Liu, M-R, Gorman, D, Wagner, J, Zurawski, S, Liu, Y-J, Abrams, JS, Moore, KW, Rennick, D, de Waal Malefyt, R, Hannum, C, Bazan, JF and Kastelein, RA (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**: 715-725.
9. Parham, C, Chirica, M, Timans, J, Vaisberg, E, Travis, M, Cheung, J, Pflanz, S, Zhang, R, Singh, KP, Vega, F, To, W, Wagner, J, O'Farrell, A-M, McClanahan, T, Zurawski, S, Hannum, C, Gorman, D, Rennick, DM, Kastelein, RA, de Waal Malefyt, R and Moore, KW (2002) A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R β 1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *Journal of Immunology* **168**: 5699-5708.
10. Pflanz, S, Timans, JC, Cheung, J, Rosales, R, Kanzler, H, Gilbert, J, Hibbert, L, Churakova, T, Travis, M, Vaisberg, E, Blumenschein, WM, Mattson, JD, Wagner, JL, To, W, Zurawski, S, McClanahan, TK, Gorman, DM, Bazan, JF, de Waal Malefyt, R, Rennick, D and Kastelein, RA (2002) IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4⁺ T cells. *Immunity* **16**: 779-790.
11. Pflanz, S, Hibbert, L, Mattson, J, Rosales, R, Vaisberg, E, Bazan, JF, Phillips, JH, McClanahan, TK, de Waal Malefyt, R and Kastelein, RA (2004) WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *Journal of Immunology* **172**: 2225-2231.
12. Devergne, O, Birkenbach, M and Kieff, E (1997) Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 12041-12046.
13. Collison, LW, Delgoffe, GM, Guy, CS, Vignali, KM, Chaturvedi, V, Fairweather, D, Satoskar, AR, Garcia, KC, Hunter, CA, Drake, CG, Murray, PJ and Vignali, DA (2012) The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nature Immunology* **13**: 290-299.
 14. Vignali, DA and Kuchroo, VK (2012) IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Immunology* **13**: 722-728.
 15. Langrish, CL, Chen, Y, Blumenschein, WM, Mattson, J, Basham, B, Sedgwick, JD, McClanahan, T, Kastelein, RA and Cua, DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine* **201**: 233-240.
 16. Wang, R-X, Yu, C-R, Dambuzza, IM, Mahdi, RM, Dolinska, MB, Sergeev, YV, Wingfield, PT, Kim, S-H and Egwuagu, CE (2014) Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nature Medicine* **20**: 633-641.
 17. Owaki, T, Asakawa, M, Morishima, N, Mizoguchi, I, Fukai, F, Takeda, K, Mizoguchi, J and Yoshimoto, T (2008) STAT3 is indispensable to IL-27-mediated cell proliferation but not to IL-27-induced Th1 differentiation and suppression of proinflammatory cytokine production. *Journal of Immunology* **180**: 2903-2911.
 18. Hibbert, L, Pflanz, S, de Waal Malefyt, R and Kastelein, RA (2003) IL-27 and IFN- α signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12R β 2 in naive T cells. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **23**: 513-522.
 19. Pirhonen, J, Matikainen, S and Julkunen, I (2002) Regulation of virus-induced IL-12 and IL-23 expression in human macrophages. *Journal of Immunology* **169**: 5673-5678.
 20. Chognard, G, Bellemare, L, Pelletier, AN, Dominguez-Punaro, MC, Beauchamp, C, Guyon, MJ, Charron, G, Morin, N, Sivanesan, D, Kuchroo, V, Xavier, R, Michnick, SW, Chemtob, S, Rioux, JD and Lesage, S (2014) The dichotomous pattern of IL-12R and IL-23R expression elucidates the role of IL-12 and IL-23 in inflammation. *PLoS One* **9**: e89092.
 21. Huising, MO, Kruiswijk, CP and Flik, G (2006) Phylogeny and evolution of class-I helical cytokines. *Journal of Endocrinology* **189**: 1-25.
 22. Gröttinger, J (2002) Molecular mechanisms of cytokine receptor activation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1592**: 215-223.
 23. Abdel-Meguid, SS, Shieh, HS, Smith, WW, Dayringer, HE, Violand, BN and Bentle, LA (1987) Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 6434-6437.
 24. Bazan, JF (1990) Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunology Today* **11**: 350-354.
 25. Ealick, SE, Cook, WJ, Vijay-Kumar, S, Carson, M, Nagabhushan, TL, Trotta, PP and Bugg, CE (1991) Three-dimensional structure of recombinant human interferon- γ . *Science* **252**: 698-702.
 26. Zdanov, A, Schalk-Hihi, C, Gustchina, A, Tsang, M, Weatherbee, J and Wlodawer, A (1995) Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon γ . *Structure* **3**: 591-601.
 27. Beyer, BM, Ingram, R, Ramanathan, L, Reichert, P, Le, HV, Madison, V and Orth, P (2008) Crystal structures of the pro-inflammatory cytokine interleukin-23 and its complex with a high-affinity neutralizing antibody. *Journal of Molecular Biology* **382**: 942-955.

28. Doucey, M-A, Hess, D, Blommers, MJJ and Hofsteenge, J (1999) Recombinant human interleukin-12 is the second example of a C-mannosylated protein. *Glycobiology* **9**: 435-441.
29. Schoenhaut, DS, Chua, AO, Wolitzky, AG, Quinn, PM, Dwyer, CM, McComas, W, Familletti, PC, Gately, MK and Gubler, U (1992) Cloning and expression of murine IL-12. *Journal of Immunology* **148**: 3433-3440.
30. Yoon, C, Johnston, SC, Tang, J, Stahl, M, Tobin, JF and Somers, WS (2000) Charged residues dominate a unique interlocking topography in the heterodimeric cytokine interleukin-12. *The EMBO Journal* **19**: 3530-3541.
31. Boulanger, MJ, Chow, D-C, Brevnova, EE and Garcia, KC (2003) Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 α -receptor/gp130 complex. *Science* **300**: 2101-2104.
32. Bork, P, Holm, L and Sander, C (1994) The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *Journal of Molecular Biology* **242**: 309-320.
33. Lupardus, PJ and Garcia, KC (2008) The structure of interleukin-23 reveals the molecular basis of p40 subunit sharing with interleukin-12. *Journal of Molecular Biology* **382**: 931-941.
34. Bazan, JF (1990) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 6934-6938.
35. Gillessen, S, Carvajal, D, Ling, P, Podlaski, FJ, Stremlo, DL, Familletti, PC, Gubler, U, Presky, DH, Stern, AS and Gately, MK (1995) Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *European Journal of Immunology* **25**: 200-206.
36. Abdi, K, Singh, NJ, Spooner, E, Kessler, BM, Radaev, S, Lantz, L, Xiao, TS, Matzinger, P, Sun, PD and Ploegh, HL (2014) Free IL-12p40 monomer is a polyfunctional adaptor for generating novel IL-12-like heterodimers extracellularly. *Journal of Immunology* **192**: 6028-6036.
37. Boulay, JL, O'Shea, JJ and Paul, WE (2003) Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. *Immunity* **19**: 159-163.
38. Liongue, C and Ward, AC (2007) Evolution of class I cytokine receptors. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 120.
39. Bravo, J and Heath, JK (2000) Receptor recognition by gp130 cytokines. *The EMBO Journal* **19**: 2399-2411.
40. Taga, T and Kishimoto, T (1997) Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annual Review of Immunology* **15**: 797-819.
41. Baran, P, Nitz, R, Grötzinger, J, Scheller, J and Garbers, C (2013) Minimal interleukin 6 (IL-6) receptor stalk composition for IL-6 receptor shedding and IL-6 classic signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **288**: 14756-14768.
42. Chua, AO, Chizzonite, R, Desai, BB, Truitt, TP, Nunes, P, Minetti, LJ, Warriar, RR, Presky, DH, Levine, JF, Gately, MK and Gubler, U (1994) Expression cloning of a human IL-12 receptor component: a new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *Journal of Immunology* **153**: 128-136.
43. Chua, AO, Wilkinson, VL, Presky, DH and Gubler, U (1995) Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor- β component. *Journal of Immunology* **155**: 4286-4294.
44. Hibi, M, Murakami, M, Saito, M, Hirano, T, Taga, T and Kishimoto, T (1990) Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* **63**: 1149-1157.

45. Usacheva, A, Sandoval, R, Domanski, P, Kotenko, SV, Nelms, K, Goldsmith, MA and Colamonici, OR (2002) Contribution of the Box 1 and Box 2 motifs of cytokine receptors to Jak1 association and activation. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 48220-48226.
46. Cunningham, BC, Ultsch, M, De Vos, AM, Mulkerrin, MG, Clauser, KR and Wells, JA (1991) Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* **254**: 821-825.
47. de Vos, AM, Ultsch, M and Kossiakoff, AA (1992) Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* **255**: 306-312.
48. Schröder, J, Moll, JM, Baran, P, Grötzinger, J, Scheller, J and Floss, DM (2015) Non-canonical interleukin 23 receptor complex assembly: p40 protein recruits interleukin 12 receptor β 1 via site II and induces p19/interleukin 23 receptor interaction via site III. *The Journal of Biological Chemistry* **290**: 359-370.
49. Aparicio-Siegmund, S, Moll, JM, Lokau, J, Grusdat, M, Schröder, J, Plöhn, S, Rose-John, S, Grötzinger, J, Lang, PA, Scheller, J and Garbers, C (2014) Recombinant p35 from bacteria can form interleukin (IL-)12, but not IL-35. *PLoS One* **9**: e107990.
50. Presky, DH, Minetti, LJ, Gillessen, S, Wilkinson, VL, Wu, C-Y, Gubler, U, Chizzonite, R and Gately, MK (1998) Analysis of the multiple interactions between IL-12 and the high affinity IL-12 receptor complex. *Journal of Immunology* **160**: 2174-2179.
51. Wang, X, Wilkinson, VL, Podlaski, FJ, Wu, C, Stern, AS, Presky, DH and Magram, J (1999) Characterization of mouse interleukin-12 p40 homodimer binding to the interleukin-12 receptor subunits. *European Journal of Immunology* **29**: 2007-2013.
52. Chow, D-C, He, X-L, Snow, AL, Rose-John, S and Garcia, KC (2001) Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex. *Science* **291**: 2150-2155.
53. Boulanger, MJ, Bankovich, AJ, Kortemme, T, Baker, D and Garcia, KC (2003) Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130. *Molecular Cell* **12**: 577-589.
54. Paonessa, G, Graziani, R, De Serio, A, Savino, R, Ciapponi, L, Lahm, A, Salvati, AL, Toniatti, C and Ciliberto, G (1995) Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp130 dimer formation and signalling. *The EMBO Journal* **14**: 1942-1951.
55. Deller, MC, Hudson, KR, Ikemizu, S, Bravo, J, Jones, EY and Heath, JK (2000) Crystal structure and functional dissection of the cytostatic cytokine oncostatin M. *Structure* **8**: 863-874.
56. O'Shea, JJ, Gadina, M and Schreiber, RD (2002) Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* **109**: S121-131.
57. Remy, I, Wilson, IA and Michnick, SW (1999) Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* **283**: 990-993.
58. Syed, RS, Reid, SW, Li, C, Cheetham, JC, Aoki, KH, Liu, B, Zhan, H, Osslund, TD, Chirino, AJ, Zhang, J, Finer-Moore, J, Elliott, S, Sitney, K, Katz, BA, Matthews, DJ, Wendoloski, JJ, Egrie, J and Stroud, RM (1998) Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature* **395**: 511-516.
59. Yoshimura, A, Zimmers, T, Neumann, D, Longmore, G, Yoshimura, Y and Lodish, HF (1992) Mutations in the Trp-Ser-X-Trp-Ser motif of the erythropoietin receptor abolish processing, ligand binding, and activation of the receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **267**: 11619-11625.
60. Dagil, R, Knudsen, MJ, Olsen, JG, O'Shea, C, Franzmann, M, Goffin, V, Teilum, K, Breinholt, J and Kragelund, BB (2012) The WSXWS motif in cytokine receptors is a

- molecular switch involved in receptor activation: insight from structures of the prolactin receptor. *Structure* **20**: 270-282.
61. Kurth, I, Horsten, U, Pflanz, S, Timmermann, A, Küster, A, Dahmen, H, Tacke, I, Heinrich, PC and Müller-Newen, G (2000) Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130. *Journal of Immunology* **164**: 273-282.
 62. Ortmann, RA, Cheng, T, Visconti, R, Frucht, DM and O'Shea, JJ (2000) Janus kinases and signal transducers and activators of transcription: their roles in cytokine signaling, development and immunoregulation. *Arthritis Research* **2**: 16-32.
 63. Watanabe, S and Arai, K-I (1996) Roles of the JAK-STAT system in signal transduction via cytokine receptors. *Current Opinion in Genetics & Development* **6**: 587-596.
 64. Bacon, CM, McVicar, DW, Ortaldo, JR, Rees, RC, O'Shea, JJ and Johnston, JA (1995) Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. *Journal of Experimental Medicine* **181**: 399-404.
 65. Zou, J, Presky, DH, Wu, C-Y and Gubler, U (1997) Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits $\beta 1$ and $\beta 2$ and JAK kinases. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 6073-6077.
 66. Wu, C-Y, Wang, X, Gadina, M, O'Shea, J, Presky, D and 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. *Journal of Immunology* **165**: 6221-6228.
 67. Ihle, JN (1995) The janus protein tyrosine kinases in hematopoietic cytokine signaling. *Seminars in Immunology* **7**: 247-254.
 68. Kisseleva, T, Bhattacharya, S, Braunstein, J and Schindler, CW (2002) Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* **285**: 1-24.
 69. Chishti, AH, Kim, AC, Marfatia, SM, Lutchman, M, Hanspal, M, Jindal, H, Liu, SC, Low, PS, Rouleau, GA, Mohandas, N, Chasis, JA, Conboy, JG, Gascard, P, Takakuwa, Y, Huang, SC, Benz, EJ, Jr., Bretscher, A, Fehon, RG, Gusella, JF, Ramesh, V, Solomon, F, Marchesi, VT, Tsukita, S, Tsukita, S, Arpin, M, Louvard, D, Tonks, NK, Anderson, JM, Fanning, AS, Bryant, PJ, Woods, DF and Hoover, KB (1998) The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends in Biochemical Sciences* **23**: 281-282.
 70. O'Neal, KD and Yu-Lee, LY (1993) The proline-rich motif (PRM): a novel feature of the cytokine/hematopoietin receptor superfamily. *Lymphokine and Cytokine Research* **12**: 309-312.
 71. Floss, DM, Klöcker, T, Schröder, J, Lamertz, L, Mrotzek, S, Strobl, B, Hermanns, H and Scheller, J (2015) Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor $\beta 1$ and interleukin 23 receptor to janus kinases. *Molecular Biology of the Cell* doi: 10.1091/mbc.E14-12-1645 [Epub ahead of print].
 72. Feng, J, Witthuhn, BA, Matsuda, T, Kohlhuber, F, Kerr, IM and Ihle, JN (1997) Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y¹⁰⁰⁷ in the kinase activation loop. *Molecular and Cellular Biology* **17**: 2497-2501.
 73. Gauzzi, MC, Velazquez, L, McKendry, R, Mogensen, KE, Fellous, M and Pellegrini, S (1996) Interferon- α -dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 20494-20500.

74. Pellegrini, S and Dusanter-Fourt, I (1997) The structure, regulation and function of the janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *European Journal of Biochemistry / FEBS* **248**: 615-633.
75. Watford, WT, Hissong, BD, Bream, JH, Kanno, Y, Muul, L and O'Shea, JJ (2004) Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunological Reviews* **202**: 139-156.
76. Floss, DM, Mrotzek, S, Klöcker, T, Schröder, J, Grötzinger, J, Rose-John, S and 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. *The Journal of Biological Chemistry* **288**: 19386-19400.
77. Schindler, C and Darnell, JE, Jr. (1995) Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annual Review of Biochemistry* **64**: 621-651.
78. Ihle, JN (1996) STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* **84**: 331-334.
79. Philp, JA, Burdon, TG and Watson, CJ (1996) Differential activation of STATs 3 and 5 during mammary gland development. *FEBS letters* **396**: 77-80.
80. Di Cesare, A, Di Meglio, P and Nestle, FO (2009) The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* **129**: 1339-1350.
81. Ota, N, Brett, TJ, Murphy, TL, Fremont, DH and Murphy, KM (2004) N-domain-dependent nonphosphorylated STAT4 dimers required for cytokine-driven activation. *Nature Immunology* **5**: 208-215.
82. Horvath, CM (2000) STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends in Biochemical Sciences* **25**: 496-502.
83. Becker, S, Groner, B and Müller, CW (1998) Three-dimensional structure of the Stat3 β homodimer bound to DNA. *Nature* **394**: 145-151.
84. Chen, X, Vinkemeier, U, Zhao, Y, Jeruzalmi, D, Darnell, JE, Jr. and Kuriyan, J (1998) Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* **93**: 827-839.
85. John, S, Vinkemeier, U, Soldaini, E, Darnell, JE, Jr. and Leonard, WJ (1999) The significance of tetramerization in promoter recruitment by Stat5. *Molecular and Cellular Biology* **19**: 1910-1918.
86. Vinkemeier, U, Cohen, SL, Moarefi, I, Chait, BT, Kuriyan, J and Darnell, JE, Jr. (1996) DNA binding of in vitro activated Stat1 α , Stat1 β and truncated Stat1: interaction between NH₂-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *The EMBO Journal* **15**: 5616-5626.
87. Pidasheva, S, Trifari, S, Phillips, A, Hackney, JA, Ma, Y, Smith, A, Sohn, SJ, Spits, H, Little, RD, Behrens, TW, Honigberg, L, Ghilardi, N and Clark, HF (2011) Functional studies on the IBD susceptibility gene IL23R implicate reduced receptor function in the protective genetic variant R381Q. *PLoS One* **6**: e25038.
88. Cho, M-L, Kang, J-W, Moon, Y-M, Nam, H-J, Jhun, J-Y, Heo, S-B, Jin, H-T, Min, S-Y, Ju, J-H, Park, K-S, Cho, Y-G, Yoon, C-H, Park, S-H, Sung, Y-C and Kim, H-Y (2006) STAT3 and NF- κ B signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Journal of Immunology* **176**: 5652-5661.
89. Ye, P, Garvey, PB, Zhang, P, Nelson, S, Bagby, G, Summer, WR, Schwarzenberger, P, Shellito, JE and Kolls, JK (2001) Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **25**: 335-340.

90. Mangan, PR, Harrington, LE, O'Quinn, DB, Helms, WS, Bullard, DC, Elson, CO, Hatton, RD, Wahl, SM, Schoeb, TR and Weaver, CT (2006) Transforming growth factor- β induces development of the T_H17 lineage. *Nature* **441**: 231-234.
91. Infante-Duarte, C, Horton, HF, Byrne, MC and Kamradt, T (2000) Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *Journal of Immunology* **165**: 6107-6115.
92. Huang, W, Na, L, Fidel, PL and Schwarzenberger, P (2004) Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *Journal of Infectious Diseases* **190**: 624-631.
93. Parkin, J and Cohen, B (2001) An overview of the immune system. *Lancet* **357**: 1777-1789.
94. Lynch, HE, Goldberg, GL, Chidgey, A, Van den Brink, MMR, Boyd, R and Sempowski, GD (2009) Thymic involution and immune reconstitution. *Trends in Immunology* **30**: 366-373.
95. Croxford, AL, Mair, F and Becher, B (2012) IL-23: one cytokine in control of autoimmunity. *European Journal of Immunology* **42**: 2263-2273.
96. Sutton, CE, Lalor, SJ, Sweeney, CM, Brereton, CF, Lavelle, EC and Mills, KH (2009) Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from $\gamma\delta$ T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* **31**: 331-341.
97. Schwartz, RH (1985) T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Annual Review of Immunology* **3**: 237-261.
98. Ashwell, JD and Klusner, RD (1990) Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor. *Annual Review of Immunology* **8**: 139-167.
99. Germain, RN and Štefanová, I (1999) The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annual Review of Immunology* **17**: 467-522.
100. Cambier, JC (1995) New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). *Immunology Today* **16**: 110.
101. Bonilla, FA and Oettgen, HC (2010) Adaptive immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**: S33-40.
102. Zhang, W, Sloan-Lancaster, J, Kitchen, J, Tribble, RP and Samelson, LE (1998) LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* **92**: 83-92.
103. Veldhoen, M, Hocking, RJ, Atkins, CJ, Locksley, RM and Stockinger, B (2006) TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**: 179-189.
104. Ivanov, II, Zhou, L and Littman, DR (2007) Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Seminars in Immunology* **19**: 409-417.
105. Zhou, L, Ivanov, II, Spolski, R, Min, R, Shenderov, K, Egawa, T, Levy, DE, Leonard, WJ and Littman, DR (2007) IL-6 programs T_H-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature Immunology* **8**: 967-974.
106. Nurieva, R, Yang, XO, Martinez, G, Zhang, Y, Panopoulos, AD, Ma, L, Schluns, K, Tian, Q, Watowich, SS, Jetten, AM and Dong, C (2007) Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* **448**: 480-483.
107. Chen, Z, Laurence, A, Kanno, Y, Pacher-Zavisin, M, Zhu, B-M, Tato, C, Yoshimura, A, Hennighausen, L and O'Shea, JJ (2006) Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 8137-8142.

108. Wei, L, Laurence, A, Elias, KM and O'Shea, JJ (2007) IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 34605-34610.
109. Durant, L, Watford, WT, Ramos, HL, Laurence, A, Vahedi, G, Wei, L, Takahashi, H, Sun, H-W, Kanno, Y, Powrie, F and O'Shea, JJ (2010) Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity* **32**: 605-615.
110. Ivanov, II, McKenzie, BS, Zhou, L, Tadokoro, CE, Lepelley, A, Lafaille, JJ, Cua, DJ and Littman, DR (2006) The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* **126**: 1121-1133.
111. Jetten, AM, Kurebayashi, S and Ueda, E (2001) The ROR nuclear orphan receptor subfamily: critical regulators of multiple biological processes. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **69**: 205-247.
112. Korn, T, Bettelli, E, Oukka, M and Kuchroo, VK (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology* **27**: 485-517.
113. Boniface, K, Blom, B, Liu, Y-J and de Waal Malefyt, R (2008) From interleukin-23 to T-helper 17 cells: human T-helper cell differentiation revisited. *Immunological Reviews* **226**: 132-146.
114. Bettelli, E, Carrier, Y, Gao, W, Korn, T, Strom, TB, Oukka, M, Weiner, HL and Kuchroo, VK (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T_H17 and regulatory T cells. *Nature* **441**: 235-238.
115. Ghoreschi, K, Laurence, A, Yang, XP, Tato, CM, McGeachy, MJ, Konkel, JE, Ramos, HL, Wei, L, Davidson, TS, Bouladoux, N, Grainger, JR, Chen, Q, Kanno, Y, Watford, WT, Sun, HW, Eberl, G, Shevach, EM, Belkaid, Y, Cua, DJ, Chen, W and O'Shea, JJ (2010) Generation of pathogenic T_H17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature* **467**: 967-971.
116. Das, J, Ren, G, Zhang, L, Roberts, AI, Zhao, X, Bothwell, ALM, Van Kaer, L, Shi, Y and Das, G (2009) Transforming growth factor β is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation. *Journal of Experimental Medicine* **206**: 2407-2416.
117. Acosta-Rodriguez, EV, Napolitani, G, Lanzavecchia, A and Sallusto, F (2007) Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature Immunology* **8**: 942-949.
118. Yang, L, Anderson, DE, Baecher-Allan, C, Hastings, WD, Bettelli, E, Oukka, M, Kuchroo, VK and Hafler, DA (2008) IL-21 and TGF- β are required for differentiation of human T_H17 cells. *Nature* **454**: 350-352.
119. Santarlasci, V, Maggi, L, Capone, M, Frosali, F, Querci, V, De Palma, R, Liotta, F, Cosmi, L, Maggi, E, Romagnani, S and Annunziato, F (2009) TGF- β indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *European Journal of Immunology* **39**: 207-215.
120. Annunziato, F, Cosmi, L, Santarlasci, V, Maggi, L, Liotta, F, Mazzinghi, B, Parente, E, Fili, L, Ferri, S, Frosali, F, Giudici, F, Romagnani, P, Parronchi, P, Tonelli, F, Maggi, E and Romagnani, S (2007) Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *Journal of Experimental Medicine* **204**: 1849-1861.
121. Gálvez, J (2014) Role of Th17 cells in the pathogenesis of human IBD. *ISRN Inflammations*: e928461.
122. Lexberg, MH, Taubner, A, Albrecht, I, Lepenies, I, Richter, A, Kamradt, T, Radbruch, A and Chang, H-D (2010) IFN- γ and IL-12 synergize to convert in vivo

- generated Th17 into Th1/Th17 cells. *European Journal of Immunology* **40**: 3017-3027.
123. Kurschus, FC, Croxford, AL, Heinen, AP, Wörtge, S, Ielo, D and Waisman, A (2010) Genetic proof for the transient nature of the Th17 phenotype. *European Journal of Immunology* **40**: 3336-3346.
124. Veldhoen, M, Hirota, K, Westendorf, AM, Buer, J, Dumoutier, L, Renauld, J-C and Stockinger, B (2008) The aryl hydrocarbon receptor links T_H17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* **453**: 106-109.
125. Manel, N, Unutmaz, D and Littman, DR (2008) The differentiation of human T_H17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ T. *Nature Immunology* **9**: 641-649.
126. Yang, XO, Pappu, BP, Nurieva, R, Akimzhanov, A, Kang, HS, Chung, Y, Ma, L, Shah, B, Panopoulos, AD, Schluns, KS, Watowich, SS, Tian, Q, Jetten, AM and Dong, C (2008) TH17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* **28**: 29-39.
127. Brüstle, A, Heink, S, Huber, M, Rosenplänter, C, Stadelmann, C, Yu, P, Arpaia, E, Mak, TW, Kamradt, T and Lohoff, M (2007) The development of inflammatory T_H17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nature Immunology* **8**: 958-966.
128. Ichiyama, K, Sekiya, T, Inoue, N, Tamiya, T, Kashiwagi, I, Kimura, A, Morita, R, Muto, G, Shichita, T, Takahashi, R and Yoshimura, A (2011) Transcription factor Smad-independent T helper 17 cell induction by transforming-growth factor- β is mediated by suppression of eomesodermin. *Immunity* **34**: 741-754.
129. Lebson, L, Gocke, A, Rosenzweig, J, Alder, J, Civin, C, Calabresi, PA and Whartenby, KA (2010) Cutting edge: the transcription factor kruppel-like factor 4 regulates the differentiation of Th17 cells independently of ROR γ t. *Journal of Immunology* **185**: 7161-7164.
130. Annunziato, F and Romagnani, S (2011) Mouse T helper 17 phenotype: not so different than in man after all. *Cytokine* **56**: 112-115.
131. Cosmi, L, De Palma, R, Santarlasci, V, Maggi, L, Capone, M, Frosali, F, Rodolico, G, Querci, V, Abbate, G, Angeli, R, Berrino, L, Fambrini, M, Caproni, M, Tonelli, F, Lazzari, E, Parronchi, P, Liotta, F, Maggi, E, Romagnani, S and Annunziato, F (2008) Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161⁺CD4⁺ T cell precursor. *Journal of Experimental Medicine* **205**: 1903-1916.
132. Lee, E, Trepicchio, WL, Oestreicher, JL, Pittman, D, Wang, F, Chamian, F, Dhodapkar, M and Krueger, JG (2004) Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *Journal of Experimental Medicine* **199**: 125-130.
133. Teunissen, MB, Koomen, CW, de Waal Malefyt, R, Wierenga, EA and Bos, JD (1998) Interleukin-17 and interferon- γ synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology* **111**: 645-649.
134. Wilson, NJ, Boniface, K, Chan, JR, McKenzie, BS, Blumenschein, WM, Mattson, JD, Basham, B, Smith, K, Chen, T, Morel, F, Lecron, J-C, Kastelein, RA, Cua, DJ, McClanahan, TK, Bowman, EP and de Waal Malefyt, R (2007) Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature Immunology* **8**: 950-957.
135. Wolk, K, Kunz, S, Witte, E, Friedrich, M, Asadullah, K and Sabat, R (2004) IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* **21**: 241-254.
136. Cua, DJ, Sherlock, J, Chen, Y, Murphy, CA, Joyce, B, Seymour, B, Lucian, L, To, W, Kwan, S, Churakova, T, Zurawski, S, Wiekowski, M, Lira, SA, Gorman, D,

- Kastelein, RA and Sedgwick, JD (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**: 744-748.
137. Murphy, CA, Langrish, CL, Chen, Y, Blumenschein, W, McClanahan, T, Kastelein, RA, Sedgwick, JD and Cua, DJ (2003) Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine* **198**: 1951-1957.
138. Schmidt, C, Giese, T, Ludwig, B, Mueller-Molaian, I, Marth, T, Zeuzem, S, Meuer, SC and Stallmach, A (2005) Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* **11**: 16-23.
139. Sato, K, Suematsu, A, Okamoto, K, Yamaguchi, A, Morishita, Y, Kadono, Y, Tanaka, S, Kodama, T, Akira, S, Iwakura, Y, Cua, DJ and Takayanagi, H (2006) Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *Journal of Experimental Medicine* **203**: 2673-2682.
140. Li, Y, Chu, N, Hu, A, Gran, B, Rostami, A and Zhang, G-X (2007) Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia. *Brain: A Journal of Neurology* **130**: 490-501.
141. Duerr, RH, Taylor, KD, Brant, SR, Rioux, JD, Silverberg, MS, Daly, MJ, Steinhart, AH, Abraham, C, Regueiro, M, Griffiths, A, Dassopoulos, T, Bitton, A, Yang, H, Targan, S, Datta, LW, Kistner, EO, Schumm, LP, Lee, AT, Gregersen, PK, Barmada, MM, Rotter, JI, Nicolae, DL and Cho, JH (2006) A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314**: 1461-1463.
142. Capon, F, Di Meglio, P, Szaub, J, Prescott, NJ, Dunster, C, Baumber, L, Timms, K, Gutin, A, Abkevic, V, Burden, AD, Lanchbury, J, Barker, JN, Trembath, RC and Nestle, FO (2007) Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. *Human Genetics* **122**: 201-206.
143. Cargill, M, Schrodi, SJ, Chang, M, Garcia, VE, Brandon, R, Callis, KP, Matsunami, N, Ardlie, KG, Civello, D, Catanese, JJ, Leong, DU, Panko, JM, McAllister, LB, Hansen, CB, Papenfuss, J, Prescott, SM, White, TJ, Leppert, MF, Krueger, GG and Begovich, AB (2007) A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *American Journal of Human Genetics* **80**: 273-290.
144. Smith, RL, Warren, RB, Eyre, S, Ho, P, Ke, X, Young, HS, Griffiths, CE and Worthington, J (2008) Polymorphisms in the IL-12 β and IL-23R genes are associated with psoriasis of early onset in a UK cohort. *Journal of Investigative Dermatology* **128**: 1325-1327.
145. Burton, PR, Clayton, DG, Cardon, LR, Craddock, N, Deloukas, P, Duncanson, A, Kwiatkowski, DP, McCarthy, MI, Ouwehand, WH, Samani, NJ, Todd, JA, Donnelly, P, Barrett, JC, Davison, D, Easton, D, Evans, DM, Leung, HT, Marchini, JL, Morris, AP, Spencer, CC, Tobin, MD, Attwood, AP, Boorman, JP, Cant, B, Everson, U, Hussey, JM, Jolley, JD, Knight, AS, Koch, K, Meech, E, Nutland, S, Prowse, CV, Stevens, HE, Taylor, NC, Walters, GR, Walker, NM, Watkins, NA, Winzer, T, Jones, RW, McArdle, WL, Ring, SM, Strachan, DP, Pembrey, M, Breen, G, St Clair, D, Caesar, S, Gordon-Smith, K, Jones, L, Fraser, C, Green, EK, Grozeva, D, Hamshere, ML, Holmans, PA, Jones, IR, Kirov, G, Moskvina, V, Nikolov, I, O'Donovan, MC, Owen, MJ, Collier, DA, Elkin, A, Farmer, A, Williamson, R, McGuffin, P, Young, AH, Ferrier, IN, Ball, SG, Balmforth, AJ, Barrett, JH, Bishop, TD, Iles, MM, Maqbool, A, Yuldasheva, N, Hall, AS, Braund, PS, Dixon, RJ, Mangino, M, Stevens, S, Thompson, JR, Bredin, F, Tremelling, M, Parkes, M, Drummond, H, Lees, CW,

- Nimmo, ER, Satsangi, J, Fisher, SA, Forbes, A, Lewis, CM, Onnie, CM, Prescott, NJ, Sanderson, J, Matthew, CG, Barbour, J, Mohiuddin, MK, Todhunter, CE, Mansfield, JC, Ahmad, T, Cummings, FR, Jewell, DP, Webster, J, Brown, MJ, Lathrop, MG, Connell, J, Dominiczak, A, Marcano, CA, Burke, B, Dobson, R, Gungadoo, J, Lee, KL, Munroe, PB, Newhouse, SJ, Onipinla, A, Wallace, C, Xue, M, Caulfield, M, Farrall, M, Barton, A, Bruce, IN, Donovan, H, Eyre, S, Gilbert, PD, Hilder, SL, Hinks, AM, John, SL, Potter, C, Silman, AJ, Symmons, DP, Thomson, W, Worthington, J, Dunger, DB, Widmer, B, Frayling, TM, Freathy, RM, Lango, H, Perry, JR, Shields, BM, Weedon, MN, Hattersley, AT, Hitman, GA, Walker, M, Elliott, KS, Groves, CJ, Lindgren, CM, Rayner, NW, Timpson, NJ, Zeggini, E, Newport, M, Sirugo, G, Lyons, E, Vannberg, F, Hill, AV, Bradbury, LA, Farrar, C, Pointon, JJ, Wordsworth, P, Brown, MA, Franklyn, JA, Heward, JM, Simmonds, MJ, Gough, SC, Seal, S, Stratton, MR, Rahman, N, Ban, M, Goris, A, Sawcer, SJ, Compston, A, Conway, D, Jallow, M, Rockett, KA, Bumpstead, SJ, Chaney, A, Downes, K, Ghori, MJ, Gwilliam, R, Hunt, SE, Inouye, M, Keniry, A, King, E, McGinnis, R, Potter, S, Ravindrarajah, R, Whittaker, P, Widdens, C, Withers, D, Cardin, NJ, Ferreira, T, Pereira-Gale, J, Hallgrimsdottir, IB, Howie, BN, Su, Z, Teo, YY, Vukcevic, D, Bentley, D, Mitchell, SL, Newby, PR, Brand, OJ, Carr-Smith, J, Pearce, SH, Reveille, JD, Zhou, X, Sims, AM, Dowling, A, Taylor, J, Doan, T, Davis, JC, Savage, L, Ward, MM, Learch, TL, Weisman, MH and Brown, M (2007) Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nature Genetics* **39**: 1329-1337.
146. Illes, Z, Safrany, E, Peterfalvi, A, Magyari, L, Farago, B, Pozsonyi, E, Rozsa, C, Komoly, S and Melegh, B (2008) 3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neuroscience Letters* **431**: 36-38.
147. McGeachy, MJ and Cua, DJ (2008) Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* **28**: 445-453.
148. Metz, S, Naeth, G, Heinrich, PC and Müller-Newen, G (2008) Novel inhibitors for murine and human leukemia inhibitory factor based on fused soluble receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 5985-5995.
149. Economides, AN, Rocco Carpenter, L, Rudge, JS, Wong, V, Koehler-Stec, EM, Hartnett, C, Pyles, EA, Xu, X, Daly, TJ, Young, MR, Fandl, JP, Lee, F, Carver, S, McNay, J, Bailey, K, Ramakanth, S, Hutabarat, R, Huang, TT, Radziejewski, C, Yancopoulos, GD and Stahl, N (2003) Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nature Medicine* **9**: 47-52.
150. Ancy, C, Kuster, A, Haan, S, Herrmann, A, Heinrich, PC and Müller-Newen, G (2003) A fusion protein of the gp130 and interleukin-6R α ligand-binding domains acts as a potent interleukin-6 inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 16968-16972.
151. Bettelli, E, Oukka, M and Kuchroo, VK (2007) T_H-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature Immunology* **8**: 345-350.
152. Jones, LL, Chaturvedi, V, Uyttenhove, C, Van Snick, J and Vignali, DAA (2012) Distinct subunit pairing criteria within the heterodimeric IL-12 cytokine family. *Molecular Immunology* **51**: 234-244.
153. Russell, TD, Yan, Q, Fan, G, Khalifah, AP, Bishop, DK, Brody, SL and Walter, MJ (2003) IL-12 p40 homodimer-dependent macrophage chemotaxis and respiratory viral inflammation are mediated through IL-12 receptor β 1. *Journal of Immunology* **171**: 6866-6874.

154. Shimozato, O, Ugai, S-I, Chiyo, M, Takenobu, H, Nagakawa, H, Wada, A, Kawamura, K, Yamamoto, H and Tagawa, M (2006) The secreted form of the p40 subunit of interleukin (IL)-12 inhibits IL-23 functions and abrogates IL-23-mediated antitumour effects. *Immunology* **117**: 22-28.
155. Brakenhoff, JPJ, de Hon, FD, Fontaine, V, ten Boekel, E, Schooltink, H, Rose-John, S, Heinrich, PC, Content, J and Aarden, LA (1994) Development of a human interleukin-6 receptor antagonist. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 86-93.
156. Inoue, N, Nakayama, C, Kikuchi, K, Kimura, T, Ishige, Y, Ito, A, Kanaoka, M and Noguchi, H (1995) D1 cap region involved in the receptor recognition and neural cell survival activity of human ciliary neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 8579-8583.
157. Rousseau, F, Basset, L, Froger, J, Dinguirard, N, Chevalier, S and Gascan, H (2010) IL-27 structural analysis demonstrates similarities with ciliary neurotrophic factor (CNTF) and leads to the identification of antagonistic variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 19420-19425.
158. McGeachy, MJ, Chen, Y, Tato, CM, Laurence, A, Joyce-Shaikh, B, Blumenschein, WM, McClanahan, TK, O'Shea, JJ and Cua, DJ (2009) The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nature Immunology* **10**: 314-324.
159. Mannon, PJ, Fuss, IJ, Mayer, L, Elson, CO, Sandborn, WJ, Present, D, Dolin, B, Goodman, N, Groden, C, Hornung, RL, Quezado, M, Yang, Z, Neurath, MF, Salfeld, J, Veldman, GM, Schwertschlag, U and Strober, W (2004) Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *The New England Journal of Medicine* **351**: 2069-2079.
160. Sandborn, WJ, Feagan, BG, Fedorak, RN, Scherl, E, Fleisher, MR, Katz, S, Johans, J, Blank, M and Rutgeerts, P (2008) A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology* **135**: 1130-1141.
161. Guo, W, Luo, C, Wang, C, Zhu, Y, Wang, X, Gao, X and Yao, W (2012) Protection against Th17 cells differentiation by an interleukin-23 receptor cytokine-binding homology region. *PLoS One* **7**: e45625.
162. Huang, C and Swanson, RV (2013) Peptide-Fc fusion therapeutics: applications and challenges in *Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges*. Schmidt, SR, John Wiley & Sons, Inc.: pages 123-142.
163. Mohler, KM, Torrance, DS, Smith, CA, Goodwin, RG, Stremmler, KE, Fung, VP, Madani, H and Widmer, MB (1993) Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *Journal of Immunology* **151**: 1548-1561.
164. Peppel, K, Crawford, D and Beutler, B (1991) A tumor necrosis factor (TNF) receptor-IgG heavy chain chimeric protein as a bivalent antagonist of TNF activity. *Journal of Experimental Medicine* **174**: 1483-1489.
165. Lencer, WI and Blumberg, RS (2005) A passionate kiss, then run: exocytosis and recycling of IgG by FcRn. *Trends in Cell Biology* **15**: 5-9.
166. Roopenian, DC and Akilesh, S (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature Reviews. Immunology* **7**: 715-725.
167. Stahl, N, Farruggella, TJ, Boulton, TG, Zhong, Z, Darnell, JE, Jr. and Yancopoulos, GD (1995) Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* **267**: 1349-1353.

168. Naeger, LK, McKinney, J, Salvekar, A and Hoey, T (1999) Identification of a STAT4 binding site in the interleukin-12 receptor required for signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 1875-1878.
169. Gerhartz, C, Heesel, B, Sasse, J, Hemmann, U, Landgraf, C, Schneider-Mergener, J, Horn, F, Heinrich, PC and Graeve, L (1996) Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 12991-12998.
170. Kaptein, A, Paillard, V and Saunders, M (1996) Dominant negative Stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 5961-5964.
171. Ullrich, A, Coussens, L, Hayflick, JS, Dull, TJ, Gray, A, Tam, AW, Lee, J, Yarden, Y, Libermann, TA, Schlessinger, J, Downward, J, Mayes, ELV, Whittle, N, Waterfield, MD and Seeburg, PH (1984) Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* **309**: 418-425.
172. Schmitz, J, Dahmen, H, Grimm, C, Gendo, C, Müller-Newen, G, Heinrich, PC and Schaper, F (2000) The cytoplasmic tyrosine motifs in full-length glycoprotein 130 have different roles in IL-6 signal transduction. *Journal of Immunology* **164**: 848-854.
173. Nicholson, SE, De Souza, D, Fabri, LJ, Corbin, J, Willson, TA, Zhang, J-G, Silva, A, Asimakis, M, Farley, A, Nash, AD, Metcalf, D, Hilton, DJ, Nicola, NA and Baca, M (2000) Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 6493-6498.
174. Ohtani, T, Ishihara, K, Atsumi, T, Nishida, K, Kaneko, Y, Miyata, T, Itoh, S, Narimatsu, M, Maeda, H, Fukada, T, Itoh, M, Okano, H, Hibi, M and Hirano, T (2000) Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses. *Immunity* **12**: 95-105.
175. Zheng, Y, Qin, H, Frank, SJ, Deng, L, Litchfield, DW, Tefferi, A, Pardanani, A, Lin, F-T, Li, J, Sha, B and Benveniste, EN (2011) A CK2-dependent mechanism for activation of the JAK-STAT signaling pathway. *Blood* **118**: 156-166.
176. Dumoutier, L, de Meester, C, Tavernier, J and Renauld, J-C (2009) New activation modus of STAT3: a tyrosine-less region of the interleukin-22 receptor recruits STAT3 by interacting with its coiled-coil domain. *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 26377-26384.
177. Nicholson, SE, Starr, R, Novak, U, Hilton, DJ and Layton, JE (1996) Tyrosine residues in the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor mediate G-CSF-induced differentiation of murine myeloid leukemic (M1) cells. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 26947-26953.
178. Case, RD, Piccione, E, Wolf, G, Bennett, AM, Lechleider, RJ, Neel, BG and Shoelson, SE (1994) SH-PTP2/Syp SH2 domain binding specificity is defined by direct interactions with platelet-derived growth factor β -receptor, epidermal growth factor receptor, and insulin receptor substrate-1-derived phosphopeptides. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 10467-10474.
179. Thoma, B, Bird, TA, Friend, DJ, Gearing, DP and Dower, SK (1994) Oncostatin M and leukemia inhibitory factor trigger overlapping and different signals through partially shared receptor complexes. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 6215-6222.
180. Ernst, M and Jenkins, BJ (2004) Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends in Genetics: TIG* **20**: 23-32.

181. Li, W, Nishimura, R, Kashishian, A, Batzer, AG, Kim, WJH, Cooper, JA and Schlessinger, J (1994) A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase. *Molecular and Cellular Biology* **14**: 509-517.
182. Palmer, DC and Restifo, NP (2009) Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends in Immunology* **30**: 592-602.
183. Heinrich, PC, Behrmann, I, Haan, S, Hermanns, HM, Müller-Newen, G and Schaper, F (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical Journal* **374**: 1-20.
184. Yin, T, Shen, R, Feng, G-S and Yang, Y-C (1997) Molecular characterization of specific interactions between SHP-2 phosphatase and JAK tyrosine kinases. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 1032-1037.
185. Narazaki, M, Witthuhn, BA, Yoshida, K, Silvennoinen, O, Yasukawa, K, Ihle, JN, Kishimoto, T and Taga, T (1994) Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 2285-2289.
186. Chang, Y-P, Tsai, C-C, Huang, W-C, Wang, C-Y, Chen, C-L, Lin, Y-S, Kai, J-I, Hsieh, C-Y, Cheng, Y-L, Choi, P-C, Chen, S-H, Chang, S-P, Liu, H-S and Lin, C-F (2010) Autophagy facilitates IFN- γ -induced Jak2-STAT1 activation and cellular inflammation. *The Journal of Biological Chemistry* **285**: 28715-28722.
187. Valdembri, D, Serini, G, Vacca, A, Ribatti, D and Bussolino, F (2002) In vivo activation of JAK2/STAT-3 pathway during angiogenesis induced by GM-CSF. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**: 225-227.
188. Kotenko, SV, Izotova, LS, Pollack, BP, Muthukumaran, G, Paukku, K, Silvennoinen, O, Ihle, JN and Pestka, S (1996) Other kinases can substitute for Jak2 in signal transduction by interferon- γ . *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 17174-17182.
189. Colosi, P, Wong, K, Leong, SR and Wood, WI (1993) Mutational analysis of the intracellular domain of the human growth hormone receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 12617-12623.
190. Sakamaki, K, Miyajima, I, Kitamura, T and Miyajima, A (1992) Critical cytoplasmic domains of the common β subunit of the human GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors for growth signal transduction and tyrosine phosphorylation. *The EMBO Journal* **11**: 3541-3549.

9 Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD5L	<i>cluster of differentiation 5 antigen like protein</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>)
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis (<i>collagen-induced arthritis</i>)
CK	Kaseinkinase (<i>casein kinase</i>)
CNTF	ziliärer neurotropher Faktor (<i>ciliary neurotrophic factor</i>)
CNTRF	ziliärer neurotropher Faktor Rezeptor (<i>ciliary neurotrophic factor receptor</i>)
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor (<i>colony stimulating factor</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonuclein acid</i>)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBI-3	<i>Epstein-Barr virus-induced gene 3 protein</i>
EpoR	Erythropoietin Rezeptor
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FERM	<i>Four-point-one/Ezrin/Radixin/Moesin</i>
FN-III	Fibronektindomänen des Strukturtyps III
GAS	γ -aktivierte Sequenz
G-CSFR	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor Rezeptor (<i>granulocyte-colony stimulating factor receptor</i>)
GH	Wachstumshormon (<i>growth hormone</i>)
GHR	Wachstumshormonrezeptor (<i>growth hormone receptor</i>)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (<i>granulocyte-macrophage-colony stimulating factor</i>)
GM-CSFR	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor Rezeptor (<i>granulocyte-macrophage-colony stimulating factor receptor</i>)
GRB	Wachstumsfaktor Rezeptor-gebundenes Protein (<i>growth factor receptor-bound protein</i>)
gp130	Glykoprotein 130
h	human

HEK	humane embryonische Nierenzelle (<i>human embryonic kidney cell</i>)
HeLa	Henrietta Lacks
HR	Helferrezeptor
IFN	Interferon
IFN- γ R	IFN- γ Rezeptor
Ig	Immunglobulin
I κ B- α	<i>inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha</i>
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1 Rezeptor
IL-3R	IL-3 Rezeptor
IL-5R	IL-5 Rezeptor
IL-6R	IL-6 Rezeptor
IL-10R	IL-10 Rezeptor
IL-11R	IL-11 Rezeptor
IL-12R β 1	IL-12 Rezeptor β 1
IL-12R β 2	IL-12 Rezeptor β 2
IL-22R	IL-22 Rezeptor
IL-23R	IL-23 Rezeptor
ITAM	Immunrezeptor-basiertes Tyrosinaktivierungsmotiv
Jak	Januskinase
JH	Janus Homologie
kDa	Kilodalton
Lck	Lymphozyt-spezifische Proteintyrosinkinase (<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>)
LIF	leukämischer inhibitorischer Faktor
LIFR	leukämischer inhibitorischer Faktor Rezeptor
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEFs	murine embryonische Fibroblasten
m	murin
mET/hC	murine extrazelluläre und transmembrane/ humane zytoplasmatische Domäne (<i>murine extracellular and transmembrane/ human cytoplasmatic domain</i>)
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MPS	<i>methionyl porcine somatotropin</i>
MS	multiple Sklerose

NF-κB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NK	natürliche Killerzelle
NTRK	<i>neurotrophic tyrosine kinase receptor type 3</i>
OSM	Onkostatin M
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	potentia Hydrogenii
ϕ	hydrophobe Aminosäure
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
RA	rheumatoide Arthritis
ROR	<i>retinoic acid-related orphan receptor</i>
ROREs	<i>ROR responsive elements</i>
SH2	<i>steroid receptor co-activator homology 2</i>
SHP2	<i>steroid receptor co-activator homology 2 domain-containing phosphatase 2</i>
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
ST	<i>actual Signal Transducers</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
SRC	<i>steroid receptor co-activator</i>
T-bet	<i>T-box transcription factor normally expressed in T cells</i>
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TH-Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR II	Tumornekrosefaktor α Rezeptor II
Tyk2	Tyrosinkinase 2
ZAP 70	ζ-assozierten Proteins, 70 kDa
ZHR	Zytokinrezeptor-Homologie-Region

Aminosäuren wurden gemäß des internationalen Ein-Buchstabencodes abgekürzt. Eine Zahl hinter der Bezeichnung kennzeichnet die Position der Aminosäure einschließlich des Signalpeptids.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Architektur der IL-12 Familie.	2
Abbildung 2: Vier-Helix-Bündel Topologie der Zytokinuntereinheit p19.....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänen der löslichen murinen α -Rezeptoruntereinheit p40.....	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Domänen des murinen IL-23 Rezeptors.	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Domänen des murinen Rezeptors IL-12R β 1.	9
Abbildung 6: Postuliertes <i>site I-II-III</i> Paradigma des heterodimeren Zytokins IL-23.....	11
Abbildung 7: IL-23 induzierte Signalkaskade.	17
Abbildung 8: Differenzierung muriner TH17-Zellen.	21
Abbildung 9: Schematische Darstellung identifizierter kritischer Aminosäuren in murinem IL-23.	40
Abbildung 10: Experimentell bestimmte Definition des <i>site I-II-III</i> Paradigmas.	41
Abbildung 11: Domänenbasierte Entwicklung eines potentiellen IL-23 Antagonisten.	43
Abbildung 12: Schematische Darstellung beteiligter Aminosäuren zur Vermittlung der IL-23 induzierten Signaltransduktion im murinen IL-23 Rezeptor.	45
Abbildung 13: Zusammenfassende Darstellung signalvermittelnder Aminosäuren und Domänen des IL-23 Rezeptorkomplexes sowie der aktivierten Signalwege.....	54

11 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller für die Vergabe des interessanten Themas und die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II bedanken. Des Weiteren möchte ich mich für die Unterstützung bei der Lösung von Problemstellungen, der Veröffentlichung des Manuskriptes und für die intensive Betreuung bedanken.

Weiterhin gilt mein großer Dank Herrn Prof. Dr. William Martin für die Übernahme des Zweitgutachtens und für den damit erforderlichen Zeitaufwand.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Doreen Floß, die mich seit Beginn der Arbeit unterstützt hat und mit ihren Vorarbeiten und Fachwissen am meisten zu diesem Projekt beigetragen hat. Ich möchte mich daher für die Betreuung, Geduld und Korrektur dieser Arbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Joachim Grötzinger für die Erstellung des Modells und die Zielsicherheit seiner Voraussagen danken, da dieses die Umsetzung der Arbeit erst ermöglicht hat.

Ich möchte mich auch herzlich bei allen Kollegen bedanken, die mir nicht nur fachlich eine wichtige Unterstützung waren. Ganz besonders sind an dieser Stelle Paul Baran und Manuel Franke zu erwähnen, die sich besonders durch ihre Hilfsbereitschaft und viele schöne Momente auszeichnen. PhD Jens Moll gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Proteinreinigung und verschiedenen experimentellen Anregungen. Auch Dr. Jan Sommer, Niloufar Monhasery, Samadhi Aparicio-Siegmund, Madhurendra Singh, Alexander Lang, Hakima Ezzahoini, Ilse Mayer gilt mein Dank für ihre Kooperativität beim Labormanagement oder diversen Anregungen zu verschiedenen Methoden. Dr. Christoph Garbers möchte ich besonders für die weiterhin andauernde Unterstützung in verschiedensten Bereichen danken.

An dieser Stelle möchte ich auch Dr. Roland Piekorz für fachliche Gespräche und die häufig spontane Hilfsbereitschaft bedanken und bei PD. Dr. Mohammed Reza Ahmadian für seine konstruktiven Kritiken und sein Interesse an der Arbeit sowie der Zukunftsplanung.

Bei Alexandra Frey möchte ich mich für die gemeinsam gemeisterten Klausuren, Tipps und Tricks in Word, die anhaltende Freundschaft und die fortwährende Geduld jegliche Abschlussarbeit Korrektur zu lesen bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Gabrielle und Martin Schröder für ihre Geduld, Unterstützung und ihren Rückhalt. Martin möchte ich dabei mit Respekt für seine Begeisterung an Naturwissenschaften, das Korrekturlesen und dem persönlichen Einsatz danken, der mich in verschiedener Weise auf diesen Weg gebracht hat. Ich möchte mich auch bei meinen Geschwistern Adrian, Gina und Niklas bedanken, die mir jederzeit die nötige Motivation geben alles zu versuchen. Abschließend gilt mein allergrößter Dank Marcel Mierzwa, der mich durch sein Verständnis stressige Situationen ausblenden lässt und von Kaffee über DVD zum besten Grillfleisch und tollen Urlauben die größte Unterstützung ist und das notwendige Durchhaltevermögen hierfür geschaffen hat.

12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die hier vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt habe. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Es wurden bisher keine erfolglosen Promotionsversuche von mir unternommen.

Düsseldorf, im Januar 2015

Jutta Schröder