

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

Leiter:
Univ.-Prof. Dr. J. Scheller

Signaltransduktion von Interleukin-23

Interaktionen der intrazellulären Domäne des humanen IL-23 Rezeptors

Dissertation

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

vorgelegt von

Simone Maria Mrotzek

2016

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. N. Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. J. Scheller

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. S. Scheu

**There are questions that I'd like answered.
But there aren't any answers to those questions.**

Michael DeBakey

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

D M FLOSS, **S MROTZEK**, T KLÖCKER, J SCHRÖDER, J GRÖTZINGER, S ROSE-JOHN und J SCHELLER: Identification of Canonical Tyrosine-dependent and Non-canonical Tyrosine-independent STAT3 Activation Sites in the Intracellular Domain of the Interleukin 23 Receptor.

J Biol Chem 288, Nr. 27 (Jul 2013), 19386–19400.

D M FLOSS, T KLÖCKER, J SCHRÖDER, L LAMERTZ, **S MROTZEK**, B STROBL, H HERMANNNS und J SCHELLER: Defining the functional binding sites of interleukin 12 Receptor β 1 and interleukin 23 receptor to Janus kinases.

Mol Biol Cell 27, Nr. 14 (Jul 2016), 2301-2316.

Zusammenfassung

Interleukin-23 (IL-23) ist ein heterodimeres Zytokin, bestehend aus den Untereinheiten p19 und p40. Das Protein p40 ist auch Bestandteil von Interleukin-12 und beide Zytokine zählen zur Interleukin-6 Familie. IL-23 ist vor allem für die Differenzierung und Stabilisierung von T-Helferzellen 17 (TH17) verantwortlich, welche durch die Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-17 charakterisiert sind. Verschiedene Studien zeigen, dass die IL-23-TH17-IL-17-Achse bei der Entstehung von Autoimmun- und chronisch entzündlichen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt.

Wie genau die Signaltransduktion über IL-23 funktioniert, ist noch weitgehend unbekannt. Sie verläuft über ein Heterodimer aus dem IL-12 Rezeptor $\beta 1$ (IL-12R $\beta 1$) und dem Zytokin-eigenen IL-23 Rezeptor (IL-23R). Der IL-23R besitzt in der intrazellulären Domäne sieben Tyrosinreste, die mögliche Phosphorylierungsstellen für den JAK-STAT-Signalweg sind. Vermutet wird, dass vor allem STAT3 bei der Signaltransduktion von IL-23 von Bedeutung ist.

Ziel der Arbeit war herauszufinden, welche Tyrosinreste im humanen IL-23R für die STAT3-Phosphorylierung verantwortlich sind. Außerdem sollte die Beteiligung anderer Signalwege untersucht werden. Dafür wurde zunächst eine Chimäre des IL-23R kloniert, bestehend aus der murinen extrazellulären (ECD) und transmembranen Domäne (TM), sowie der humanen intrazellulären Domäne (ICD). Mittels PCR wurden verschiedene Mutations- und Deletionsvarianten dieser intrazellulären Domäne erzeugt. Die verschiedenen Varianten des chimären IL-23 Rezeptors wurden zusammen mit dem murinen IL-12R $\beta 1$ in HeLa Zellen transfiziert und stabil in Ba/F3-gp130 Zellen transduziert. Durch FACS-Analyse und Kontrolle der mRNA-Expression wurde überprüft, dass die Rezeptoren auf den Ba/F3 Zellen korrekt vorhanden waren. Anschließend wurden die Zellen mit murinem Hyper-IL-23 (mHIL-23) stimuliert. Zelllysate wurden hergestellt und die Aktivierung von STAT3 durch Western Blot analysiert.

Überraschenderweise wies die Variante, in denen alle für eine STAT3-Phosphorylierung in Frage kommenden Tyrosine zu Phenylalanin mutiert wurden (Y397/463/484/611F), noch ein Phospho-STAT3-Signal auf. Die Deletionsvarianten, bei denen die ICD des chimären IL-23R C-terminal des Tyrosins 463 entfernt wurde, zeigten hingegen sowohl in HeLa als

auch in Ba/F3-gp130 Zellen keine STAT3-Phosphorylierung mehr. Der Tyrosinrest 463 spielt somit keine Rolle bei der STAT3-Phosphorylierung.

Diesen Ergebnissen zufolge gibt es neben den Tyrosinen im C-terminalen Teil des humanen IL-23R noch ein weiteres Bindemotiv für STAT3-Phosphorylierung. Dies stimmt mit den Untersuchungen zum murinen IL-23R überein. Durch die Generierung weiterer Deletionsvarianten des mIL-23R konnte der Bereich eingengt werden (Aminosäuren 554-624). Die Aminosäuresequenz vom murinen und humanen IL-23 Rezeptor stimmt in diesem Bereich weitgehend überein. Die Suche nach Interaktionspartnern und die weitere Einengung über Deletionen in diesem Bereich sollen in Zukunft weiteren Aufschluss über die Signalweiterleitung des IL-23R über STAT3-Phosphorylierung geben.

Die Proliferationsanalysen zeigen, dass über den ersten Tyrosinrest 397 andere Signalwege als der JAK-STAT-Weg beteiligt sind. Dabei könnte es sich um den MAP-Kinase-Weg handeln. Auch ein Einfluss über PI3K und NF κ B wäre denkbar und soll zukünftig weiter untersucht werden.

Summary

Interleukin-23 is a heterodimeric cytokine consisting of the subunits p19 and p40. Protein p40 is also part of Interleukin-12 and both cytokines are members of the IL-6 family. The main function of IL-23 is the differentiation and stabilisation of T helper cells 17 (TH17), which are characterized by their production of the pro-inflammatory cytokine IL-17. Multiple studies show that the IL-23-TH17-IL-17-axis plays an important role in the development of autoimmune- and chronic inflammatory diseases.

It remains largely unclear how the signal transduction via IL-23 is functioning. A heterodimer consisting of the IL-12 receptor $\beta 1$ (IL-12R $\beta 1$) and the cytokine-specific IL-23 receptor (IL-23R) is needed. The IL-23R features seven tyrosine residues in the intracellular domain (ICD), which are possible sites of phosphorylation for the JAK-STAT-pathway. It is conceived that STAT3 plays a major role in the signal transduction of IL-23.

The main objective of this thesis was to uncover which tyrosine residues in the human IL-23R are responsible for the STAT3-phosphorylation. Additionally, it was of interest to examine the involvement of other signalling pathways. For this purpose a chimera of the IL-23R was cloned, consisting of the murine extracellular and transmembrane domain, as well as the human intracellular domain. Using PCR, different mutation and deletion variants of this intracellular domain were generated. The different variants of the chimeric IL-23R together with the murine IL-12R $\beta 1$ were transfected in HeLa cells and stably transduced in Ba/F3-gp130 cells. Using FACS-analysis and control of the mRNA-expression, it was verified that the receptors on the Ba/F3-cells were existent in correct manner. Afterwards the cells were stimulated with murine hyper-IL-23 (mHIL-23). Cell lysates were prepared and Western-Blotting allowed analysis of STAT3-activation.

Notably, even the variant in which all tyrosines that are eligible for a STAT3-phosphorylation were mutated to phenylalanine (Y397/463/484/611F) showed a phospho-STAT3-signal. Deletion variants in which the ICD of the chimeric IL-23R was removed C-terminal from tyrosine 463 showed no STAT3-phosphorylation anymore in both HeLa- as well as Ba/F3-gp130 cells. Thus, the tyrosine residue 463 plays no role for phosphorylation of STAT3.

According to these results, there is another binding motive for STAT3-phosphorylation aside from the tyrosines in the C-terminal part of the human IL-23R. This is in accordance with results for the murine IL-23R. Through generation of additional deletion variants of the mIL-23R, the area of the binding motive could be narrowed down to between amino acids 554-624. The amino acid sequence of the murine and human IL-23R in this area is almost identical. The search for interaction partners and identification of binding motives through deletions in this area will give further insight into the signaling pathways of the IL-23R over STAT3-phosphorylation.

The proliferation analyses showed that there is a participation of other signaling pathways aside from the JAK-STAT-pathway via the first tyrosine residue 397, which could possibly be MAP-Kinase pathway. Equally, the influence over PI3K and NF κ B will be examined in further detail.

Abkürzungsverzeichnis

Chemikalien (z.B. NaCl), Enzymbezeichnungen (z.B. *PmeI*), Länder (z.B. BRD), Antikörper (z.B. Anti-myc 9E10) und SI-Einheiten (z.B. h, μ l, kDa) befinden sich nicht im Abkürzungsverzeichnis.

AS Aminosäure

CIA *collagen-induced arthritis*

CED chronisch entzündliche
Darmerkrankungen

CLC *cardiotrophin-like cytokine*

CNTF *ciliary neurotrophic factor*

CT *cardiotrophin*

cDNA *complementary
deoxyribonucleic acid*

DMEM *Dulbecco's modified
Eagle's Medium*

dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphate

EAE experimentelle autoimmune
Enzephalomyelitis

ECD *extracellular domain*

FN Fibronectin

GM-CSF *granulocyte macrophage
colony-stimulating factor*

gp130 Glykoprotein 130

h human

HIL-6 Hyper-IL-6

IFN Interferon

ICD *intracellular domain*

Ig Immunglobulin

IL Interleukin

Jak Januskinase

LIF *leukaemia inhibitory factor*

m murin

mHIL-23 murines Hyper-IL-23

MAPK *mitogen-activated protein kinase*

MEK *mitogen/ extracellular
signal-regulated kinase*

MS Multiple Sklerose

NF *nuclear factor*

NKT-Zelle Natürliche Killer-T-Zelle

NOD *nucleotide oligomerisation domain*

Opn Osteopontin
OSM Oncostatin M
PCR *polymerase chain reaction*
PI3K Phosphoinositid-3-Kinasen
RA Rheumatoide Arthritis
RANKL *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*
RNA *ribonucleic acid*
ROR *retinoic acid-related orphan receptor*
SH *src homology*
SHP *protein tyrosine phosphatase*
SNP single nucleotide polymorphism
SOE *splicing by overlapping extensions*

SOCS *suppressor of cytokine signalling*
SpA Spondyloarthritis
STAT *signal transducers and activators of transcription*
TGF *transforming growth factor*
TH T-Helferzelle
TLR *toll-like Rezeptoren*
TM Transmembrandomäne
TNF Tumornekrosefaktor
Treg regulatorische T-Zelle
Tyk Tyrosinkinase
WT Wildtyp

Aminosäuren

A (Ala) Alanin
C (Cys) Cystein
D (Asp) Asparaginsäure
E (Glu) Glutaminsäure
F (Phe) Phenylalanin
G (Gly) Glycin
H (His) Histidin
I (Ile) Isoleucin
K (Lys) Lysin
L (Leu) Leucin
M (Met) Methionin

N (Asn) Asparagin
P (Pro) Prolin
Q (Gln) Glutamin
R (Arg) Arginin
S (Ser) Serin
T (Thr) Threonin
V (Val) Valin
W (Trp) Tryptophan
Y (Tyr) Tyrosin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zytokine: Signalstoffe im Immunsystem	1
1.2	Die Interleukin-12 Familie	2
1.2.1	Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Familienmitglieder	2
1.2.2	Das pro-inflammatorische Zytokin IL-23	5
1.3	Die Rolle von IL-23 im Immunsystem	6
1.3.1	Differenzierung von T-Helferzellen 17	6
1.3.2	Wirkungen von IL-23 auf zellulärer Ebene	9
1.3.3	Klinische Relevanz von IL-23	10
1.3.4	Therapieansatz: Antikörper gegen IL-23	13
1.4	Signaltransduktion von IL-23	14
1.4.1	Aufbau des Rezeptorkomplexes	14
1.4.2	Durch IL-23 induzierte Signalwege	15
1.4.3	Varianten des IL-23R	17
1.5	Ziele der Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Chemikalien	20
2.1.2	Medien und Antibiotika	20
2.1.3	Oligonukleotide	22
2.1.4	Plasmide	24
2.1.5	Bakterien und Zelllinien	24
2.1.6	Antikörper	25
2.1.7	Rekombinante Proteine	27
2.1.8	Inhibitoren	27
2.2	Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1	Präparation von Plasmid-DNA	28
2.2.2	Restriktionsanalyse von DNA	29

2.2.3	Agarosegelelektrophorese und Elution von DNA-Fragmenten	29
2.2.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
2.2.5	DNA-Sequenzierung	31
2.2.6	Polymerasekettenreaktion	31
2.2.7	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	35
2.2.8	Herstellung von glatten DNA-Enden	35
2.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten	35
2.2.10	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	36
2.3	Zellbiologische Arbeiten	37
2.3.1	Kultivierung von adhärennten Zellen	37
2.3.2	Kultivierung von Suspensionszellen	37
2.3.3	Transfektion	37
2.3.4	Retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen	38
2.3.5	Proliferationsassay	38
2.4	Proteinbiochemische Methoden	39
2.4.1	Herstellung von Lysaten	39
2.4.2	Bestimmung des Proteingehalts (BCA-Assay)	40
2.4.3	Western Blot	40
2.4.4	Durchflusszytometrie	42
3	Ergebnisse	44
3.1	Konstruktion von Rezeptorchimären des IL-23 Rezeptors	44
3.1.1	Klonierung der chimären IL-23 Rezeptoren	44
3.1.2	Funktionelle Analyse der erzeugten Rezeptorchimären	48
3.2	Klonierung und Expression von Mutations- und Deletionsvarianten	50
3.2.1	Varianten des chimären IL-23 Rezeptors	50
3.2.2	Expressionskontrolle in COS 7 Zellen	52
3.3	Generierung stabiler Ba/F3-gp130 Zelllinien	52
3.3.1	Nachweis der mIL-12R β 1 cDNA in den Ba/F3 Zelllinien	54
3.3.2	Nachweis der Rezeptoren auf der Zelloberfläche	55
3.4	Charakterisierung der IL-23-induzierten STAT3 Aktivierung	56
3.5	Analyse der Rezeptorvarianten des chimären IL-23R	58
3.5.1	R381Q zeigt ein abgeschwächtes STAT3-Signal	58
3.5.2	Mutation von Tyrosinen verhindert die STAT3 Phosphorylierung nicht	60
3.5.3	Deletion des cIL-23R verhindert STAT3 Phosphorylierung	63
3.5.4	Analyse der IL-23-abhängigen Proliferation	63
3.6	Identifikation eines neuen STAT3 Bindemotives im IL-23R	67
3.6.1	Generierung von Deletionsvarianten des murinen IL-23R	67

3.6.2	Analyse der Deletionsvarianten des murinen IL-23R	68
3.7	IL-23 aktiviert den MAPK-Signalweg	71
4	Diskussion	73
4.1	Signaltransduktion über den chimären IL-23 Rezeptor	73
4.1.1	Neues STAT3-Motiv im C-terminalen Teil des IL-23 Rezeptors	73
4.1.2	Negatives Feedback durch Socs3 verhindert IL-23-abhängige STAT3 Langzeitaktivierung nicht	76
4.1.3	Bindung von Jak2 an den IL-23R	77
4.1.4	Beteiligung von weiteren Signalwegen	78
4.2	Der murine und der humane IL-23 Rezeptor	80
4.2.1	Struktureller Vergleich	80
4.2.2	Vergleich der IL-23-abhängigen Signaltransduktion	81
4.3	Ausblick	84
5	Anhang	85
5.1	Plasmidkarten	85
5.2	Basen- und Aminosäuresequenz des chimären IL-23R	89
	Abbildungsverzeichnis	92
	Tabellenverzeichnis	94
	Literaturverzeichnis	95

Einleitung

1.1 Zytokine: Signalstoffe im Immunsystem

Zytokine regulieren das Überleben, das Wachstum, die Differenzierung, sowie die Funktion von Zellen. Hierbei handelt es sich um Polypeptide mit kleiner molekularer Masse (bis 25 kDa). Sie sind wichtige Schlüsselfiguren bei der Entstehung einer Immunantwort [1].

In multizellulären Organismen spielen Zytokine vor allem eine große Rolle in der Kommunikation zwischen den Zellen. Sie können ihre Wirkung nach der Sekretion autokrin, auf die eigene Zelle, parakrin, auf Nachbarzellen, oder endokrin, im Organismus, entfalten.

Die Klassifikation der Zytokine erfolgt nach ihrer biologischen Aktivität, ihrem strukturellen Aufbau oder entsprechend ihrer Rezeptoren.

Anhand ihrer biologischen Aktivität werden pro- und anti-inflammatorische Zytokine unterschieden. Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor (TNF), Interferon γ (IFN γ), Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-18 (IL-18) und *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) zählen unter anderem zu den pro-inflammatorischen Zytokinen, wohingegen Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-10 (IL-10) und *transforming growth factor β* (TGF β) zu den anti-inflammatorischen Zytokinen gehören.

Basierend auf ihrem strukturellen Aufbau werden Zytokine in verschiedene Familien unterteilt. Zur IL-6 Familie gehören, neben IL-6, Interleukin-11 (IL-11), *leukaemia inhibitory factor* (LIF), *oncostatin M* (OSM), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *cardiotrophin* (CT)-1, *cardiotrophin-like cytokine* (CLC) und IL-27 [1, 2]. Neben der Ähnlichkeit in ihrem dreidimensionalen Aufbau, haben diese Zytokine außerdem die Gemeinsamkeit, dass sie das Glykoprotein 130 (gp130) als Rezeptorkomponente nutzen.

Jedes Zytokin bindet spezifisch an bestimmte Oberflächenrezeptoren und löst so eine Signalkaskade in der Zielzelle aus. Die Gruppe der Typ-1-Zytokine bindet an Rezeptoren, die durch ihre molekulare Ähnlichkeit (Homologie) einer gemeinsamen Zytokin-Rezeptor-Superfamilie (Typ-1-Zytokin-Rezeptoren) zugeordnet werden können [3]. Zu dieser Gruppe

gehören unter anderem die Mitglieder der IL-6 und IL-12 Familie. Die Signaltransduktion von Typ-1-Zytokinen verläuft vor allem über den Jak-STAT-Signalweg. Dieser ist durch eine besonders schnelle Überleitung des Signals von der Zellmembran zum Zellkern charakterisiert [4].

Vier Tyrosinkinase der Janus-Familie sind in Säugetieren bekannt: Januskinase 1 (Jak1), Jak2, Jak3 und Tyrosinkinase 2 (Tyk2). Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie sieben *Jak-homology* (JH) Domänen aufweisen [4]. Dabei ist JH1 die katalytische bzw. Tandem-Kinase-Domäne. JH2 ist die Pseudokinase-Domäne und kann auch direkt mit STAT-Molekülen interagieren [5]. Der N-Terminus der Jaks bindet an den entsprechenden Zytokinrezeptor [4]. Die Jaks sind Protein-Tyrosinkinase (PTKs) und werden durch Homo- oder Heterodimerisierung aktiviert. Durch die Phosphorylierung von Tyrosinen im intrazellulären Bereich der Rezeptoren können Signalmoleküle in den Zellen aktiviert werden.

Die *signal transducers and activators of transcription* (STATs) binden an die von den Jaks phosphorylierten Tyrosine der Zytokinrezeptoren. Dafür besitzen sie eine SH2 (*Src homology 2*) Domäne. Die aktivierten STATs dislozieren im phosphorylierten Zustand von den Rezeptoren und bilden Homo- oder Heterodimere. So können sie in den Zellkern gelangen und durch Bindung an die DNA die Expression von Zielgenen (*target genes*) modulieren [6]. In Säugetieren sind sieben STATs bekannt: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6 [4].

1.2 Die Interleukin-12 Familie

Interleukine werden nach der zeitlichen Reihenfolge ihrer Entdeckung von IL-1 bis IL-37 bezeichnet [7]. Die IL-12-Familie besteht aus den vier heterodimeren Zytokinen IL-12, IL-23, IL-27 und IL-35 [8].

1.2.1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Familienmitglieder

Die Zytokine der IL-12 Familie setzen sich aus zwei verschiedenen Untereinheiten zusammen. Die α -Untereinheiten (p19, p28, p35) weisen dabei strukturelle Ähnlichkeiten mit IL-6 auf.

Die β -Untereinheiten (p40, Ebi3) ähneln den membrangebundenen Rezeptoren der IL-6 Familie, IL-6R α , IL-11R α und CNTFR α . Sie liegen aber als lösliche Proteine vor und besitzen keine Transmembrandomäne (TM) [9].

Die für die Signaltransduktion benötigten Rezeptoren bilden, passend zu den Zytokinen, heterodimere Rezeptorkomplexe [9]. Abb. 1.1 gibt einen Überblick über die strukturelle Ähnlichkeit der Zytokine aus der IL-12 Familie und ihrer Rezeptoren.

Zum Vergleich ist auch der IL-6 Rezeptorkomplex dargestellt.

Im Gegensatz zur IL-12 Familie ist IL-6 kein heterodimeres Zytokin. Allerdings benötigt IL-6

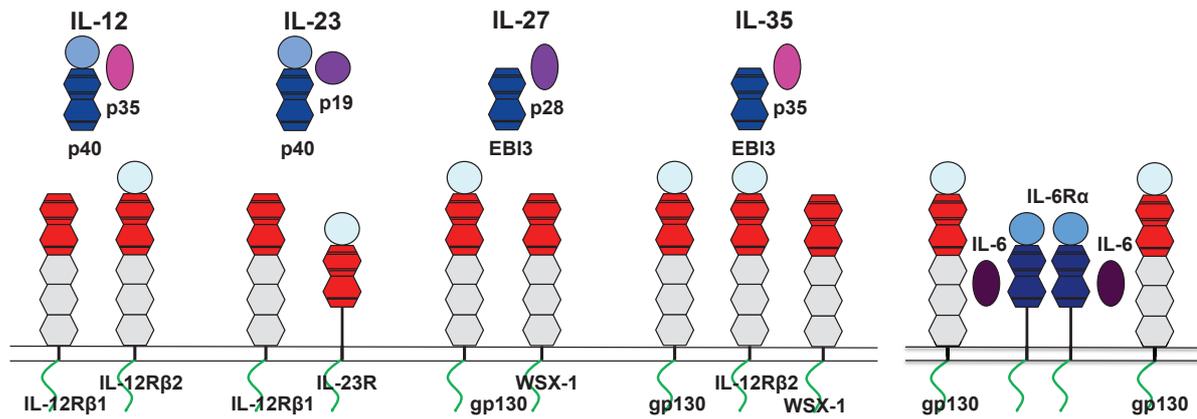


Abb. 1.1: Strukturelle Ähnlichkeit der Zytokine der IL-12 Familie und IL-6, sowie ihrer Rezeptoren (modifiziert nach Kastelein *et al.* 2007 [16])

Die extrazellulären Domänen der Rezeptoren bestehen aus Fibronectin (FN)-Typ III-ähnlichen Domänen (grau), Zytokin-Rezeptor Domänen (rot) und ggf. einer Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domäne (hellblau). Die Transmembrandomänen (schwarz) und die intrazellulären Domänen (grün) sind nicht genauer dargestellt. Innerhalb der Rezeptoren sind das WSXWS-Motiv (dicke schwarze Striche), sowie Cysteine (dünne schwarze Striche) konserviert.

IL-6 benötigt für seine Signaltransduktion zwei Moleküle gp130. Die Zytokine der IL-12 Familie bilden heterodimere Rezeptorkomplexe, wobei IL-27 und IL-35 ein Molekül gp130 benutzen. Die ECD des IL-12R β 2 ist homolog zu gp130 und wird sowohl von IL-12 als auch von IL-35 für die Signaltransduktion benötigt. IL-35 kann sowohl an ein Heterodimer aus IL-12R β 2 und gp130 oder IL-12R β 2 und WSX-1 binden, als auch an Homodimere aus IL-12R β 2 oder gp130. Der IL-12R β 1 (IL-12 und IL-23) und WSX-1 (IL-27 und IL-35) besitzen keine Ig-ähnliche Domäne. Der IL-23R hat proximal der Zellmembran keine FN-Typ III-ähnliche Domäne. Die Zytokine bestehen aus einer α -Untereinheit (IL-6, p35, p19 und p28) und einer β -Untereinheit (IL-6R α , p40, EBI3). Der IL-6R α ist membrangebunden, kann aber auch als lösliche Form (sIL-6R) vorliegen.

für seine Signaltransduktion den membrangebundenen IL-6R α , welcher der β -Untereinheit der IL-12 Zytokine ähnelt. Zudem bildet IL-6 bei seiner Signaltransduktion einen homodimeren Rezeptorkomplex aus zwei Molekülen gp130 [10], welches auf fast allen Körperzellen vorhanden ist.

Neben diesem klassischen Signalweg von IL-6 ist auch ein *trans*-Signalweg bekannt. Dabei bildet IL-6 zunächst einen Komplex mit der löslichen (*soluble*) Form des IL-6R α (sIL-6R) [11, 12, 13] und kann so alle Zellen aktivieren, die gp130 auf ihrer Oberfläche exprimieren. In dieser Variante der Signalweiterleitung ist die Ähnlichkeit zur IL-12 Familie noch deutlicher [14, 15].

IL-12 wurde 1989 als *natural killer cell stimulatory factor* (NKSF) identifiziert. Hierbei handelt es sich um ein ca. 70 kDa schweres Protein, welches ein über Disulfidbrücken verbundenes Heterodimer aus den Polypeptiden p35 und p40 ist [17]. Für die Signaltransduktion bindet IL-12 an einen Komplex, bestehend aus dem IL-12R β 1 und dem IL-12R β 2 [17, 18]. IL-23 wurde im Jahr 2000 entdeckt und besteht aus p19 und p40, die ebenfalls über Disul-

fidbrücken verbunden sind. Die genauere Beschreibung von IL-23 folgt im Kap. 1.2.2. Die Signaltransduktion verläuft über den IL-12R β 1 und den IL-23R [19] und wird im Kap. 1.4.1 weiter beleuchtet.

IL-27 ist seit 2002 bekannt und setzt sich aus *Epstein-Barr-virus-induced gene 3* (EBI3) und p28 zusammen [20]. IL-27 kann Zellen stimulieren, die die Rezeptoren WSX-1 und gp130 exprimieren [21]. WSX-1 kommt auf Lymphozyten, unter anderem auf naiven T-Zellen, vor [22]. Das jüngste Mitglied der IL-12-Familie ist IL-35, welches erstmals 2007 beschrieben wurde. Dieses Zytokin setzt sich aus p35 (IL-12 α) und EBI3 (IL-27 β) zusammen [23]. IL-35 benutzt für seine Signaltransduktion den IL-12R β 2 und gp130 [23]. Zudem kann IL-35 an einen Rezeptorkomplex aus IL-12R β 2 und WSX-1 (IL-27R α) binden [24]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass IL-35 neben diesem heterodimeren Rezeptorkomplex auch über die Bildung von Homodimeren aus IL-12R β 2 oder gp130, Signalmoleküle (STAT1 oder STAT4) aktivieren kann [25]. IL-27 und IL-35 können sowohl als Mitglied der IL-12 als auch der IL-6 Familie angesehen werden [25].

Erstaunlicherweise unterscheiden sich, trotz der strukturellen Gemeinsamkeiten, die funktionellen Effekte der Zytokine der IL-12 Familie sehr [8]. Dies kann unter anderem durch die unterschiedliche Expression und Sekretion der Zytokinuntereinheiten in verschiedenen Anteilen des Immunsystems erklärt werden [26].

IL-35 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin [23]. Dieses wird von Foxp3 (*forkhead box P3*)-positiven regulatorischen T-Zellen (Treg) produziert und hat eine hemmende Aktivität im Immunsystem [27]. Treg Zellen sind vor allem für die Selbsttoleranz von großer Bedeutung und verhindern Autoimmunität [28].

IL-27 wirkt ebenfalls anti-inflammatorisch, aber auch immunregulatorisch [29, 30]. Stimulatorisch wirkt IL-27 auf IL-10 produzierende Treg Zellen und inhibitorisch auf T-Helferzellen (TH) 17 [31, 32]. In der frühen TH1 Zellantwort kann IL-27 gemeinsam mit IL-12 die INF γ Produktion von naiven CD4⁺ T-Zellen fördern [20].

IL-12 und IL-23 sind strukturell sehr eng verwandt. Sie haben mit p40 eine gemeinsame β -Untereinheit und ihre α -Untereinheiten IL-23p19 und IL-12p35 sind homolog aufgebaut. Ihre Funktionen im Immunsystem sind allerdings unterschiedlich und eine Kreuzregulation der beiden Signalwege wird vermutet [33].

IL-12 wird vor allem von Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen produziert und ist für die Entwicklung von TH1 Zellen von großer Bedeutung, indem IL-12 deren Zellproliferation stimuliert und die Sekretion von Interferon- γ induziert [34]. TH1 Zellen sind vor allem für die Abwehr von intrazellulären Bakterien, Mykobakterien und Virusinfektionen wichtig [35]. Sie fördern die Entstehung einer systemischen Entzündungsreaktion [16].

Auf die Immunantwort von IL-23 hat IL-12 einen negativ-regulatorischen Einfluss. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die IL-17 Produktion, die von IL-23 induziert wird, durch IL-12 gehemmt wird [36, 37, 33]. Auf die Wirkung von IL-23 wird in Kap. 1.3

eingegangen.

1.2.2 Das pro-inflammatorische Zytokin IL-23

Diese Arbeit beschäftigt sich mit einem Zytokin, welches erst im Jahr 2000 entdeckt wurde. Bei der Analyse von Sequenzdatenbanken auf der Suche nach neuen Mitgliedern der IL-6 Familie, identifizierten Oppmann und Mitarbeiter (DNAX Research Institute Palo Alto, Californien) zunächst p19. Nach weiteren Versuchen zeigte sich, dass nur eine Co-Expression von p19 mit der β -Untereinheit von IL-12, p40, ein funktionelles Zytokin ergibt. Dieses wurde IL-23 genannt.

IL-23 ist demnach ein heterodimeres Zytokin, bestehend aus den Untereinheiten p19 und p40. Diese Verbindung wird durch Disulfidbrücken stabilisiert [38]. Abb. 1.2 verdeutlicht die molekulare Struktur von IL-23 [39].

Die α -Untereinheit von IL-23, p19, ist ein Polypeptid, dessen cDNA Sequenz aus 189 (human) bzw. 196 (murin) Aminosäuren besteht. Das humane und das murine p19 stimmen zu 70% überein und weisen ein Molekulargewicht von 18,7 bzw. 19,8 kDa auf [38].

Bei p19 handelt es sich um ein aus vier Helices (A-D) gebündeltes Zytokin mit einer *up-up-down-down*-Topologie und beinhaltet die *binding sites I/II/III* für die Interaktion mit p40 und den Rezeptoren IL-12R β 1 und IL-23R [40, 39]. Dieser molekulare Aufbau ist typisch für die Zytokine der IL-6 Superfamilie, wozu auch die IL-12 Familie gezählt wird. Außerdem weist p19 strukturelle Übereinstimmungen mit p35, der α -Untereinheit von IL-12, auf. Die Aminosäuresequenz stimmt aber nur zu 15% überein [39].

Von humanen Zellen wird p19 nicht oder nur sehr schwach sezerniert. In 293T-Zellen konnte gezeigt werden, dass nur bei Co-Expression von p19 und p40 eine erhöhte Sekretion von p19 auftritt [38]. Nur zusammen mit p40 bildet sich ein funktionelles Zytokin.

Die β -Untereinheit von IL-23, p40, gehört zur Gruppe der löslichen Typ-1-Zytokinrezeptoren [41]. Sie weist Ähnlichkeiten mit den α -Rezeptoren für IL-6 und CNTF auf, besitzt allerdings keine Transmembrandomäne (TM) [39].

IL12p40 besteht aus drei Domänen (D1, D2, D3) (siehe Abb. 1.2). Bei D1 handelt es sich um eine Immunglobulin-ähnliche Domäne (*S-type IG fold*), D2 und D3 sind kanonische Bindedomänen für Zytokine, die mit einer hohen Homologie in der Gruppe der Typ-1-Zytokinrezeptoren vorkommen. D3 enthält außerdem das konservierte Zytokin-Bindemotiv W-S-X-W-S [39]. Dieses ist für die richtige Faltung der Rezeptoren und für die Zytokin-Erkennung von Bedeutung [3, 9].

Strukturelle Analysen von IL-23 haben ergeben, dass für die Verbindung von p19 und p40 *loop 1* und *3* von p40 D2 und *loop 5* und *6* von p40 D3 mit den A und D Helices von p19 (*site I*) interagiert (siehe Abb. 1.2) [42]. Schröder und Kollegen aus der AG Scheller/Floss beschrieben 2015, dass D2 und D3 von p40 zudem an der Interaktion mit dem IL-23R beteiligt sind, D1 und D2 von p40 an der Interaktion mit dem IL-12R β 1 [43]. Zuvor

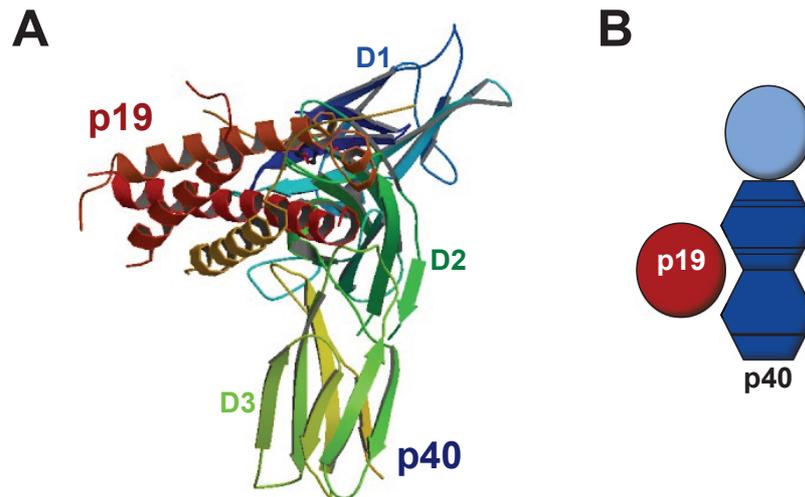


Abb. 1.2: Molekulare Struktur von IL-23 (modifiziert nach Lupardus & Garcia 2008 [39])

A: Die α -Untereinheit p19, bestehend aus vier Helices (A-D), ist in dunkelrot dargestellt; p40 mit seinen Domänen D1-D3 in blau/ grün. Abbildung aus der Protein Data Base RCSB PDB (www.rcsb.org) entnommen, PDB ID: 3DUH, [39].

B: Vereinfachte schematische Darstellung. Die β -Untereinheit p40 besteht aus einer Ig-ähnlichen Domäne (D1, hellblau) und zwei Zytokin-Bindedomänen (D2 und 3, dunkelblau). Das WSXWS-Motiv als dicker schwarzer Strich und die vier konservierte Cysteine als dünne schwarze Striche sind eingezeichnet.

wurde davon ausgegangen, dass vor allem p19 (*site III/III*) für die Bindung von IL-23 an die Rezeptoren zuständig ist [39].

In Verbindung mit p35 bildet p40 das heterodimere Zytokin Interleukin-12 (IL-12) [17].

1.3 Die Rolle von IL-23 im Immunsystem

1.3.1 Differenzierung von T-Helferzellen 17

T-Zellen sind wichtige Bestandteile der angeborenen und erworbenen Immunabwehr. Sie werden im Knochenmark produziert und wandern in den Thymus, wo sie weiter differenzieren. Unterschieden wird zwischen $CD8^+$ cytotoxischen T-Zellen (CTLs), $CD4^+$ regulatorischen T-Zellen (Treg) und $CD4^+$ T-Helferzellen (TH). Die bekanntesten Typen sind die T-Helferzellen 1 und 2. TH1 Zellen sind vor allem für die Abwehr von intrazellulären Pathogenen von Bedeutung. Sie produzieren Interferon- γ und sind an der Aktivierung von Makrophagen und der Produktion von Antikörpern beteiligt. TH2 Zellen sind vor allem für die Abwehr von Parasiten und Würmern zuständig und produzieren IL-4, -5, -9 und -13. Außerdem spielen sie eine zentrale Rolle bei der Pathogenese allergischer Reaktionen [44, 45, 35, 46].

Im Jahr 2003 wurde von Aggarwal und Mitarbeiter ein weiterer Typ von T-Helferzellen iden-

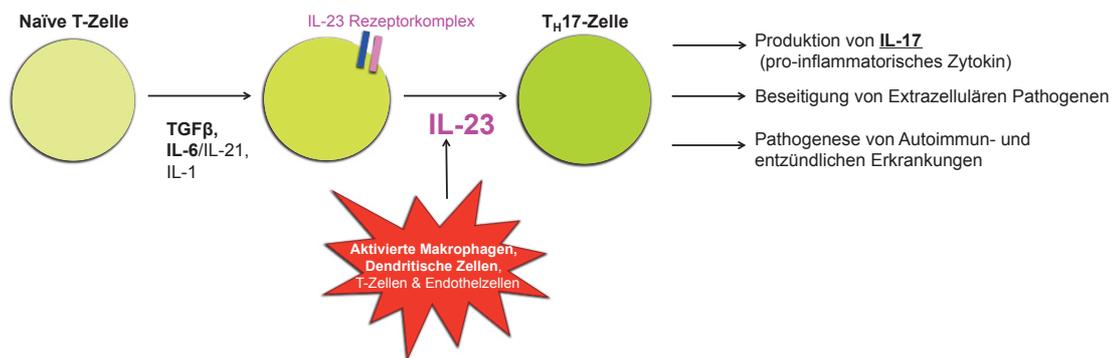


Abb. 1.3: Differenzierung zu T-Helferzellen 17 durch IL-23

TH17 Zellen entwickeln sich aus naïven T-Zellen durch Stimulation mit verschiedenen Zytokinen. Zunächst sind in murinen Zellen IL-6 und $TGF\beta$, aber auch IL-1 und IL-21 von Bedeutung [50, 51]. Durch die Stimulation dieser Zytokine differenzieren die T-Zellen und exprimieren auf der Oberfläche weitere Rezeptoren. Bei Expression des IL-23 Rezeptorkomplexes, bestehend aus IL-12R β 1 und IL-23R, kann IL-23 an die T-Zellen binden. IL-23 wird von aktivierten Makrophagen, dendritischen Zellen, seltener von T-Zellen oder Endothelzellen sekretiert [38] und führt zur Aufrechterhaltung des TH17 Zelltypstatus [54]. Die ausgereiften TH17 Zellen spielen eine große Rolle bei der Entstehung von Entzündungsreaktionen.

tifiziert. Da dieser vor allem durch die Produktion von IL-17 charakterisiert ist, wurden sie TH17 Zellen genannt [36]. Viele ihrer Funktionen wurden bis dahin den TH1 Zellen zugeschrieben [35, 47].

TH17 Zellen entwickeln sich aus naïven T-Zellen. Diese sind $CD4^+$ und $CD161^+$ und zudem durch den Chemokinrezeptor CCR6 auf ihrer Oberfläche gekennzeichnet [48]. Sie stammen aus Nabelschnurblut und postnatal aus dem Thymus [49].

Naïve T-Zellen können durch IL-23 allein nicht aktiviert werden [38]. Für die Differenzierung zu TH17 Zellen werden zunächst andere Signalmoleküle benötigt. Dabei gibt es Unterschiede zwischen den murinen und den humanen Zellen. Murine TH17 Zellen benötigen für ihre Differenzierung IL-6 und $TGF\beta$. IL-21 und IL-1 können die Entwicklung in Kombination mit IL-6 und $TGF\beta$ unterstützen [50, 51]. Für humane TH17 Zellen scheint vor allem IL-1 β wichtig zu sein [52]. IL-6 trägt ebenfalls zur Differenzierung bei. $TGF\beta$ hingegen scheint einen negativen Einfluss auf die Entwicklung der TH17 Zellen beim Menschen zu haben [53]. Abb. 1.3 zeigt im Überblick die Differenzierung einer naïven T-Zelle zur TH17 Zelle und ihre Funktion im Immunsystem.

Für die endgültige Differenzierung von IL-17-produzierenden T-Zellen und für die Aufrechterhaltung des TH17 Zellstatus ist IL-23 essentiell. Dafür müssen die unreifen T-Zellen aber die Rezeptoren exprimieren, die für die IL-23-vermittelte Signaltransduktion nötig sind (IL-23R und IL-12R β 1, siehe Kap. 1.4.1). Studien belegen, dass die Entwicklung von TH17 Zellen in IL-23R-defizienten Mäusen (IL-23R $^{-/-}$) in einer frühen Phase unterdrückt wird. Die Produktion von IL-17 ist in diesen Mäusen deutlich reduziert [54].

IL-23 wird von polarisierten TH1 Zellen, Endothelzellen und aktivierten dendritischen Zellen im peripheren Blut, sowie von aktivierten Makrophagen gebildet und sezerniert [38]. IL-23-produzierende Makrophagen sind pro-inflammatorische Typ1-Makrophagen, die durch extra- oder intrazelluläre Pathogene aktiviert werden [55].

Dendritische Zellen exprimieren verschiedene *toll-like* Rezeptoren (TLR) auf ihrer Oberfläche, mithilfe derer sie mikrobielle Bestandteile erkennen können. Durch Stimulation der TLR werden die dendritischen Zellen aktiviert und leiten eine Immunantwort ein. Eine Stimulation von TLR2 führt zur erhöhten Synthese von p19 und damit zur gesteigerten Sekretion von IL-23 [56, 57, 58]. Darüber hinaus erhöhen über NOD2 (*nucleotide oligomerisation domain 2*) aktivierte dendritische Zellen die Produktion von IL-17 in T-Gedächtniszellen [59]. Eine Fehlregulation dieses Signalweges wird mit Morbus Crohn in Verbindung gebracht [60] (siehe Kap. 1.3.3).

Die Differenzierung von TH17 Zellen wird durch den Transkriptionsfaktor ROR γ t (*retinoic acid-related orphan receptor γ t*) induziert [61]. Die Expression von ROR γ t wiederum wird durch den Transkriptionsfaktor STAT3 reguliert [62]. Bei Vorhandensein von IL-23 wird durch die Aktivierung von STAT3 und ROR γ t die Expression vom IL-23R, sowie von IL-17 und IL-22 erhöht. Somit kommt es zu einem positiven *feed-forward loop* und zur Stabilisierung des TH17 Zelltyps [8, 63].

IL-12 und IL-27 inhibieren den Transkriptionsfaktor ROR γ t und haben dadurch einen negativen Einfluss auf die Differenzierung von TH17 Zellen [64]. In naive T-Zellen wird durch IFN γ und IL-4 STAT1 aktiviert [47] und durch IL-2 STAT5. Dies wiederum führt zu einer Verminderung der Signaltransduktion von IL-23 über STAT3 und hemmt somit ebenfalls die Differenzierung von TH17 Zellen [65]. IFN γ hat zudem die Eigenschaft, die Produktion von IL-27 zu stimulieren und von Opn (Osteopontin) zu hemmen. Für Opn konnte eine positive Regulation von IL-17 produzierenden Zellen nachgewiesen werden [32].

Die differenzierten TH17 Zellen sind durch ihre Produktion von IL-17 gekennzeichnet. Die IL-17 Familie besteht aus sechs Zytokinen, IL-17A, B, C, D, E, F. TH17 Zellen produzieren IL-17A und F. Diese Zytokine bilden durch Disulfidbrücken verbundene Homo- oder Heterodimere [66, 46] und wirken pro-inflammatorisch. IL-17 aktiviert Neutrophile Granulozyten und erhöht die Produktion von IL-1, IL-6 und TNF, welche für akute Entzündungsreaktionen wichtig sind [33]. Neben IL-17 produzieren TH17 Zellen auch IL-6, IL-22 und TNF α [67].

TH17 Zellen sind Bestandteil der angeborenen und der erworbenen Immunität. Einteilen lassen sie sich in induzierbare, natürliche und Gedächtnis-TH17 Zellen, die sich in ihrer Entwicklung und Funktion unterscheiden [68].

Sie kommen vor allem in Schleimhäuten und in lymphatischen Strukturen vor, wobei die größte Expression im Dünndarm gefunden wird [69]. TH17 Zellen spielen eine bedeutende Rolle bei der Abwehr extrazellulärer Pathogene. Im Rahmen des angeborenen Immunsystems werden dendritische Zellen und Makrophagen durch mikrobielle Bestandteile

aktiviert und zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen angeregt. Hierzu zählt auch IL-23, das wiederum zur Differenzierung von TH17 Zellen führt (siehe Abb. 1.3). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass der IL-23-TH17-Signalweg bei der Abwehr von Pilzen (u.a. *Candida albicans* [70], *Aspergillus fumigatus* [71]), Bakterien (u.a. *Salmonella enteritidis* [72], *Bordetella pertussis* [73], *Mycoplasma pneumonia* [74], *Streptococcus pneumoniae* [75]) und Mycobakterien [76] beteiligt ist [69].

Neben den physiologischen Funktionen der TH17 Zellen bei der Entstehung einer Immunantwort, spielen sie auch eine zentrale Rolle bei der Pathogenese von Autoimmun- und chronisch entzündlichen Erkrankungen (siehe Kap. 1.3.3).

IL-23 hat aber nicht nur pro-inflammatorische Eigenschaften. IL-22, dessen Sekretion von IL-23 erhöht wird, führt beispielsweise zu einer Hemmung von Entzündungsreaktionen in der Leber [77] und im Darm [78].

Außerdem wird die Sekretion von IL-12 durch IL-23 negativ reguliert [79]. Dadurch wird die Komplexität des Netzwerkes der Zytokine deutlich, welches noch nicht vollständig erfasst und erklärt werden kann.

1.3.2 Wirkungen von IL-23 auf zellulärer Ebene

IL-23 ist ein zentrales Zytokin im Rahmen von Entzündungsreaktionen [67]. Abb. 1.4 gibt einen Überblick über die verschiedenen Wirkungen von IL-23 auf zellulärer Ebene.

Der zentrale Bestandteil der IL-23-vermittelten Immunantwort ist die Differenzierung von TH17 Zellen. IL-23 kann jedoch auch direkt (als *end stage effector cytokine*) auf Makrophagen und dendritische Zellen wirken [80], da diese den IL-23R exprimieren können [19]. IL-23 induziert auf diese Weise die Produktion von IL-1, IL-12 und TNF α und auch von IL-23 selbst, welches autokrin wieder Makrophagen stimulieren kann (*autocrine loop*) [81].

Ein weiterer Zelltyp, der den IL-23R exprimiert, sind die $\gamma\delta$ T-Zellen. Zusammen mit IL-1 regt IL-23, über Aktivierung von ROR γ t, diese Zellen zur Produktion von IL-17, IL-21 und IL-22 an. Die $\gamma\delta$ T-Zellen werden als wichtige Quelle für IL-17 angesehen und spielen so eine entscheidende Rolle bei Entzündungsreaktionen und Autoimmunität. Sie verstärken die Immunantwort der TH17 Zellen [82].

$\gamma\delta$ T-Zellen kontrollieren in einer frühen Phase der Entzündungsreaktion über IL-17 Produktion die Einwanderung von Neutrophilen Granulozyten [83, 84]. Außerdem entfalten $\gamma\delta$ T-Zellen ihre pro-inflammatorische Wirkung, indem sie die Differenzierung von konventionellen T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen unterdrücken [85]. Dies wird über den Transkriptionsfaktor Foxp3 reguliert. Das Gleichgewicht zwischen TH17 Zellen und iTreg Zellen (*induced regulatory T cells*) scheint vor allem für die balancierte Entzündungsreaktion im Darm wichtig zu sein [86, 87].

Eine weitere Zelllinie, die von IL-23 aktiviert werden kann, sind die iNKT17 Zellen (*invariant natural killer T cells*). Diese Zellen sind an der Pathogenese von Atemwegserkrankungen

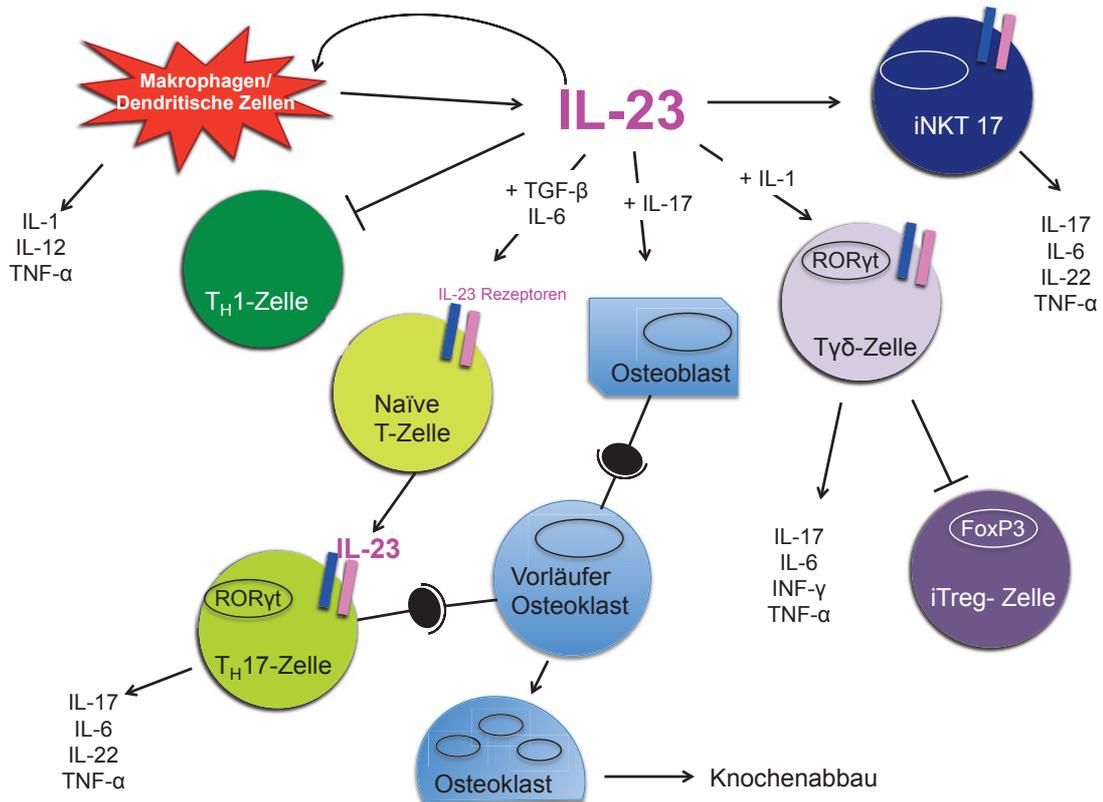


Abb. 1.4: Wirkungen von IL-23 (modifiziert nach Duvallet *et al.* 2011 [67])

IL-23 ist ein zentrales Zytokin in Entzündungsreaktionen. Im Zusammenspiel mit anderen proinflammatorischen Zytokinen entfaltet es seine Wirkung über positive und negative Regulation im immunologischen Netzwerk.

beteiligt [88] und sind u.a. durch die Sekretion von IL-17, sowie IL-6, TNF α und IL-22 gekennzeichnet [67].

Zusammen mit IL-17 induziert IL-23 die Expression von RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) auf mesenchymalen Stammzellen, Osteoblasten und CD4⁺ T-Zellen (z.B. TH17 Zellen) [89]. IL-23 stimuliert außerdem die RANK Expression auf myeloiden Vorläuferzellen von Osteoklasten [89]. Durch die Interaktion von RANK/RANKL wird die Differenzierung von Osteoklasten und damit der Knochenabbau gefördert.

1.3.3 Klinische Relevanz von IL-23

IL-23 ist klinisch von großer Bedeutung, da es eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen spielt.

In verschiedenen Tiermodellen für Experimentelle Autoimmun Encephalomyelitis (EAE), *collagen-induced arthritis* (CIA) und CED wurde ein Zusammenhang von IL-23 und autoimmuner Zellzerstörung hergestellt [64].

Ursprünglich wurden einige dieser Reaktionen der Wirkung von IL-12 zugeordnet. Heute beweisen Studien die unterschiedlichen Funktionen dieser beiden strukturell ähnlichen Zytokine und erlauben eine Zuordnung der verschiedenen Immunantworten (siehe Kap. 1.2.1).

Die Induktion von EAE in Tiermodellen dient zur Erforschung der Pathogenese von Multipler Sklerose (MS). Erste Versuche mit modifizierten Mäusen wurden 2003 von Cua und Mitarbeiter in Californien [80] durchgeführt. Die defizienten Mäusen konnten kein IL-23 ($p19^{-/-}$), kein IL-12 ($p35^{-/-}$) oder weder IL-12 noch IL-23 ($p40^{-/-}$) exprimieren. Die Ergebnisse zeigen, dass nur die $p19^{-/-}$ und $p40^{-/-}$ Mäuse resistent gegen EAE waren. Ohne IL-23 kann EAE also nicht induziert werden. Die $p35^{-/-}$ Mäuse hingegen waren sehr anfällig für EAE. Die Autoimmunität ist ohne IL-12 erhöht. Dies lässt sich durch das negative Feedback erklären, welches IL-12 auf die Entwicklung von TH17 Zellen ausübt. Fehlt IL-12 ($p35^{-/-}$) entfällt diese Hemmung und führt zu einer erhöhten Wirkung der IL-23-IL-17-Immunreaktion [80].

Im Jahr 2005 wurden diese Ergebnisse bestätigt: $p19^{-/-}$ Mäuse zeigten eine reduzierte IL-6 und nicht messbare IL-17 Produktion. Die Entwicklung von TH1 Zellen und die Produktion von $IFN\gamma$ war jedoch nicht gestört. Die Mäuse waren resistent gegen EAE [90].

Neben den Ergebnissen aus den Experimenten zu EAE in Mausmodellen wurde auch beim Menschen eine Verbindung des IL-23-IL-17-Signalweges und der Pathogenese von MS hergestellt. Durch Opn stimulierte $CD4^+$ T-Zellen von MS-Patienten produzieren signifikant mehr IL-17 [91].

IL-23 ist auch im Rahmen von autoimmun-getriggerten Arthritiden beteiligt. Die Knochenzerstörung kann auf die Aktivierung von Osteoklasten über die erhöhte RANKL Expression durch IL-23/IL-17 zurückgeführt werden (siehe Kap. 1.3.2).

Tiermodelle zu Rheumatoider Arthritis (RA) zeigten eine stark erhöhte Expression von IL-23 in entzündeten Gelenken. Außerdem war IL-23 bei Patienten mit RA im Serum, in der Gelenkflüssigkeit und in der Synovialmembran im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhöht [92, 93]. In gezielten Versuchen mit genetisch veränderten Mäusen wird das Modell der CIA genutzt. Dabei zeigten $p19$ defiziente Mäuse ($p19^{-/-}$, IL-23 wird nicht exprimiert) keine IL-17-produzierenden $CD4^+$ T-Zellen und eine vollständige Resistenz gegen die Entwicklung von Gelenk- und Knochenpathologien [37]. In einem anderen CIA-Modell wurde eine Korrelation zwischen der Höhe des IL-17 Levels und der Schwere der Knorpel-/Knochenschäden gezeigt [94]. Erhöhte Serumlevel von IL-23/IL-17 wurden auch bei Patienten mit Spondyloarthritis (SpA) nachgewiesen [95].

Bei der Entwicklung von Psoriasis spielt die Assoziation zwischen der IL-23-TH17-Achse und Keratinozyten außerdem eine Rolle [96]. Hierbei handelt es sich um eine chronisch entzündliche Erkrankung der Haut mit einer multifaktoriellen Pathogenese. In psoriatischen Hautläsionen wurden erhöhte Spiegel von IL-17 und IL-22 gefunden. Diese Zytokine werden

von TH17 Zellen ausgeschüttet und sind zentrale Elemente bei Entzündungsreaktionen in der Haut [97].

Zudem konnte eine Assoziation zwischen genetischen Varianten des IL-23R und der Pathogenese von Psoriasisarthritis und Psoriasis vulgaris nachgewiesen werden [98].

Eine Behandlung mit Ustekinumab, einem monoklonalen Antikörper gegen p40, zeigte gute Wirksamkeit bei der Behandlung von Psoriasis [97] (siehe Kap. 1.3.4).

In der Darmschleimhaut, vor allem im Ileum [99, 69], ist die Konzentration von IL-23 am höchsten [67]. IL-23 ist hier für die Abwehr von Bakterien wichtig. Für die Induktion einer zellulären Immunantwort scheint die Hemmung der regulatorischen T-Zellen durch IL-23 besonders bedeutsam zu sein. IL-23 p19^{-/-} Mäuse zeigen keine angemessene Immunantwort auf pathogene Darmkeime [100].

Versuche mit Mäusen, deren CD4⁺ T-Zellen keinen IL-23R besitzen (IL-23R^{-/-}) zeigten, dass IL-23 für lokale Entzündungsreaktionen im Magen-Darm-Trakt, aber nicht für systemische Entzündungen verantwortlich ist. Die Mehrzahl dieser Mäuse entwickelten im Darm nur minimale Entzündungsreaktionen mit wenig zellulären Infiltraten. Die systemische Entzündungsreaktion, gemessen u.a. an Splenomegalie, hepatischen Infiltraten und Gewichtsverlust, zeigte sich jedoch unverändert im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen [86].

IL-23 ist zudem an der Entstehung von CED, wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, beteiligt. Eine Mutation von NOD2, einem intrazellulären Rezeptor in Dendritischen Zellen (siehe Kap. 1.3.1), kann zum Beispiel zu einer Fehlregulierung von IL-23 führen und kommt bei Patienten mit Morbus Crohn gehäuft vor [60, 59]. Eine Mutation im IL-23R Gen (Chromosom 1p31, siehe Kap. 1.4.1) hingegen führt zu einem Schutz gegen Morbus Crohn, indem die Signaltransduktion von IL-23 verhindert wird [101]. Des Weiteren wurde in der entzündeten Schleimhaut von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa eine erhöhte Expression von IL-17, IL-21, IL-22, IL-23, ROR γ t und IL-23R gefunden [102].

Die Studien unterstreichen die Schlüsselposition, die die IL-23-TH17-Achse bei Entzündungsreaktionen im Darm einnimmt. Die Bedeutung für Therapieansätze für Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, die bisher nur unzureichend behandelt werden können, wird somit deutlich (siehe Kap. 1.3.4).

Neben der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen ist IL-23 auch an Entstehung und Wachstum von verschiedenen Tumoren, zum Beispiel Papillomen, beteiligt [103]. Außerdem korreliert eine Überexpression von IL-23 bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen mit erhöhten VEGF (*vascular endothelial growth factor*)-Leveln und begünstigt damit das Wachstum des Tumors [104, 67]. Signifikant erhöhte Werte von IL-23 und IL-17 wurden im Gewebe verschiedener Tumore beim Menschen nachgewiesen [103].

Dem gegenüber steht eine Studie, die eine anti-Tumor Aktivität von IL-23 gegen B-ALL (Akute lymphatische Leukämie der B-Zellreihe) bei Kindern zeigt. In diesem Fall wird IL-23 sogar als mögliche Therapieoption gesehen [105].

1.3.4 Therapieansatz: Antikörper gegen IL-23

Die Beteiligung von IL-23 bei chronischer Entzündung und Pathogenese von Autoimmunerkrankungen macht es zu einem interessanten Angriffsziel für neue Medikamente [93].

Die Substanzklasse der Biologika umfasst monoklonale Antikörper, die gegen verschiedene Komponenten des Immunsystems gerichtet sind. Zu den Bekanntesten gehören die TNF α -Blocker, zum Beispiel Infliximab und Adalimumab, die unter anderem bei der Therapie von Psoriasis, CED und RA eingesetzt werden. Sie hemmen das Immunsystem und haben dabei ein relativ breites Wirkspektrum. Allerdings beinhaltet dies auch viele Nebenwirkungen und beispielsweise bei Patienten mit CED ist eine Nichtansprechrate von 33% zu verzeichnen [106, 86]. Neue Erkenntnisse zur Pathogenese von Autoimmunerkrankungen sollen zu einer gezielteren Therapie führen.

Ustekinumab ist ein humaner monoklonaler IgG1 κ Antikörper, der gegen die p40 Untereinheit von IL-12 und IL-23 gerichtet ist [107]. Ursprünglich wurde er als Antikörper gegen humanes IL-12 entwickelt, bevor sich zeigte, dass er ebenfalls eine hemmende Wirkung auf IL-23 besitzt [108]. Mittlerweile wird Ustekinumab für die Behandlung von Psoriasis eingesetzt. Die PHOENIX 1 [109] und PHOENIX 2 [110] Studien waren randomisierte, Placebo kontrollierte klinische Studien der Phase 3 mit Psoriasis Patienten. Die Wirksamkeit des p40-Antikörpers wurde bestätigt, denn 67 bis 75% der Patienten sprachen auf die Therapie an [108]. Seit 2009 ist Ustekinumab unter dem Handelsnamen StelaraTM zur Behandlung erwachsener Patienten mit mittelschwerer bis schwerer Plaque-Psoriasis zugelassen [111, 112].

Ustekinumab senkt die pathologisch erhöhte Expression von T Zellen, IL-23, IFN γ und IL-8 in Hautläsion von Psoriasis-Patienten, hat aber keine systemische, generalisierte Immunsuppression zur Folge [108]. Darin könnte ein Vorteil gegenüber der breiten immunsuppressiven Therapie, mit beispielsweise Methotrexat (MTX, Klasse der Folsäure-Antagonisten), liegen, welches bisher die Standardtherapie für Immunerkrankungen wie Psoriasis ist.

Ebenfalls ein humaner, monoklonaler IL-12/IL-23 p40 Antikörper ist Briakinumab [113]. Ergebnisse klinischer Studien zeigten auch hier die Möglichkeit zum Einsatz in der Therapie von Psoriasis [114, 93].

Zudem wurde eine Assoziation zwischen der Pathogenese von Diabetes mellitus Typ 1 und IL-23 gefunden: IL-17 und INF γ induzieren die Zerstörung von β -Zellen im Pankreas. Somit ist IL-23 über die Induktion der IL-17 Produktion an der Entwicklung von Autoimmundiabetes beteiligt. Eine Therapie, unter anderem mit dem monoklonalen p40-Antikörper Ustekinumab wird in der frühen Phase der Erkrankung als mögliche Option diskutiert [115]. Secukinumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen IL-17A. Eine randomisierte, placebokontrollierte, doppel-blind Studie mit Patienten, die an einer moderaten bis schweren Form von M. Crohn erkrankt sind, zeigte jedoch, dass eine Therapie mit Secukinumab hier ineffektiv ist. Zudem trat eine erhöhte Rate von unerwünschten Nebenwirkungen, zum

Beispiel eine erhöhte Zahl von Pilzinfektion, auf [116]. Diese Ergebnisse unterscheiden sich allerdings von Studien zu RA und Psoriasis. Bei den Patienten konnten positive Effekte durch die Therapie mit Secukinumab beobachtet werden [117, 118].

Auch monoklonale Antikörper die sich spezifisch gegen IL-23 richten, anti-IL-23p19 Antikörper, sind in der Entwicklung [119]. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass sie Colitis vorbeugen und behandeln können [120, 102]. Die beiden Substanzen Guselkumab und Tildrakizumab werden bereits in klinischen Studien für die Behandlung von Psoriasis Patienten getestet und zeigen gute Ergebnisse [121, 122].

1.4 Signaltransduktion von IL-23

1.4.1 Aufbau des Rezeptorkomplexes

Für die Signaltransduktion von IL-23 wird ein heterodimerer Rezeptorkomplex benötigt [33], der in Abb. 1.5 dargestellt ist. Dieser besteht aus dem IL-12R β 1 und dem IL-23R [19].

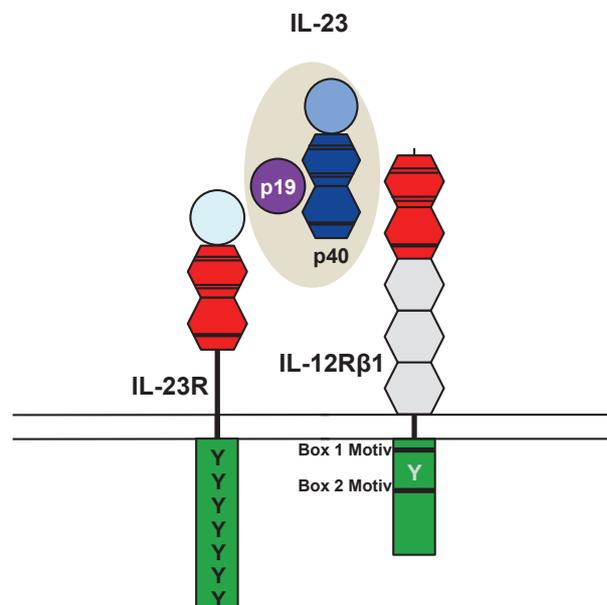


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des Rezeptorkomplexes von Interleukin-23 (modifiziert nach Langrish *et al.* 2004 [33])

Das heterodimere Zytokin IL-23, mit den Untereinheiten p19 (lila) und p40 (blau) dargestellt, bindet an einen Rezeptorkomplex bestehend aus dem IL-12R β 1 und dem IL-23R. Die extrazellulären Domänen sind aufgebaut aus einer N-terminalen Ig-ähnlichen Domäne (hellblau), den Zytokin-Rezeptor Domänen (rot), sowie den transmembran-proximal FN-TypIII Domänen (grau). WSXWS-Motive (dicke schwarze Striche) und konservierte Cysteine (dünne Striche) sind gekennzeichnet. Die intrazelluläre Domäne (grün) des murinen und humanen IL-23R enthält sieben Tyrosine. Die intrazelluläre Domäne des IL-12R β 1 beinhaltet ein Box1 und Box2 Motiv, sowie im murinen Rezeptor ein Tyrosin (Y635).

Der IL-12R β 1 ist zusammen mit dem IL-12R β 2 auch für die Signaltransduktion von IL-12 notwendig [123]. IL-23 bindet jedoch nicht an den IL-12R β 2 [19].

Die p40 Untereinheit, die sowohl Bestandteil von IL-12 als auch von IL-23 ist, interagiert mit dem IL-12R β 1, der so für die Signaltransduktion beider Zytokine essentiell ist [19].

Der murine IL-12R β 1 besteht aus 719 Aminosäuren. Die Sequenz stimmt zu 45% mit dem humanen Rezeptor überein. Beide enthalten ein WSXWS-Motiv, welches charakteristisch für die Zytokinrezeptor-Superfamilie ist. Die intrazelluläre Domäne (ICD) des murinen Rezeptors enthält einen Tyrosinrest (Y⁶³⁵), der in der humanen Sequenz nicht vorhanden ist. Im humanen und murinen Rezeptor sind Box 1 und 2 Motive konserviert [124, 18].

Der IL-23 Rezeptor (IL-23R) wurde 2002 als neues Mitglied der Hämopoetin-Rezeptor-Familie identifiziert. Er bildet zusammen mit dem IL-12R β 1 den Rezeptorkomplex für IL-23. Das humane IL-23R Gen ist auf Chromosom 1 (1p31.2-32.1) lokalisiert [19]. Der IL-23R wird von aktivierten T-Zellen und T-Gedächtniszellen, Natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen), Eosinophilen Granulozyten, Dendritischen Zellen, Makrophagen, Mikroglia [80, 38, 19, 125] und Keratinozyten [126] exprimiert. Die Induktion der IL-23R mRNA ist von STAT3 und ROR γ t abhängig (siehe Kap. 1.3.1) [69, 62].

Der murine IL-23R besteht aus 644 Aminosäuren und stimmt zu 66% mit dem humanen Rezeptor überein. Die extrazelluläre Domäne (ECD) besteht aus einer N-terminalen Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domäne und zwei Zytokin-Rezeptor Domänen. Dieser Aufbau stimmt mit der Struktur des IL-12R β 2 überein, der zusätzlich noch drei transmembranproximale Fibronectin (FN)-TypIII Domänen besitzt (vgl. Abb.1.1). Der humane (h) und auch der murine (m) IL-23R enthalten eine Sequenz, WQPWS, die dem Zytokinrezeptor-Motiv WSXWS ähnelt.

Die intrazelluläre Domäne (ICD) des IL-23R enthält sieben Tyrosine, die als potentielle Phosphorylierungsstellen für die Signaltransduktion von Bedeutung sind. Sechs dieser Tyrosine sind in Mensch und Maus konserviert. Der mIL-23R und hIL-23R unterscheiden sich in einem Tyrosinrest. Das murine Y⁵⁴²PNFQ ist im humanen Rezeptor nicht vorhanden, wohingegen zusätzlich Y⁴⁶³PQ zu finden ist [19].

1.4.2 Durch IL-23 induzierte Signalwege

Über den heterodimeren Rezeptorkomplex, bestehend aus IL-12R β 1 und IL-23R, werden verschiedene Signalmoleküle durch IL-23 aktiviert. Dabei scheint der Jak-STAT-Signalweg im Mittelpunkt zu stehen.

Che Mat und Kollegen zeigten 2011 in Western Blot Analysen, dass IL-23 die Phosphorylierung von Tyk2, Jak2, STAT1, STAT3 und STAT4 induzieren kann [63]. Dabei ist STAT3 das zentrale Molekül für die Signaltransduktion von IL-23. Dies ist bereits 2002 von Parham und Kollegen beschrieben worden [19, 16].

Der IL-12R β 1 ist mit Tyk2 (*tyrosine kinase 2*), einem Mitglied der Familie der Januskinasen

(siehe Kap. 1.1), assoziiert. Diese Bindung besteht schon im Ruhezustand [18]. Bei Aktivierung des Rezeptorkomplexes kommt es über die ICD des IL-12R β 1 zur Phosphorylierung von Tyk2. Dies wurde in Versuchen mit Ba/F3 Zellen bewiesen, die stabil mit Chimären aus der ECD von EGF (*epidermal growth factor*) und der Transmembrandomäne (TM) und ICD vom IL-12R β 1 (E12R1) oder β 2 (E12R2) transfiziert worden waren. Nur Zellen, die intrazelluläre Anteile vom IL-12R β 1 enthielten, zeigten eine Phosphorylierung von Tyk2 [18].

Der IL-23R ist konstitutiv mit Jak2 und Liganden-abhängig mit STAT3 assoziiert [19]. Die putative Jak2 Bindestelle ist im proximalen Bereich der ICD des IL-23R, nahe der TM, postuliert. Sie umfasst 15 Aminosäuren und ist in vielen Spezies konserviert [127]. Das Arginin R381 liegt zwischen der TM und der Jak2 Bindestelle. Ein Aminosäureaustausch an dieser Stelle könnte die Bindung von Jak2 und damit die Signalweiterleitung über den IL-23R beeinträchtigen (SNP R381Q, siehe Kap. 1.4.3). Zudem liegt Tyrosin Y397 (hIL-23R) bzw. Y416 (mIL-23R) innerhalb der Sequenz, die als Bindestelle von Jak2 identifiziert wurde.

Insgesamt sind innerhalb des IL-23R sieben Tyrosine lokalisiert, die als potentielle Phosphorylierungsstellen für die Signaltransduktion gelten. Die Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die postulierten Bindestellen für Signalmoleküle innerhalb der Intrazellulären Domäne des murinen und humanen IL-23R.

$Y^{m416/h397}$ EDI ist als mögliche SHP2 (*Src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase 2*) Bindestelle für Proteine mit *Src homology 2* (SH2) Region, z.B. PI3K und STAT, identifiziert worden [128]. Im phosphorylierten Zustand können Signalmoleküle an solche Tyrosinreste binden und aktiviert werden.

$Y^{m626/h611}$ FPQ umfasst das klassische Bindemotiv für STAT1 und STAT3 [1, 19, 129]. Für STAT1 wurde die Sequenz aus pY-X-P/R-P/R/Q (Phosphotyrosin-(Aspartat/Glutamat)-(Prolin/Arginin)-(Arginin/Prolin/Glutamin)) als Bindemotiv beschrieben, wohingegen pY-X-P-Q (Phosphotyrosine-(basisch/hydrophob)-(Prolin/basisch)-Glutamin) als STAT3 Bindemotiv deklariert ist [129].

$GY^{m504/h484}$ KPQIS ähnelt dem Bindemotiv für STAT4, welches innerhalb des IL-12R β 2 beschrieben ist (G-Y-L/V-P-S) [130, 131].

Das Aktivierungsmuster der verschiedenen STAT Proteine durch IL-12 und IL-23 ist sehr ähnlich. Beide Zytokine können STAT1, 3, 4 und 5 aktivieren [19]. Die Phosphorylierung von STAT4 durch IL-12 ist jedoch deutlich stärker als durch IL-23. Die Aktivierung von STAT4 durch IL-12 ist für die Differenzierung von naïven CD4⁺ T-Zellen zu IFN γ -produzierenden TH1 Zellen von zentraler Bedeutung [132, 133]. Bei IL-23 scheint hingegen primär STAT3 das Signal zu vermitteln [19]. Daher wurde der Schwerpunkt dieser Arbeit auf die Aktivierung von STAT3 gelegt, die komplexer als nur über kanonische, Tyrosin-abhängige Aktivierung zu sein scheint [134].

Neben dem Jak-STAT-Weg wird auch die Beteiligung weiterer Signalwege diskutiert [135].

Tabelle 1.1: Intrazelluläre Domäne des IL-23R

murin	human	postulierte Bindestellen
R ⁴⁰⁰ IGI	R ³⁸¹ TGI	JAK2 [127]
Y ⁴¹⁶ EDI	Y ³⁹⁷ EDI	SHP2 [19, 128]
Y ⁴⁴⁸ VPD	Y ⁴²⁹ VDP	
Y ⁴⁶⁹ KKE	Y ⁴⁵⁰ KKE	
	Y ⁴⁶³ PQ	
Y ⁴⁹⁶ IPD	Y ⁴⁷⁶ IPD	
Y ⁵⁰⁴ KPQ	Y ⁴⁸⁴ KPQ	STAT4 [130, 131]
Y ⁵⁴² PNFQ		
Y ⁶²⁶ FPQ	Y ⁶¹¹ FPQ	STAT 1 / 3 [1, 19, 129]

Dabei konnte die Aktivierung von PI3K (*Phosphoinositide 3-kinases*) und NF- κ B (*Nuclear factor κ B*) über Jak2 schon nachgewiesen werden [52]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es über die Aktivierung von PI3K/Akt ebenfalls zu einer Phosphorylierung von STAT3 kommen kann [52]. Auch eine Aktivierung der MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*)-Kaskade durch IL-23 ist denkbar. Bei der Signaltransduktion von IL-6 ist dies über eine SHP2-Bindestelle von gp130 beschrieben [136] (siehe Diskussion Kap. 4.1.4).

Für die negative Regulation der IL-23-vermittelten Immunantwort wurde eine Assoziation mit Socs3 (*suppressor of cytokine signalling 3*) beschrieben. Diese Proteine können mit ihren SH2-Domänen an phosphorylierte Tyrosinreste binden und so die Signalweiterleitung, zum Beispiel über Jak2, unterbrechen. Versuche mit Socs3-defizienten T-Zellen zeigten eine erhöhte STAT3 Phosphorylierung und eine erhöhte IL-17 Produktion [137]. Ob diese negative *feedback*-Schleife bei der Signaltransduktion von IL-23 aber tatsächlich eine Rolle spielt, ist bisher fraglich (siehe Diskussion Kap. 4.1.2).

1.4.3 Varianten des IL-23R

Einzelnukeotid-Polymorphismen, SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), beschreiben den Austausch einer Base im DNA-Strang. Bei synonymen SNPs kodiert das veränderte Basentriplett für dieselbe Aminosäure und es kommt trotz Mutation nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz. Davon zu unterscheiden sind nicht-synonyme SNPs. Der Basenaustausch kann außerdem in einer kodierenden oder einer nicht-kodierenden DNA-Region liegen. Liegt ein nicht-synonymer SNP in einer kodierenden Region vor, kann dies Auswirkungen auf die Funktion des Proteins haben, welches aus der Aminosäuresequenz entsteht. Für den IL-23R sind verschiedene dieser SNPs beschrieben, die erheblichen Einfluss auf das Immunsystem des Menschen haben.

Beim Menschen sind vor allem zwei Varianten des IL-23R beschrieben. Für die Variante P³¹⁰L (rs7530511) wird das Auftreten mit einer Häufigkeit von 2-30% und für die Variante R³⁸¹Q (rs11209026) von 0-17% (abhängig von der Population) beschrieben [138, 139]. Der Austausch von Arginin 381 zu Glutamin (R³⁸¹Q) scheint einen Einfluss auf die Signaltransduktion von IL-23 zu haben und führt zu einem unter Umständen wünschenswerten Schutz gegen Autoimmunität [140]. In CD8⁺ T-Zellen und TH17 Zellen, die die genetische Variante des IL-23R, R³⁸¹Q, aufwiesen, wurde eine verminderte STAT3 Phosphorylierung durch IL-23 festgestellt. Außerdem konnte eine verminderte IL-17 Produktion, sowie eine reduzierte Zahl von zirkulierenden TH17 nachgewiesen werden [140, 141].

Vermutet wird, dass durch die Nähe von R³⁸¹ in der Aminosäuresequenz zur putativen Jak2 Bindestelle des IL-23R, die Spezies-übergreifend konserviert ist, ein *loss-of-function allele* entsteht. Die protektive Wirkung, die durch R³⁸¹Q gegenüber experimentell induzierter Entzündung in Mäusen vermittelt wird, unterstreicht die besondere Bedeutung von IL-23 im Immunsystem und bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen [127].

Dagegen zeigen Studien zu weiteren genetischen Varianten des IL-23R einen negativen Einfluss auf die Gesundheit der betroffenen Menschen. So konnte ein Zusammenhang zwischen verschiedenen SNPs im IL-23R und einer erhöhten Anfälligkeit für Psoriasis hergestellt werden [98].

Die Mutation von Prolin 310 zu Leucin (P³¹⁰L) wurde vermehrt bei Patienten mit Morbus Basedow (*Grave's disease*, Autoimmunerkrankung der Schilddrüse) gefunden [139].

SNPs im IL-23R wurden zudem mit einem erhöhten Risiko an Krebs zu erkranken in Verbindung gebracht, beispielsweise ein erhöhtest Auftreten von Ösophaguskarzinomen [142], Magenkarzinomen, Blasenkarzinomen und akuter myeloischer Leukämie wurde beschrieben [143].

Diese Studien verdeutlichen die klinische Relevanz, die vom IL-23R ausgeht.

1.5 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit befasst sich mit der Signaltransduktion von Interleukin-23. Das Hauptaugenmerk liegt auf dem humanen IL-23R und der Signaltransduktion über dessen intrazelluläre Domäne (ICD).

IL-23 besteht aus den Untereinheiten p19 und p40 und bindet an einen heterodimeren Rezeptorkomplex aus IL-12R β 1 und IL-23R. Verschiedene Bindestellen für Signalmoleküle wurden innerhalb der Rezeptoren identifiziert. Bei der IL-23 vermittelten Signaltransduktion scheint vor allem die Aktivierung des Jak-STAT-Weges, insbesondere STAT3, wichtig zu sein. Der IL-23R besitzt in seiner ICD sieben Tyrosinreste, die potentiell phosphoryliert werden können, was dann zur Aktivierung weiterer Signalmoleküle führen kann.

Welche Tyrosinreste sind an der STAT3 Phosphorylierung beteiligt?

Ziel der Arbeit ist, zu untersuchen, welche Tyrosine innerhalb des humanen IL-23R eine Rolle bei der Signaltransduktion spielen. Vor allem die Aktivierung von STAT3 soll dabei analysiert werden. Für diese Versuche werden Chimären mit der ECD des murinen und der ICD des humanen IL-23R konstruiert. Zusätzlich werden Mutations- und Deletionsvarianten der ICD des humanen IL-23R mittels PCR hergestellt. Jeweils eine Variante des chimären IL-23R wird zusammen mit dem murinen IL-12R β 1 transient in HeLa Zellen transfiziert bzw. stabil in Ba/F3-gp130 Zellen transduziert. Die Zellen werden durch IL-23 aktiviert und die STAT3 Phosphorylierung im Western Blot analysiert.

Gibt es weitere Signalwege, die durch IL-23 aktiviert werden?

Neben dem JAK-STAT-Signalweg wird die Beteiligung weiterer Signalwege an der IL-23 vermittelten Signaltransduktion diskutiert. Dieser Aspekt soll mithilfe der erzeugten IL-23R-Varianten ebenfalls untersucht werden. Neben der Analyse im Western Blot, wird die Fähigkeit zur Proliferation der konstruierten Ba/F3-gp130 Zelllinien unter Stimulation mit IL-23 untersucht.

Da IL-23 eine wichtige Rolle im Immunsystem spielt und an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beteiligt ist, können die Ergebnisse dieser Arbeit als Grundlagen bei der Entwicklung möglicher neuer Therapieoptionen helfen.

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

In Tabelle 2.1 ist ein Auszug der verwendeten Chemikalien dargestellt. Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, BRD), Merck KGaA (Darmstadt, BRD) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, BRD) bezogen.

2.1.2 Medien und Antibiotika

2.1.2.1 Medien für die Kultivierung von Bakterien

Die Zusammensetzungen der Medien erfolgte nach Bertani (1951) [144]. Alle Medien wurden sterilisiert und die steril filtrierten Antibiotika nach Abkühlung auf 50°C zugegeben.

<i>lysogeny broth</i> (LB)- Medium	1% NaCl
	1% Trypton
	0,5% Hefeextrakt
	H ₂ O
<i>lysogeny broth</i> (LB)- Platten	1% NaCl
	1% Trypton
	0,5% Hefeextrakt
	2% Agar
	H ₂ O

Tabelle 2.1: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid-Mix	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
FBS (<i>fetal bovine serum</i>)	Life Technologies, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Milchpulver (<i>blotting grade</i>)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SDS Pellets	Roth, Karlsruhe
Streptavidin-HRP	R&D Systems, Minneapolis, USA
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris HCl	Merck KGaA, Darmstadt
Tween20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.2.2 Medien für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen

DMEM(-/-)	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine</i>
DMEM(+/+)	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine</i> +10% FBS +1% Penicillin/ Streptomycin

Die Medien wurden von Life Technologies (Darmstadt, BRD) und PAA Laboratories GmbH (Cölbe, BRD) bezogen.

Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, Eppendorfer-Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml), Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml), Petrischalen und Zellkulturschalen stammten vor allem von den Firmen TAA (Trasadingen, Schweiz), Eppendorf (Hamburg, BRD) und Sarstedt (Nürnbrecht, BRD).

2.1.2.3 Antibiotika

Für die Selektion von mit Plasmid-DNA transformierten Bakterienkolonien und transfizierten/ transduzierten eukaryotischen Zellen wurden folgende Antibiotika eingesetzt:

Tabelle 2.2: Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration	Firma
Ampicillin	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kanamycin	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Puromycin	1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Hygromycin	1 mg/ml	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Penicillin/ Streptomycin	10000 U Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm

2.1.3 Oligonukleotide

Tab. 2.3 gibt eine Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide und ihre Basensequenzen.

Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Primer	Nukleotidsequenz 5'-3'
mIL-23R B pF1	CAACTACACGTCCATCTGGATG
mIL23R-TM fwd	ATTTAACAGATCATTCCGAACTGGGATTAAAAG
mIL-23R-TM rev	GTTTCGGAATGATCTGTAAATATCCCAATC
hIL-23R-TM fwd	GACATTGGACTTTTATTGGGAATGATCGTC
hIL-23R-TM rev	TCCCAATAAAAAGTCCAATGTCTTGATGA
hIL-23R-Not rev	CTGCGGCCGCTTTTCCAAGAGTGAAATCC
mIL-12R β 1 pF1	CTTTGTCCCTCCGAACCATA
mIL-12R β 1 pR1	GGTCGTCCTGGTCCAGTTGT
mIL-12R C pF1	CACGACACGTGTCCGGTGA
c-myc pR1	CATTCAGATCCTCTTCTGAGATG
mIL-23R pF4	GCACTAGTGCTACAATCTTCAGAGGACATCCT
5' mGAPDH	GAAGGGCTCATGACCACAGT
3' mGAPDH	CATTGTCATAACCAGGAAATGAGCT
R381Q	GGGATATTTAACAGATCATTCCAAACTGGGATTAAAAGAAGGATC
R381Q antisense	GATCCTTCTTTTAATCCCAGTTTGAATGATACTGTAAATATCCC
Y397F	AGAAGGATCTTATTGTTAATACCAAAGTGGCTTTTTGAAGATATTCCTAATAT
Y397F antisense	ATATTAGGAATATCTTCAAAAAGCCACTTTGGTATTAACAATAAGATCCTTCT
Y463F	CCCCTGGAGACAAGAGACTTCCCGCAAAC
Y463F antisense	GTTTTGCGGGAAGTCTCTTGTCTCCAGGGG
Y484F	TATTCCTGATCTCAACTGGATTTAAACCCCAAATTTCAAATTTTC
Y484F antisense	GAAAATTTGAAATTTGGGGTTTAAATCCAGTGTTGAGATCAGGAATA
Y611F	GAATGAGGAGTTGCCATCTATTAATACTTTTTTCCACAAAATATTTTGAAAG
Y611F antisense	CTTTCCAAAATATTTTGTGGAAAAAAGTATTAATAGATGGCAACTCCTCATT
cIL-23R delta FP	CATCCTGCTTCAGGTAATCATCAAGAC
cIL-23R delta RP	GACTGCGGCCGCTACAAGTGTAGTATTG
mIL-23R Xmi fwd	CTAGGAATGTTGTCTACCAGTTCTTCTG
mIL-23R D5 rev	GACGCGGCCGCTTTCAATCTGGCAAAGTGGTC
mIL-23R D6 rev	GACGCGGCCGCGAGCCATACTTGAAGCAG
mIL-23R D7 rev	GACGCGGCCGCATTAATAGATGGCAAGTCTTC

2.1.4 Plasmide

Plasmide sind kleine, ringförmige DNA-Fragmente, die in der Gentechnik zum Einbringen von genetischem Material in Zellen genutzt werden. Sie sind meistens Träger von Antibiotikaresistenzgenen, wodurch die Plasmide den Zellen, in die sie eingebracht werden, einen Selektionsvorteil verschaffen.

pCR-Script

Klonierungsvektor mit Ampicillinresistenzgen (Stratagene, Agilent Technologies, La Jolla, USA).

pcDNA3.1

Eukaryotischer Expressionsvektor für die transiente und stabile Proteinexpression mit bakteriellem Ampicillinresistenzgen (Invitrogen, Carlsbad, USA).

p409

Eukaryotischer Expressionsvektor mit bakterieller Ampicillinresistenz [145].

pMOWS-puro/ hygro-GFP

Retroviraler Expressionsvektor mit bakteriellem Ampicillinresistenzgen, sowie Expression von GFP (*green fluorescent protein*). Die Selektion der transduzierten eukaryotischen Zellen erfolgt mittels Puromycin (pMOWS-puro-GFP, [146]) oder Hygromycin B (pMOWS-hygro-GFP, [147]).

2.1.5 Bakterien und Zelllinien

2.1.5.1 Bakterien

XL-1blue

Genotyp: *endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB+ lacIqΔ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)*

XL-1 blue ist ein Stamm des gram-negativen Bakteriums *Escherichia coli* der Firma Stratagene (Agilent Technologies, La Jolla, USA).

2.1.5.2 Zelllinien

HeLa

HeLa Zellen (ACC-57) sind menschliche Tumorzellen aus Epithelzellen eines Zervixkarzinoms von *Henrietta Lacks*. Sie wurden vom Leibniz Institut DSMZ (Braunschweig) bezogen.

COS 7

Bei COS 7 (*Cercopithecus aethiops, origin-defective SV-40*) Zellen (ACC-60) handelt es sich um Fibroblasten aus der Niere der grünen Meerkatze (Affengattung). Sie wurden ebenfalls vom DSZM (Braunschweig) bezogen.

Phoenix-Eco

Diese Verpackungszelllinie (HEK293T, *human embryonic kidney 293 T cell line*) wird für die retrovirale Transduktion von Ba/F3-Zellen genutzt [146] (siehe Kap. 2.3.4).

Sie wurde zur Verfügung gestellt von U. Klingmüller (DKFZ, Heidelberg).

Ba/F3-gp130

Ba/F3 ist eine murine prä-B-Zelllinie, die nur in Abhängigkeit von IL-3 proliferiert [148].

Die Zellen wurden zusätzlich mittels Elektroporation stabil mit humanem gp130 beladen und proliferieren somit auch in Gegenwart des Designer-Zytokins Hyper-IL-6 [149, 150].

Die Zellen wurden von Immunex (Seattle, USA) bezogen.

Ba/F3-gp130 mIL-12R β 1

Ba/F3-gp130-Zellen, die stabil mit der cDNA des murinen IL-12R β 1 transduziert wurden [134]. Diese Zelllinie diente als Grundlage für die weiteren durch retrovirale Transduktion hergestellten Zelllinien, die für die Experimente dieser Arbeit genutzt wurden.

Ba/F3-gp130 mIL-12R β 1mIL-23R (muriner WT)

Ba/F3-gp130 mIL-12R β 1-Zellen, die stabil mit der cDNA des murinen IL-23R transduziert wurden. Diese Zelllinie proliferiert daher auch in Gegenwart des Designer-Zytokins mHIL-23 (siehe Abb. 3.10, S. 53, [134]).

2.1.6 Antikörper

Die für Western Blot und FACS Analysen verwendeten Antikörper und Bindemoleküle sind in den Tabellen 2.4 und 2.5 aufgeführt.

Tabelle 2.4: Primärantikörper

Antikörper	Informationen	Konzentration	Verdünnung
α -myc (9E10)	Muriner monoklonaler Antikörper. Fällung aus dem Überstand der Hybridoma Zelllinie 9E10 unter Verwendung von Ammoniumsulfat und anschließend Lösung in PBS	k. A.	1:20
α -myc (71D10)	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA)	125 $\mu\text{g/ml}$	1:1000
α -mIL-23R <i>biotin</i> (BAF1686)	Biotinylierter, monoklonaler Antikörper, der an die ECD des murinen IL-23R bindet (R&D Systems, Minneapolis, USA)	200 $\mu\text{g/ml}$	1:1000
α -mIL-12R <i>biotin</i> (BAF1998)	Biotinylierter, monoklonaler Antikörper, der an die ECD des murinen IL-12R β 1 bindet (R&D Systems, Minneapolis, USA)	200 $\mu\text{g/ml}$	1:1000
α -P-STAT3 (Tyr705) (D3A7)	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA)	79 $\mu\text{g/ml}$	1:1000
α -STAT3 (124H6)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA)	150 $\mu\text{g/ml}$	1:1000
α -P-p44/42-ERK (Thr202/ Tyr204)	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA)	501 $\mu\text{g/ml}$	1:1000
α -p44/ 42-ERK	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA)	41 $\mu\text{g/ml}$	1:1000

Tabelle 2.5: Sekundärantikörper

Antikörper	Informationen	Konzentration	Verdünnung
α -mouse POD	<i>ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L)</i> (Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland, Bonn)	400 $\mu\text{g/ml}$	1:5000
α -rabbit POD	<i>ImmunoPure Peroxidase Conjugated Rabbit Anti-Goat IgG (H+L)</i> (Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland, Bonn)	400 $\mu\text{g/ml}$	1:5000

2.1.7 Rekombinante Proteine

2.1.7.1 Hyper-IL-6

Hyper-IL-6 (HIL-6) ist ein humanes Fusionsprotein bestehend aus IL-6 und dem löslichen IL-6R (sIL-6R) [149]. Für die Auslösung der IL-6-abhängigen Signaltransduktion reicht es aus, wenn auf der Oberfläche der Zellen gp130 vorhanden ist [151]. Für zellbiologische Arbeiten wurde das gereinigte HIL-6 in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt.

2.1.7.2 murines Hyper-IL-23

Das Designer-Zytokin murines Hyper-IL-23 (mHIL-23) besteht aus den Untereinheiten p19 und p40, die mit einem rekombinanten Peptid-Linker (RGGGGSGGGGSVE) verbunden sind [38]. In der Arbeitsgruppe von Prof. Scheller wurde eine stabile CHO-K1 Zelllinie erzeugt, die dieses Protein in den Überstand sezerniert. Die biologische Aktivität konnte *in vitro* nachgewiesen werden [134]. Zellen, die den mIL-12R β 1 und den mIL-23R auf ihrer Oberfläche exprimieren, können durch mHIL-23 aktiviert werden. Für Kultur, Proliferation und Stimulation von Zellen wurden 0,2% vom konditionierten Zellüberstand der stabilen CHO-K1 Zelllinie benutzt. Die Konzentration an mHIL-23 wurde mittels ELISA bestimmt und betrug 55 $\mu\text{g/ml}$ [134].

2.1.8 Inhibitoren

PD98059

Spezifischer Inhibitor von MAP-Kinase-Kinasen (MEK), CAS-Nummer 167869-21-8, bezogen von Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, BRD. Der Inhibitor wurde in Western

Blot Analysen mit einer Konzentration von 20 μM gelöst in DMSO eingesetzt.

U0126

Spezifischer, nicht-kompetitiver Inhibitor von MEK1 ($\text{IC}_{50} = 72 \text{ nM}$) und MEK2 ($\text{IC}_{50} = 58 \text{ nM}$), CAS-Nummer 109511-58-2, bezogen von Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, BRD. Der Inhibitor wurde in Western Blot Analysen ebenfalls mit einer Konzentration von 20 μM gelöst in DMSO eingesetzt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

2.2.1.1 Mini-Präparation

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurden folgende Puffer verwendet:

Solution 1 (S1) 50 mM Glucose
25 mM Tris-HCl pH 8,0
10 mM EDTA pH 8,0
1:1000 RNase

Solution 2 (S2) 0,2 mM NaOH
1% SDS

Solution 3 (S3) 60 ml 5M Kaliumacetat
11,5 ml Essigsäure
28,5 ml H_2O

Zum Aufreinigen kleiner Mengen Plasmid-DNA wurde zunächst eine einzelne Bakterienkolonie in 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C und 140 rpm kultiviert. Nach Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, Raumtemperatur) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 μl des RNase-haltigen S1-Puffers resuspendiert. 200 μl S2-Puffer wurden hinzugegeben und nach Durchmischen mit 150 μl S3-Puffer versehen. Nach einer Inkubationszeit von 10 min folgte eine Zentrifugation bei 4°C (10 min, 13000 rpm). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurde die Lösung mit 900 μl 100% Ethanol versetzt. Anschließend wurde die DNA mittels Zentrifugation (10-15 min, 13000 rpm, 4°C) präzipitiert. Der Überstand wurde entfernt und das DNA-Pellet mit 500 μl 70% Ethanol gewaschen. Nach Entfernen des Ethanols wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet und in 30 μl H_2O gelöst.

Alternativ wurde die Plasmid-DNA mit dem GeneJet Plasmid Miniprep Kit der Firma Fermentas GmbH (St. Leon-Roth, BRD) isoliert.

Dazu wurden einzelne Bakterienkolonien in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert (180 rpm). Die DNA wurde nach Anweisungen des Herstellers isoliert und mit 30 μl H₂O eluiert.

1 μl der erhaltenen DNA wurde durch Restriktionsanalyse überprüft (siehe Kap. 2.2.2).

2.2.1.2 Midi-Präparation

Für die Präparation größerer Mengen DNA wurde das NucleoBond Xtra Midi/ Maxi-Kit (Machery-Nagel GmbH&Co.KG, Düren, BRD) eingesetzt.

Hierfür wurden 100 ml LB-Medium (mit dem entsprechenden Antibiotikum) mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation wurde die DNA nach Anweisungen des Herstellers isoliert und anschließend in 100 μl H₂O gelöst.

Die erhaltene DNA wurde mittels Restriktionsspaltung analysiert (siehe Kap. 2.2.2) und ihre Konzentration im NanoDrop (siehe 2.2.4) bestimmt.

2.2.2 Restriktionsanalyse von DNA

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die die DNA an bestimmten Sequenzen schneiden (Erkennungssequenz). Dabei hinterlassen sie entweder glatte DNA-Enden (*blunt-ends*) oder sogenannte kohäsive/ klebrige Enden (*sticky-ends*), bei denen die beiden DNA-Stränge leicht versetzt geschnitten werden, sodass einzelsträngige Enden entstehen.

Die Restriktionsspaltung wurde im Rahmen dieser Arbeit zur DNA-Präparation für Klonierungen und zur Analyse der cDNA nach Klonierungsexperimenten eingesetzt.

Der Ansatz für eine Reaktion setzt sich wie folgt zusammen:

0,5 μl Enzym (Fermentas GmbH, St.Leon-Roth)

1 μl enzymespezifischer Puffer (Fermentas GmbH, St.Leon-Roth)

1 μl Plasmid-DNA (Konzentration < 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

ad. 10 μl H₂O

Nach einer Inkubation von mindestens 2 h bei 37°C wurden die Fragmente durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt (siehe Kap. 2.2.3).

2.2.3 Agarosegelelektrophorese und Elution von DNA-Fragmenten

Plasmid-DNA, mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA und PCR-Fragmente wurden elektrophoretisch in Agarosegelen bei konstanter Spannung (70-120 V) der Größe nach aufgetrennt. 1-2% der Polysaccharid Agarose wurden in dem Puffer TAE (Tris-Acetat-EDTA) aufgeköcht. Das Gel wurde mit 0,1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Ethidiumbromid gefärbt, welches zwischen den

Basenpaaren von DNA interkaliert und so die DNA-Fragmente sichtbar macht.

Vor dem Auftragen wurde die DNA mit Ladebuffer (6x) versetzt.

Für die Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden die Marker *GeneRuler Express DNA ladder* (100-5000 bp), *GeneRuler 1 kb DNA ladder* (250-10000 bp) und *GeneRuler 50 bp DNA ladder* (50-1000 bp) der Firma Fermentas GmbH (St.Leon-Roth, BRD) verwendet und zusätzlich auf das Gel aufgetragen.

Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente anhand ihrer Größe im elektrischen Feld, erfolgte die Auswertung der Agarosegele mit einem UV-Transilluminator (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, BRD) und wurde per Kamera dokumentiert.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

TAE (Tris-Acetat-EDTA)	2 M Tris 100 mM EDTA <i>ad</i> H ₂ O <i>ad</i> 1000 ml pH 8
6xDNA-Ladebuffer	30% Glycerol 50 mM EDTA <i>orange</i> pH 8

2.2.3.1 DNA-Extraktion aus Agarosegel/ Reinigung von PCR-Produkten

DNA-Fragmente oder PCR-Produkte wurden mit Hilfe des NucleoSpin Extract II-Kits (Machery-Nagel GmbH&Co.KG, Düren, BRD) extrahiert.

Die gewünschten Fragmente wurden hierfür auf einem UV-Tisch mit Hilfe eines Skalpellens aus dem Agarosegel geschnitten. Die Reinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers über Silica-Membranen in NucleoSpin-Säulen, von denen die DNA mittels 30 μ l H₂O eluiert wurde. Anschließend wurde die Größe der Fragmente erneut durch Agarosegelelektrophorese überprüft und die DNA-Konzentration bestimmt (siehe Kap. 2.2.4).

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mithilfe des NanoDrop ND-1000 (Peqlap Biotechnologie GmbH, Erlangen) wurde die Konzentration der isolierten DNA spektrometrisch bestimmt.

DNA, RNA und freie Nukleotide haben über die aromatischen Ringe ihrer Basen die Fähigkeit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm zu absorbieren, was für die Messung benutzt wird.

Zur Überprüfung der Reinheit wurde das Verhältnis der Absorption bei Wellenlänge 260 nm zu 280 nm betrachtet. Bei Nukleinsäurepräparationen sollte dies zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzanalysen der klonierten Plasmide erfolgten durch die Firma GATC Biotech AG. Hierfür wurden 30 μl DNA mit einer Konzentration von 80-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und der entsprechende Primer in einer Konzentration von 10 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ benötigt. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit dem Programm *ClustalW2 Multiple Sequence Alignment* vom *European Bioinformatics Institute* (Cambridge, UK).

2.2.6 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) wurde von Kary Mullis 1985 beschrieben [152] und dient in erster Linie der Vervielfältigung (Amplifikation) von DNA-Abschnitten.

Die Reaktionsschritte laufen in einem Thermocycler (Mastercycler, Eppendorf, Hamburg, BRD) bei definierten Temperaturen ab.

Kurze, komplementäre DNA-Stücke (Primer) werden benutzt, um den DNA-Abschnitt einzugrenzen, der vervielfältigt (repliziert) werden soll. An diese Primer setzen dann die Polymerasen an, die mit Hilfe von dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) einen komplementären Strang an die im Zwischenschritt einzelsträngig vorliegende DNA aufbauen.

2.2.6.1 Mutagenese-PCR

Bei der Mutagenese-PCR soll der DNA-Abschnitt nicht nur repliziert werden, sondern zusätzlich eine Punktmutation eingeführt werden. Dies gelingt durch die Wahl der Primer, die an der Stelle, an der die Mutation erfolgen soll, nicht komplementär zum vorliegenden DNA-Strang sind. Außerdem wurde die Phusion DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland, Bonn) eingesetzt, bei der ein *Pyrococcus*-ähnliches *proofreading*-Enzym mit einer prozessivitätssteigernden Domäne durch Fusion einer Doppelstrang-bindenden Domäne kombiniert wurde. Dadurch kann die Amplifikation der DNA-Abschnitte erfolgen.

Folgender PCR-Ansatz wurde hergestellt:

- 1 μl Phusion DNA Polymerase (2 U/ μl)
- 10 μl Phusion HF (*High-Fidelity*) Puffer
- 0,5 μl Primer (100 $\text{pmol}/\mu\text{l}$)
- 1 μl 10 mM dNTP

1 μl DNA (*template*: pcDNA3.1 cIL-23R)
ad 50 μl H₂O

Von vier hergestellten Ansätzen enthielten zwei (A) den *sense*- und zwei (B) den *antisense*-Primer. Die Primer waren jeweils so gewählt, dass sie sich in ihrer Sequenz vom *template* (pcDNA3.1 cIL-23R) in einer Base unterscheiden. Dies führte dann zur gewünschten Punktmutation.

Zur Durchführung der PCR wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

1. Initiale Denaturierung 4 min 98°C

15 Zyklen:

2. Denaturierung 1 min 98°C

3. Annealing 1 min 52°C

4. Elongation 4 min 72°C

5. Finale Elongation 12 min 72°C

Danach wurden die PCRs mit den verschiedenen Primern (*sense* und *antisense*) vereinigt. Hierzu wurden je 25 μl von Ansatz A mit 25 μl von Ansatz B zusammen gegeben. Dazu wurde 1 μl Phusion DNA Polymerase pipettiert und ein zweiter PCR-Durchgang mit gleichem Temperaturprogramm gestartet.

Das PCR-Produkt wurde mit dem Kit NucleoSpin Extract II aufgereinigt (siehe Kap. 2.2.3.1). Die restliche, methylierte *template*-DNA wurde enzymatisch durch Restriktionsverdau mit DpnI entfernt.

2.2.6.2 Deletions-PCR

Um deletierte Varianten des Rezeptors herzustellen, wurden Primer verwendet, die nur den N-terminalen Teil der Rezeptor-DNA eingrenzen. Eingesetzt wurde außerdem die Pfu DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland, Bonn) aus dem hyperthermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus*. Diese hat die Eigenschaft, DNA in 5' \rightarrow 3' Richtung zu verdoppelt und weist zusätzlich eine 3' \rightarrow 5' *proofreading* Funktion auf.

Folgender Ansatz wurde verwendet:

0,5 μl Pfu DNA Polymerase (2,5 U/ μl)

5 μl Puffer Pfu + 20mM MgSO₄

3 μl Primer *forward* (100 pmol/ μl)

3 μl Primer *reverse* (100 pmol/ μl)

1 μl 10 mM dNTP

1 μl DNA (*template*: pcDNA3.1 cIL-23R)
ad 50 μl H₂O

Die PCR wurde mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung 5 min 95°C

30 Zyklen:

2. Denaturierung 1 min 95°C

3. Annealing 1 min 60°C

4. Elongation 4 min 72°C

5. Finale Elongation 12 min 72°C

2.2.6.3 SOE-PCR

Um zwei oder mehrere PCR-Fragmente miteinander zu ligieren, wurde eine *splicing by overlapping extensions PCR* (SOE-PCR) durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 1 μl der einzelnen PCR-Ansätze als *template* verwendet. Ansatz und Temperaturprogramm waren analog zur Durchführung der Deletions-PCR.

Das Prinzip der SOE-PCR wird in Abschnitt 3.1.1 weiter erläutert.

2.2.6.4 Colony-PCR

Die *Colony-PCR* ist neben der Restriktionsanalyse eine Möglichkeit zur Analyse von Bakterienklonen nach Klonierungsexperimenten. Dafür wurden die Bakterienkolonien auf der Platte markiert, mit einer Spitze angepickt und in ein PCR-Tube mit 20 μl H₂O überführt.

Die Spitze wurde anschließend in 2 ml LB-Medium abgeworfen, um eventuell für eine Über-Nacht-Kultur verwendet zu werden.

Das PCR-Tube wurde verschlossen und 5 min bei 95°C inkubiert.

Anschließend wurde folgender PCR-Ansatz hergestellt:

1 μl Dream Taq (1 U/ μl)

5 μl Dream Taq Puffer

4 μl MgCl₂ (25 mM)

2,5 μl Primer A (100 pmol/ μl)

2,5 μl Primer B (100 pmol/ μl)
1 μl 10mM dNTP
ad 50 μl H₂O

Danach konnte die PCR mit folgendem Temperaturprogramm gestartet werden:

1. Initiale Denaturierung 5 min 95°C

30 Zyklen:

2. Denaturierung 1 min 95°C

3. Annealing 1 min 61°C

4. Elongation 4 min 72°C

5. Finale Elongation 12 min 72°C

Die Länge der erhaltenen DNA-Fragmente wurde dann mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Kap. 2.2.3) bestimmt.

2.2.6.5 RT-PCR

In dieser Arbeit wurde die RT-PCR (PCR mit Reverser Transkriptase) verwendet, um die aus den Ba/F3 Zelllinien isolierte RNA zu überprüfen (siehe Kap. 3.3.1). Dafür müssen die RNA-Moleküle zunächst in einzelsträngige cDNA umgeschrieben werden.

Folgender Ansatz wurde hergestellt:

2 μg RNA

1 μl oligo-dT-Primer (100 pmol)

ad 13 μl H₂O

Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 70°C und daraufhin Abkühlung auf Raumtemperatur wurden dem Ansatz folgendermaßen erweitert:

1 μl *RevertAid M- MuLV Reverse Transcriptase* (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, BRD)

4 μl 5xRT-Puffer 2 μl dNTP-Mix (10 mM)

Der Ansatz wurde für 60 min bei 42°C und abschließend für 10 min bei 72°C inkubiert. Für die anschließende PCR wurde 1 μl der entstandenen cDNA eingesetzt. Der Ansatz und das Temperaturprogramm der folgenden PCR ist identisch mit dem der *Colony-PCR*.

2.2.7 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um einen Expressionsvektor (z.B. p409) für eine Ligation vorzubereiten, muss dieser zunächst linearisiert werden. Dafür erfolgte ein Restriktionsverdau über Nacht bei 37°C. Dann wurde das Enzym inaktiviert, indem der Ansatz 20 min bei 65°C inkubiert wurde.

Um nach dem Restriktionsverdau zu verhindern, dass sich 3'- und 5'-Ende des Vektors wieder verbinden, wurde der Vektor dephosphoryliert. Dafür wurde der Ansatz mit 3 µl Fast-AP, 1 µl Fast-AP-Puffer und 6 µl H₂O ergänzt und anschließend 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 5 min bei 75°C inaktiviert. Danach wurde die DNA nach Anweisung des Gelextraktionskits (NucleoSpin Extract II) gereinigt.

2.2.8 Herstellung von glatten DNA-Enden

Bei der Präparation des retroviralen Plasmids pMOWS-puro-GFP (6527 bp) hinterlässt der Restriktionsverdau mit BamH1 ein klebriges Ende (*sticky end*). Um ein glattes Ende (*blunt end*) zu erzeugen wurde der 5'-Überhang mithilfe eines Klenow Fragments (Fermentas GmbH, St-Leon-Roth, BRD) aufgefüllt. Dabei handelt es sich um ein großes Fragment der DNA Polymerase 1, welches nur den DNA-Aufbau von 5' nach 3' unterstützt.

Folgender Ansatz wurde hergestellt:

25 µl DNA (nach Gelextraktion)

0,5 µl Klenow Fragment

3 µl Klenow Puffer (10-fach)

0,5 µl 2 mM dNTP

ad 30 µl H₂O

Die Reaktion wurde 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend 10 min bei 95°C inaktiviert. Nachdem der Vektor dephosphoryliert wurde, kann er zur Ligation genutzt werden.

2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Um weitere Versuche mit klonierten DNA-Fragmenten durchführen zu können, müssen diese in Expressionsvektoren eingebracht werden. Die verwendeten Plasmide sind in Abschnitt 2.1.4 aufgeführt. Die Verknüpfung von *insert* und Vektor erfolgt mithilfe eines Enzyms, der DNA-Ligase, welches unter ATP-Hydrolyse Esterbindungen zwischen zwei DNA-Fragmenten knüpft.

Für die Berechnung der *insert*-Menge zur Ligation der DNA-Fragmente wurde folgende Formel benutzt:

$$Masse_{insert} = \frac{5 \times Masse_{vektor} \times Länge_{insert}}{Länge_{vektor}}$$

Zu diesem Ansatz wurden 2 μ l T₄-DNA Ligase (Fermentas GmbH, St.-Leon-Roth, BRD) und 2 μ l DNA Ligase Puffer gegeben. Bei glatten DNA-Enden wurden zusätzlich 2 μ l PEG4000 (Polyethylenglycol) hinzu gegeben. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 20 μ l aufgefüllt und mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.10 Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien

2.2.10.1 Transformation mittels *heat-shock*

Für die Transformation mittels *heat-shock* wurden chemisch-kompetente XL1-blue Zellen (*E.coli*) hergestellt. Dafür wurden zunächst 5 ml einer Übernachtskultur in 500 ml LB-Medium überführt. Unter Schütteln wurden die Zellen bis zu einer optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) von 0,5-0,8 bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Bakteriendichte wurde der Ansatz bei 4°C und 5000 rpm 15 min lang zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 140 ml eiskalter Calciumchloridlösung (50 mM) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zentrifugation (4°C, 5000 rpm, 15 min) wurde wiederholt und das Zellpellets in 25 ml eiskalter Calciumchloridlösung mit 10% Glycerin resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 5000 rpm, 15 min) wurde das Pellet in 2 ml eiskalter Calciumchloridlösung mit 10% Glycerin resuspendiert. Die erhaltenen kompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigen Stickstoff überführt und bei -80°C gelagert.

Nach Auftauen der Zellen auf Eis wurde die zu transformierende DNA (1 μ l Plasmid-DNA oder 10 μ l Ligationsprodukt) hinzugegeben und mit Hilfe einer Pipette wurden Zellen und DNA vermischt. Der Hitzeschock erfolgte für 30 s bei 42°C (Thermomixer Comfort, Eppendorf AG, Hamburg, BRD). Danach wurden die Zellen 5 min auf Eis abgekühlt und in 500 μ l LB-Medium resuspendiert. Nach Inkubation für 1 h (37°C, 750 rpm) wurden 100-200 μ l auf eine LB-Agar-Platte ausgestrichen.

2.2.10.2 Transformation mittels Elektroporation

Für die Transformation mittels Elektroporation wurden zu elektrokompenten XL1-blue Zellen (*E.coli*) benötigt. Die Herstellung dieser Zellen erfolgte analog zu den chemisch-kompetenten Zellen. Anstelle der Calciumchloridlösung wurde allerdings jeweils H₂O eingesetzt. Die Zellen wurden bei -80°C gelagert und dann ca. 20 min auf Eis aufgetaut. Danach erfolgte die Zugabe von 5-10 μ l DNA. Die DNA und die elektrokompenten Zellen wurden mit einer 100 μ l-Pipette durchmischt und in eine Glasküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte mit dem *Eporator* (Eppendorf AG, Hamburg, BRD). Danach wurden die Zellen mit 500 μ l LB-Medium vermischt, in ein Eppie gegeben und 1 h bei 37°C, 750 rpm inkubiert. Anschließend wurden ca. 100-200 μ l auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei

37°C inkubiert.

2.3 Zellbiologische Arbeiten

2.3.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Adhärenente Zellen (HeLa, COS 7, Phoenix-Eco, siehe 2.1.5.2) wurden in DMEM(+ / +) bei 37°C und einer Umgebung mit 5% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurden sie alle sieben Tage mit 2 ml Trypsin/ EDTA abgelöst und im Verhältnis 1:50 auf eine neue 10 cm-Schale überführt.

PBS (Phosphate Buffered Saline)	150 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4 1,7 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,4
Trypsin/EDTA	(10x) 0,5/ 0,2%ig in PBS

2.3.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Stabil transduzierte Ba/F3-gp130 Zellen wurden in DMEM(+ / +) kultiviert, welches mit 10 ng/ml HIL-6 versetzt war. Wie die adhärenenten Zellen wuchsen sie in einer Umgebung mit 5% CO₂ und 37°C in 10 cm-Schalen. Gesplittet wurden die Suspensionszellen im Normalfall jede Woche im Verhältnis 1:1000. Stabil mit Rezeptoren transduzierte Ba/F3-gp130 Zellen wurden durch Zugabe des passenden Antibiotikums selektiert (Puromycin/ Hygromycin B). Wenn sie sowohl den IL-12 Rezeptor β 1, als auch den IL-23 Rezeptor besaßen, wuchsen sie auch durch Zugabe von mHIL-23 anstelle von HIL-6 (siehe Kap. 3.3).

2.3.3 Transfektion

Um die Funktionalität der Rezeptoren *in vitro* zu analysieren, wurden HeLa und COS 7 Zellen mit der klonierten Rezeptor-cDNA transfiziert. Für Einzeltransfektionen wurden 5 μ g DNA in 1 ml DMEM(- / -) gelöst und 10 μ l TurboFect (Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, BRD) dazugegeben.

Für Doppeltransfektionen wurden je 4 μ g DNA in 1,6 ml DMEM(- / -) gelöst und 16 μ l TurboFect dazugegeben.

Der Ansatz wurde auf eine volle 10 cm-Schale (Konfluenz 70-90%) der adhärenenten Zelllinien HeLa oder COS 7 getropft und bei 37°C inkubiert. Nach 6 h erfolgte ein Mediumwechsel mit 10 ml DMEM(+ / +).

Nach 24 h wurde ein weiterer Mediumwechsel mit 10 ml DMEM(-/-) vorgenommen, um die Zellen vor der Stimulation mit mHIL-23 oder HIL-6 zu *starven* ("hungern").

2.3.4 Retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen

Zunächst mussten Phoenix-Eco-Zellen mit der DNA transfiziert werden. Dafür wurden auf 6-well-Platten 8×10^5 Phoenix-Eco-Zellen pro well ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Dann wurde 1 µg DNA mit 200 µl DMEM(-/-) verdünnt und mit 2 µl TurboFect (Fermentas GmbH, St.-Leon-Roth, BRD) versehen. Der Ansatz wurde dann 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Phoenix-Zelle gegeben. Nach 6 h Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel mit 2 ml DMEM (+Pen/ Strep + 30% FKS). Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Nun wurden die Ba/F3-Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und mit sterilem PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen gezählt und auf eine Anzahl von 2×10^6 Zellen/ml verdünnt. 50 µl dieser Suspension, also 1×10^6 Zellen, wurden in ein 1 ml Eppendorfer-Reaktionsgefäß überführt. Darauf wurden 250 µl vom Überstand der am vorherigen Tag transfizierten Phoenix-Eco-Zellen und 3 µl Polybrene (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD) gegeben. Nachdem mindestens 2 h bei 1800 rpm zentrifugiert wurde, konnte das Medium abgenommen und die Zellen in 5 ml DMEM(+ / +) resuspendiert werden. Das Medium wurde mit 10 ng/ml HIL-6 versetzt und die Zellen 48 h inkubiert (37°C, 5% CO₂).

Dann erfolgte die Selektion der Zellen durch die Zugabe der Antibiotika.

2.3.5 Proliferationsassay

Um das zytokin-abhängige Wachstum von den Ba/F3-gp130 Zelllinien (siehe Kap. 2.1.5.2) zu untersuchen, wurden Proliferationsassays durchgeführt. Dafür wurden die Ba/F3 Zellen drei Mal mit sterilem PBS gewaschen. Nach Zentrifugation (5 min, 1500 rpm, Raumtemperatur) wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 10 ml DMEM(+ / +) resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt (*TC10 Automated Cell Counter*, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, BRD, durch Zusatz von *Tryptan blue 0,5% (w/v) in physiological saline*, Biochrom AG, Berlin) und auf eine Konzentration von 50000 Zellen/ml eingestellt. Danach wurden jeweils 100 µl bzw. 5000 Zellen in die Vertiefung einer 96-well-Platte gegeben. Je nach Versuchsansatz wurde dann eine definierte Menge Zytokin hinzugegeben oder nicht. Für die Stimulation mit HIL-6 wurden Konzentrationen von 10 ng/µl eingesetzt, für mHIL-23 0,2% des von CHO-K1 Zellen gewonnenen Überstandes.

Die Zellen wurden mindestens 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des *CellTiter-Blue Cell Viability Assay* (Promega Corpo-

ration, Madison, USA). Die Messung beruht auf dem Umsatz des blauen Redoxfarbstoffs Resazurin durch metabolisch aktive Zellen zum pinkfarbenen, fluoreszenten Resorufin. Am Photometer (infinite M200 PRO, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, BRD) erfolgte die Messung der Fluoreszenz bei 560 nm zu den Zeitpunkten 0 min, 20 min, 40 min und 60 min nach Zugabe des *CellTiter-Blue Reagent*. Die gemessene Menge Resorufin ist proportional zum Anteil lebender Zellen im Versuchsansatz. Durch Subtraktion der Zellzahl zum Zeitpunkt 0 min konnte die Zellproliferation bestimmt werden.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Lysaten

Von den transfizierten/ transduzierten Zellen mussten zunächst Lysate angefertigt werden, um dann mittels Western Blot die Rezeptoren und intrazelluläre Signalkaskaden, zum Beispiel durch phosphoryliertes STAT3, nachzuweisen. Für die Zelllyse wurden folgende Puffer verwendet:

Lyse Puffer Phospho-STAT3	50 mM Tris-HCl 150 mM KCl 2 mM EDTA pH 7,5 1% NP-40 1% Triton X-100 <i>Complete</i> TM (1 Tablette für 50 ml) 1 mM NaF 1 mM Na_3VO_4
<i>Mild Lysis Buffer</i>	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 1% Triton X-100 <i>Complete</i> TM (1 Tablette für 50 ml)

2.4.1.1 Herstellung von Lysaten adhärenter Zellen

Die Zellen wurden für die weiteren Versuche 10 min mit mHIL-23 oder HIL-6 stimuliert oder unstimuliert belassen. Dann wurde das Medium entfernt und die adhärenenten Zellen mit 10 ml 1xPBS gewaschen. Das PBS wurde wiederum abgegossen und die Zellen in 1ml 1xPBS

mit einem Zellschaber von den Schalen gelöst und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzer Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in 100-200 µl Lyse Puffer resuspendiert. Die Lyse erfolgte mindestens 1 h bei 4°C. Nach Zentrifugation (20 min, 13000 rpm, 4°C) wurde das Lysat vom Zellpellet getrennt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.4.1.2 Herstellung von Lysaten von Suspensionszellen

Für die Lyse von stabil transduzierten Ba/F3-gp130 Zelllinien wurden drei volle 10 cm-Schalen in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt und drei Mal mit 30 ml PBS gewaschen. Nach Zentrifugation (5 min, 1500 rpm, Raumtemperatur) wurde das PBS entfernt und das Zellpellet in DMEM(-/-) resuspendiert. Die Zellen wurden wieder auf 10 cm-Schalen verteilt und 5 h inkubiert (*starving*). Dann erfolgte entweder die Stimulation der Zellen mit den Zytokinen (mHIL-23/ HIL-6) oder die Zellen wurden unstimuliert lysiert.

Die Lyse der Ba/F3 Zellen wurde analog zu den adhärennten Zellen durchgeführt.

2.4.2 Bestimmung des Proteingehalts (BCA-Assay)

Der Proteingehalt der Zelllysate wurde mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Bonn, BRD) bestimmt. Die BSA-Standards wurden nach Angaben des Herstellers erstellt und die Proteinbestimmung gemäß des Protokolls durchgeführt. Die Messung erfolgte am Photometer (infinite M200 PRO, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, BRD).

2.4.3 Western Blot

Um Proteine der Größe nach aufzutrennen wurden sie mit (*Laemmli-Puffer*) (s.u.) versetzt, 10 min bei 95°C inkubiert und auf SDS-PAA-Gele aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte dann im elektrischen Feld bei einer Spannung von ca. 90 V und konstanter Stromstärke (Mini-Protean Tetra System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, BRD). Die Gele wurden nach Sambrook und Russel [153] in folgender Zusammensetzung hergestellt:

Trenngelpuffer für SDS-PAA-Gele	1,5 M Tris-HCl 0,4% SDS pH 8,8
Sammelgelpuffer für SDS-PAA-Gele	500 mM Tris 0,4% SDS pH 6,8

10% Gel

Trenngel:	Sammelgel:
4 ml H ₂ O	1,72 ml H ₂ O
3,3 ml Acrylamid Mix	0,5 ml Acrylamid Mix
2,6 ml Trenngelpuffer	0,75 ml Sammelgelpuffer
0,1 ml Ammoniumpersulfat	0,03 ml Ammoniumpersulfat
0,004 ml TEMED	0,003 ml TEMED

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

10xTBS	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl
1xTris TBS-T	100 ml 10xTBS 900 ml H ₂ O 0,5 ml Tween20
Blocking Puffer	5% Milch (5 g Milchpulver in 100 ml TBS-T)
10xTransferpuffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin
1xTransferpuffer	100 ml 10xTransferpuffer 200 ml Methanol (20%) 1 ml 10% SDS 700 ml H ₂ O
5x SDS-Probenpuffer (<i>Laemmli-Puffer</i>)	1,0 ml 0,5 M Tris-HCl pH 8,5 0,8 ml Glycerol 1,6 ml 10% SDS 0,4 ml β -Mercaptoethanol 0,4 ml 0,05% Bromphenolblau 3,8 ml H ₂ O
SDS-Page Laufpuffer	25 mM Tris 0,1% SDS 192 mM Glycin
<i>stripping</i> Puffer	62,5 mM Tris 2% SDS 0,1% β -Mercaptoethanol

Nun erfolgte die Übertragung (*blotting*) der Proteine von den SDS-PAA-Gelen auf eine Nitrocellulosemembran. Dafür wurde die Nitrocellulosemembran 2 min in Methanol aktiviert und die SDS-PAA-Gele mit den aufgetrennten Proteinen darauf platziert. Auf beide Seiten wurden Schichten aus vier *Whatman*-Filterpapieren aufgelegt, die vorher in Transferpuffer getränkt wurden. Das *blotting* erfolgte bei einer Spannung von ca. 20 V und konstanter Stromstärke (*Power Pac HC Transfer system*, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, BRD).

Die Membran wurde dann 3 h mit 5% Milchpulver oder 5% BSA (in TBS-T) geblockt. Über Nacht wurde sie bei 4°C mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen bevor sie für 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper, der an den Fc-Teil des primären Antikörpers bindet, inkubiert wurde. Wenn der primäre Antikörper biotinyliert war, wurden die Membranen in lichtundurchlässigen 50 ml Reaktionsgefäßen inkubiert. Anstelle des sekundären Antikörpers erfolgte im nächsten Schritt die Zugabe von Streptavidin-HRP. Danach wurden die Membranen zweimal mit TBS-T gewaschen und einmal mit PBS. Um die Proteine an die die Antikörper gebunden haben sichtbar zu machen, erfolgte eine Entwicklung mit dem *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare, Buckinghamshire, GBR) und der *INTAS Chemocam* (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, BRD).

2.4.3.1 Stripping

Um die Antikörper, die an die Proteine auf der Membran gebunden sind, zu entfernen, wurde die Membran in 50 ml Stripping Puffer 30 min bei 60°C (Wasserbad) inkubiert. Danach wurde der Puffer entfernt und die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen.

Nach 3 h Blocken kann nun erneut eine Inkubation mit einem primären Antikörper erfolgen.

2.4.4 Durchflusszytometrie

Der Nachweis der Rezeptoren auf der Zelloberfläche erfolgte mittels Durchflusszytometrie/ FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Analysen.

Dafür wurden die verschiedenen Ba/F3-gp130 Zelllinien gezählt und 5×10^5 Zellen in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Die Zellen wurden 10 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in 1 ml PBS mit 1% BSA (FACS Puffer) resuspendiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und das Zellpellet dann in 100 μ l FACS Puffer resuspendiert. Dann wurde der primäre Antikörper dazugeben (10 μ l *phycoerythrin conjugated anti-mouse IL-12R β 1* oder 2,5 μ l *monoclonal anti-mouse IL-23R*, R&D Systems, Minneapolis, USA, verwendet nach Herstellerinformationen) und 2 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann

einmal mit FACS Puffer gewaschen und im Falle des mIL-23R-Antikörpers nun der sekundäre Antikörper (*Alexa Fluor 647 conjugated Fab goat anti-rat IgG*, Konzentration 1,6 mg/ml, Verdünnung 1:100 in 1xPBS mit 1% BSA, Dianova GmbH, Hamburg, BRD) hinzugegeben und 1 h bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden noch einmal gewaschen und in 500 µl FACS Puffer resuspendiert.

Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie (BD FACSCanto II flow cytometer, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, BRD) und die Auswertung mit FCS Express (De Novo Software, Los Angeles, USA).

Für den Nachweis von intrazellulärem (phosphoryliertem) STAT3 wurden 1×10^6 Ba/F3-gp130 Zellen dreimal mit PBS gewaschen und 4 h in DMEM(-/-) inkubiert. Danach wurden die Zellen je nach Versuchsansatz mit mHIL-23 stimuliert. Die Zellen wurden dann 5 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Durch Zugabe von 1 ml 2% PFA (Paraformaldehydat) in PBS wurden die Zellen fixiert (15 min bei 37°C) und dann durch 90% Methanol 30 min auf Eis permeabilisiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS mit 0,5% BSA gewaschen und mit den primären Antikörpern für phospho-STAT3 und STAT3 über Nacht inkubiert (*Alexa Fluor 647 mouse anti-Stat3 (pY705)* und *PE mouse anti-Stat3*, BD Bioscience, Franklin Lakes, USA, verwendet nach Herstellerinformationen). Die weitere FACS-Analyse erfolgte wie oben beschrieben.

Ergebnisse

3.1 Konstruktion von Rezeptorchimären des IL-23 Rezeptors

Zu Beginn der Arbeit wurden zwei Chimären aus dem murinen und dem humanen IL-23 Rezeptor (IL-23R) kloniert. Diese enthalten jeweils die murine extrazelluläre Domäne (ECD) und die humane intrazelluläre Domäne (ICD). Beiden Chimären unterscheiden sich in der Transmembrandomäne (TM), die entweder human (hTM) oder murin (mTM) ist. In der ICD befinden sich sieben Tyrosine. Einen schematischen Überblick gibt Abb. 3.1.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Signaltransduktion des humanen IL-23R analysiert. Die erzeugten Chimären des IL-23R bilden mit dem murinen IL-12R β 1 eine funktionelle Einheit und ermöglichen so die Untersuchung der Signaltransduktion von IL-23. In den Experimenten konnte zur Stimulation das in der AG Scheller produzierte mHIL-23 genutzt werden, welches an den Rezeptorkomplex aus mIL-12R β 1 und chimären IL-23R (mECD) bindet (siehe Kap. 2.1.7.2). Die Versuche mit den IL-23R Chimären konnten außerdem analog zu denen mit dem murinen IL-23R aufgebaut werden. Dies führt zu einer guten Vergleichbarkeit zwischen der Signaltransduktion über die ICD des humanen und murinen IL-23R.

3.1.1 Klonierung der chimären IL-23 Rezeptoren

Um die Chimären aus dem murinen und humanen IL-23R zu konstruieren, wurde zunächst eine SOE (*splicing by overlapping extensions*)-PCR durchgeführt. Abb. 3.2 verdeutlicht das Vorgehen für die Konstruktion der Chimäre I mit mTM schematisch. Als Ausgangsplasmide (*templates*) dienten die im Vektor pcDNA3.1 vorliegende cDNA (*complementary deoxyribonucleic acid*) des murinen IL-23R und ein cDNA-Klon des humanen IL-23R (IMAGE ID 4132295, Source Bio Science Life Sciences, Berlin, BRD). Durch PCR wurden zunächst Teile der *template*-DNA amplifiziert. Durch den Einsatz der Primer entsteht außerdem ein überlappender Bereich zwischen den beiden DNA-Abschnitten der *template*-DNAs. Durch eine weitere PCR mit den endständigen Primern aus den ersten PCRs gelingt so die Fusion

3.1 Konstruktion von Rezeptorchimären des IL-23 Rezeptors

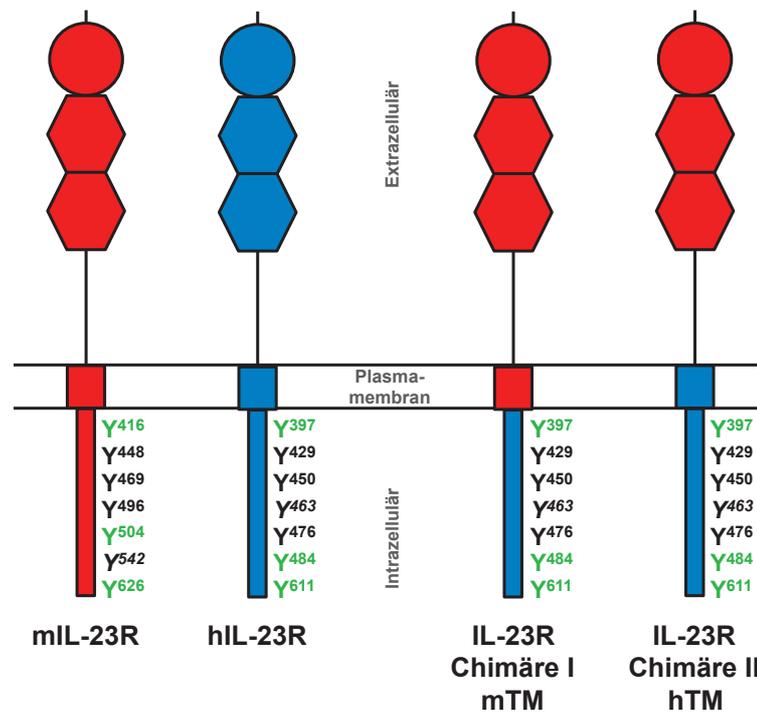


Abb. 3.1: Schematischer Überblick der IL-23R Chimären

Der murine IL-23R ist in Rot dargestellt und der humane IL-23R in Blau. Die klonierten Rezeptorchimären bestehen jeweils aus der murinen extrazellulären Domäne (ECD) und der humanen intrazellulären Domäne (ICD). Die beiden Chimären unterscheiden sich in der Transmembrandomäne (TM), die bei Chimäre I murin (m) und bei Chimäre II human (h) ist. Die ICD des humanen, sowie des murinen IL-23R, weist sieben Tyrosine (Y) auf, wobei sechs davon in beiden Spezies konserviert sind. Y542 ist nur im murinen, Y463 nur im humanen IL-23R zu finden (kursiv). Drei der sieben Tyrosine werden als potentielle Phosphorylierungsstellen bei der Signalweiterleitung beschrieben. Sie sind grün hervorgehoben.

der beiden DNA-Abschnitten der Ausgangsplasmide.

Das Produkt dieser Fusions-PCR besitzt, durch die Wahl der Primer, Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *BmgBI* (am 5'-Ende) und *NotI* (am 3'-Ende). Diese Schnittstellen sind für weitere Klonierungsschritte wichtig.

Zunächst erfolgte die Ligation des phosphorylierten PCR-Produkts in den Klonierungsvektor pcR-Script, der zuvor durch Restriktionsverdau mit *HincII* linearisiert worden war. Die cDNA der IL-23 Rezeptorchimären im pcR-Script Vektor wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft.

Für die Klonierung der cDNA der chimären IL-23 Rezeptoren in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 wurden die pcR-Script Vektoren zunächst mit den Restriktionsenzymen *BmgBI* und *NotI* behandelt. Die entstandenen Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese der Größe nach voneinander getrennt, die für die Ligation relevanten Anteile aus dem Gel extrahiert und die cDNA eluiert. Der Vektor pcDNA3.1 mLIL-23R wurde ebenfalls

3.1 Konstruktion von Rezeptorchimären des IL-23 Rezeptors

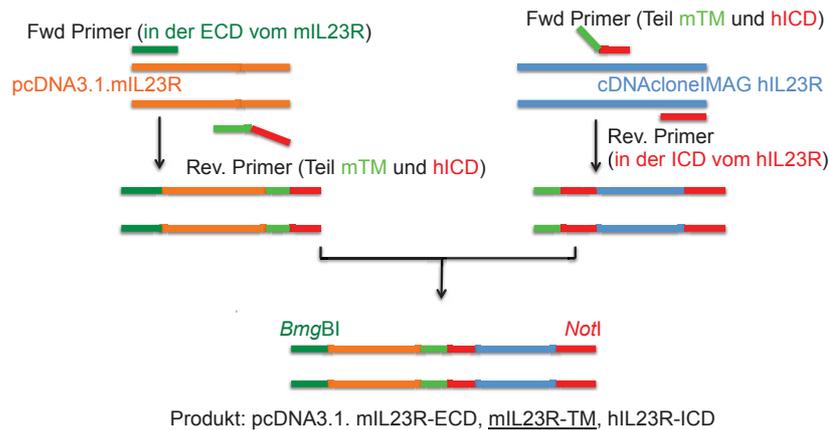


Abb. 3.2: SOE-PCR zur Klonierung der chimären IL-23 Rezeptoren (IL-23R)

Um die Chimären aus dem murinen (m) und humanen (h) IL-23R zu konstruieren wurden zunächst die DNA-Abschnitte für die Anteile der beiden Rezeptoren amplifiziert. Als *template* für die erste PCR diente der Vektor pcDNA3.1 mIL-23R. *Template* der zweiten PCR war ein cDNA-Klon des humanen IL-23R. Die Primer (*forward* (fwd) und *reverse* (rev)) wurden so gewählt, dass in der Mitte ein überlappender Bereich der Rezeptor-cDNAs entsteht. Die dritte PCR ist die *overlap-/ Fusions-PCR*. Durch den Einsatz der endständigen Primer von PCR eins und zwei, führt diese dann zu einer Fusion der beiden Rezeptor-cDNAs. Die entstandenen PCR-Produkte bestehen aus der cDNA des murinen und humanen IL-23R, hier dargestellt für Chimäre I mit mICD (intrazellulärer Domäne), mTM (Transmembrandomäne), hECD (extrazellulärer Domäne).

mit *BmgBI* und *NotI* behandelt und nach Agarosegelelektrophorese extrahiert. Sowohl der pcDNA3.1 Vektor (6125 bp), als auch die cDNA der Rezeptorchimären (*insert*, 1300 bp) standen dann für die Ligation zur Verfügung (Abb. 3.3 A). Die daraus resultierenden Plasmide wurden pcDNA3.1 cIL-23R mTM und pcDNA3.1 cIL-23R hTM genannt. Das Vorgehen der Ligation ist in Abb. 3.3 A dargestellt. Abb. 3.3 B zeigt das Vorgehen zur Gewinnung der DNA-Abschnitte.

Für die transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen mit der cDNA der Rezeptoren wurden diese in den Expressionsvektor p409 kloniert. Dafür wurde der Vektor p409 mit dem Restriktionsenzym *PmeI* behandelt und dephosphoryliert, um eine Re-Ligation des Vektors zu verhindern. Die im Vektor pcDNA3.1 vorliegende cDNA der Rezeptorchimären wurde ebenfalls mit *PmeI* behandelt. Die Ligation erfolge dann analog zu der Ligation in den Vektor pcDNA3.1. Abb. 3.4 stellt das Vorgehen schematisch dar.

Für die retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen wurde die cDNA des IL-23R in den Vektor pMOWS-puro-GFP kloniert [146]. Dies ist ebenfalls in Abb. 3.4 dargestellt ist. Dieser Vektor besitzt ein Gen für die Resistenz gegen Puromycin. Durch Zugabe von Puromycin konnte dadurch eine Selektion der transduzierten Ba/F3 Zellen bei der Kultivierung der Zellen erreicht werden (siehe Kap. 3.3). Der pMOWS-puro-Vektor wurde zunächst mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *EcoNI* behandelt. Danach wurde er mit einem Klenow-Fragment aufgefüllt, wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben, und lag somit linearisiert

3.1 Konstruktion von Rezeptorchimären des IL-23 Rezeptors

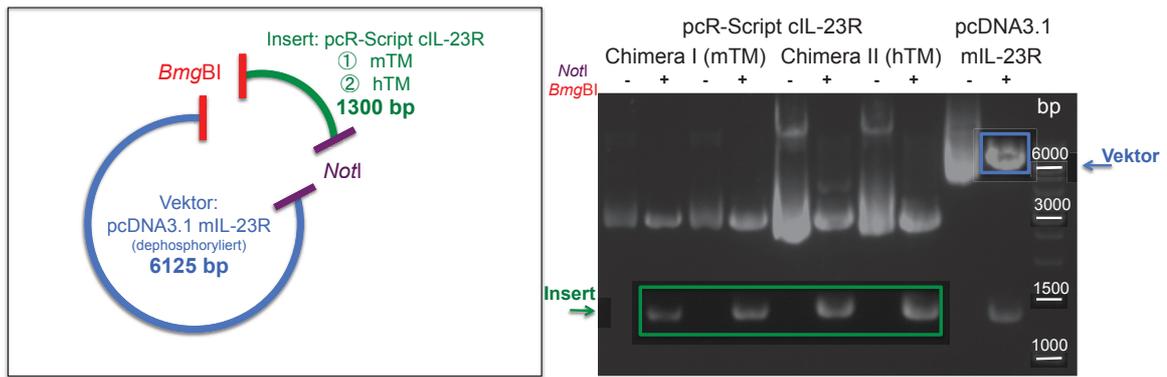


Abb. 3.3: Ligation der chimären IL-23R cDNA in den Vektor pcDNA3.1

A: Schematische Darstellung der Ligation aus pcR-Script cIL-23R (Insert) und pcDNA3.1 (Vektor). Beide Plasmide wurden vorher mit *BmgBI* und *NotI* behandelt, sodass eine Ligation an den Schnittstellen möglich ist.

B: Analyse der aus der Midipräparation erhaltenden Plasmid-DNAs nach Restriktionsspaltung mit *BmgBI* und *NotI* (+). Trennung der DNA-Fragmente der Größe nach durch Agarosegelelektrophorese in einem 1%-igen Agarosegel. Zur Kontrolle sind unverdaute (-) Anteile der Plasmid-DNA mit aufgetragen. Die erwartete Größe des mit *BmgBI* und *NotI* behandelten Inserts des pcR-Script cIL-23R Plasmids ist 1300 bp, des pcDNA3.1 Vektors 6125 bp.

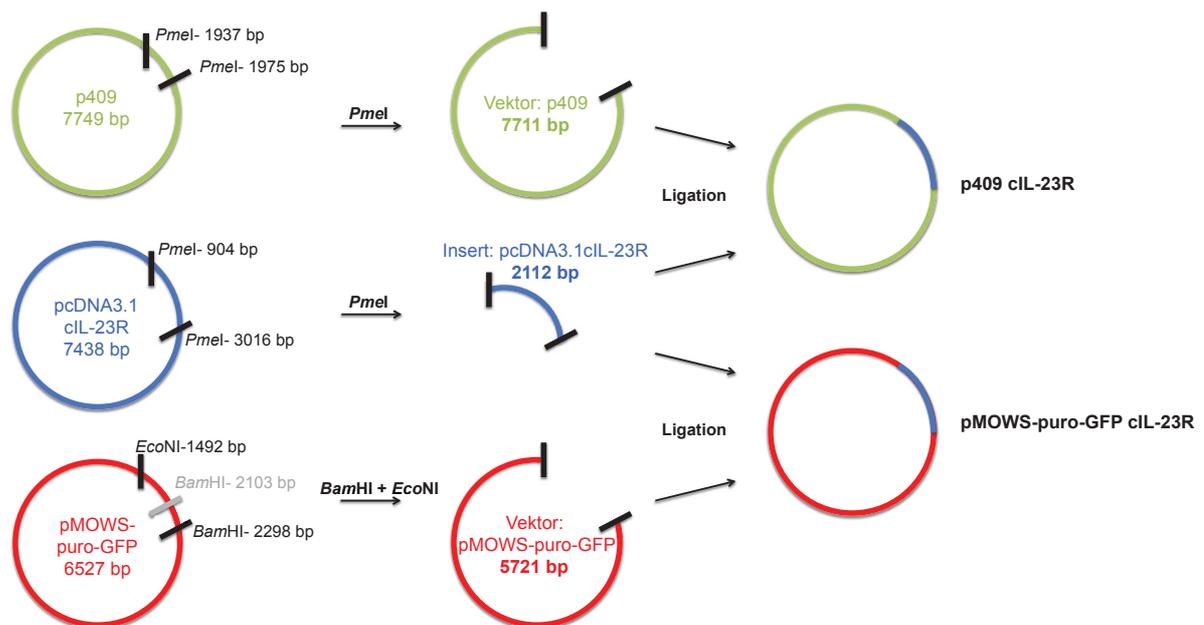


Abb. 3.4: Ligation des chimären IL-23R in den Vektor p409 und pMOWS-puro-GFP

Der Vektor p409 wurde mit *PmeI* behandelt und anschließend dephosphoryliert. Das insert wurde ebenfalls durch Behandlung mit *PmeI* aus dem Vektor pcDNA3.1 cIL-23R gewonnen. Nach Auftrennung der Fragmente durch Agarosegelelektrophorese konnten sie zur Ligation genutzt werden. Der Vektor pMOWS-puro-GFP wurde mit *BamHI* und *EcoNI* behandelt. Anschließend wurde das klebrige Ende, welches *BamHI* an seiner Schnittstelle hinterlässt, durch ein Klenow-Fragment aufgefüllt. Die Ligation erfolgte ebenfalls mit dem nach *PmeI*-Behandlung gewonnen insert aus dem Vektor pcDNA3.1 cIL-23R.

und mit glatten Enden (*blunt ends*) vor. Die Ligation erfolgte mit der mit *PmeI* behandelten Rezeptor-cDNA. Die klonierten p409- und pMOWS-Vektoren wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft.

3.1.2 Funktionelle Analyse der erzeugten Rezeptorchimären

Abb. 3.5 zeigt den murinen, humanen und chimären IL-23R (mTM und hTM) und die Aufteilung der Aminosäuren (AS) auf ECD, TM und ICD. Zusätzlich befindet sich am N-terminalen Ende ein 23 AS langes Signalpeptid (SP), sowie am C-terminalen Ende ein myc-tag.

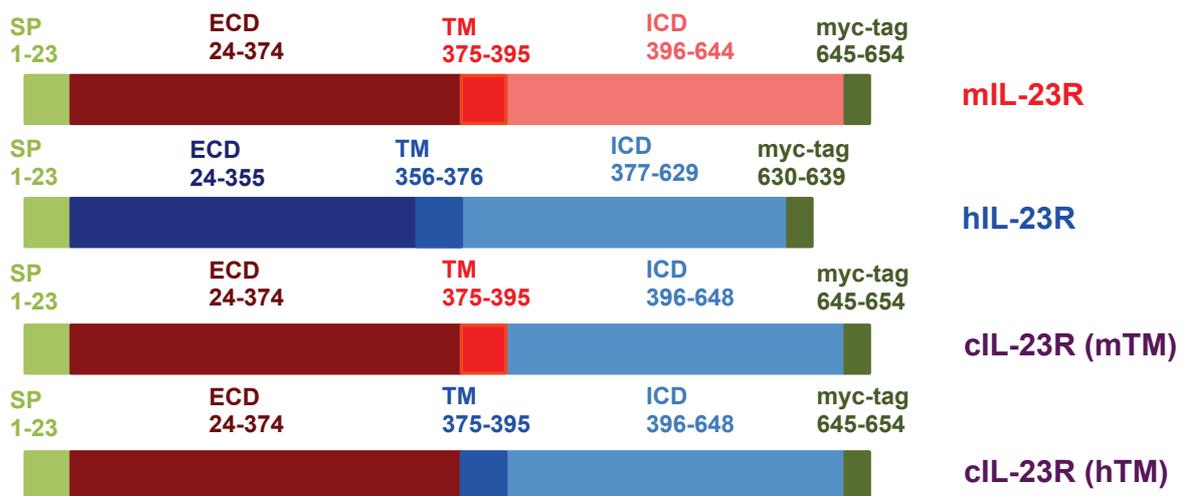


Abb. 3.5: Expressionskassette des murinen, humanen und chimären IL-23R

Aus dem 644 Aminosäuren (AS) langen murinen und 629 AS langen humanen IL-23R wurde eine Chimäre generiert, die aus der murine ICD, der humanen ECD, sowie der murinen oder humanen TM, besteht (cIL-23R). Diese besitzt 648 AS (vgl. AS-sequenz cIL-23R Kap. 5.2). Am N-terminalen Ende befindet sich ein Signalpeptid (SP), welches 23 AS umfasst. Am C-terminalen Ende befindet sich ein myc-tag der 10 AS lang ist (EQKLISEEDL) und für Western Blot Analysen genutzt werden kann.

Nach Klonierung der Plasmide folgten Versuche zur funktionellen Analyse der beiden chimären IL-23R-Varianten. Abb. 3.6 zeigt das Ergebnis der Western Blots.

Hierfür wurden zunächst HeLa Zellen mit der cDNA der Rezeptorchimären (p409 cIL-23R mTM/ Chimäre I oder p409 cIL-23R hTM/ Chimäre II) oder mit dem murinen IL-12R β 1 transfiziert. Als Co-Transfektionen wurden HeLa Zellen sowohl mit der cDNA kodierend für den mIL-12R β 1, als auch mit der cDNA kodierend für den IL-23R (Chimäre I, Chimäre II oder murin) transfiziert. Da die Zellen dann beide Rezeptoren für die IL-23 Signaltransduktion exprimieren, wurden sie als Wildtyp (WT) bezeichnet. Je zwei Ansätze der Zelllinien wurden angefertigt. Die eine Hälfte wurde, nachdem sie eine Nacht in Serum-freien Medium kultiviert wurden (*starving*), mit IL-23 stimuliert, die andere Hälfte blieb unstimuliert. Zell-

3.1 Konstruktion von Rezeptorchimären des IL-23 Rezeptors

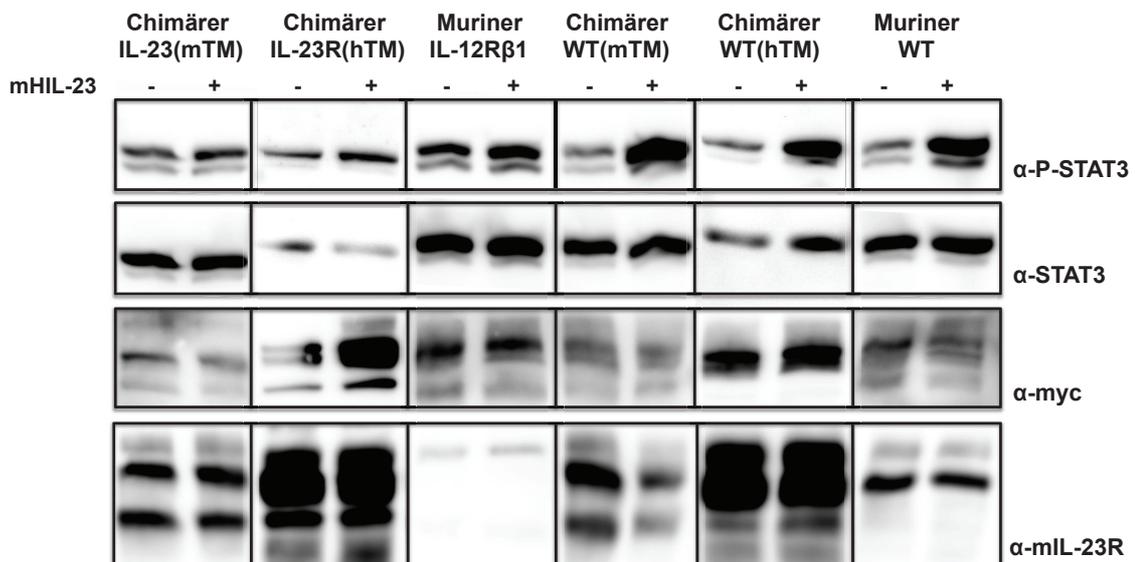


Abb. 3.6: Funktionelle Analyse der IL-23R-Chimären im Western Blot

HeLa Zellen wurden mit den p409 Expressionsvektoren kodierend für den cIL-23R Chimäre I (mTM), cIL-23R Chimäre II (hTM) und murinen IL-12R β 1 transfiziert, bzw. co-transfiziert mit der Kombination aus mIL-12R β 1 und cIL23R mTM, cIL-23R hTM oder mIL-23R. Co-Transfektion wurden als Wildtyp (WT) bezeichnet. Die Zellen wurden über Nacht in Serum-freien Medium kultiviert und dann für 15 min mit 0,2% mHIL-23 stimuliert. Danach wurden Zellysate hergestellt und 50 μ g Gesamtprotein pro Spur des SDS-PAA-Gels geladen. Die Proteine wurden durch Western Blot mit Phospho-STAT3 Antikörper detektiert. Die Antikörper wurden von der Membran entfernt (*stripping*) und diese mit STAT3 Antikörpern erneut beprobt. Parallel wurden SDS-Gele mit den gleichen Lysaten beladen und die Rezeptoren unter Verwendung von α -myc Antikörper und nach *stripping* mit α -mIL-23R Antikörpern nachgewiesen.

lysate wurden hergestellt und Western Blots mit einem phospho-Tyrosin-STAT3 Antikörper (α -p-STAT3) durchgeführt. Um zu überprüfen, ob gleiche Mengen an STAT3 Protein pro Spur geladen wurden, wurden die Antikörper von der Membran entfernt (*stripping*) und anschließend nochmal durch den Einsatz von STAT3 Antikörpern im Western Blot detektiert. Abb. 3.6 weist das Vorhandensein von P-STAT3 in den Co-Transfektionen nach Stimulation mit IL-23 nach. Eine Phosphorylierung von intrazellulärem STAT3 in den HeLa Zellen mit dem Wildtyp von Chimäre I und II, ebenso wie des murinen WT (Positivkontrolle), wurde durch eine deutliche Intensitätszunahme des P-STAT3 Signals nach Stimulation mit IL-23 detektiert. Keine STAT3 Phosphorylierung zeigten hingegen die einzeltransfizierten HeLa Zellen (cIL-23R mTM, hTM, mIL-12R β 1), die als Negativkontrollen dienten.

Um die Rezeptoren in den transfizierten HeLa Zellen zu detektieren, wurden außerdem Western Blots mit einem α -myc Antikörper und einem mIL-23R Antikörper durchgeführt. Der mIL-23R-Antikörper bindet an die murine ECD des IL-23R, sodass damit auch der cIL-23R nachgewiesen werden kann. Der α -myc Antikörper bindet sowohl an den IL-23R, als auch an den mIL-12R β 1, da die cDNA beider Proteine mit einem myc-tag versehen

wurden.

Durch die Western Blots der transfizierten HeLa Zellen (Abb. 3.6) konnte, bei Co-Transfektionen mit dem IL-12R β 1, für beide Varianten der IL-23 Rezeptorchimären ein P-STAT3 Signal nach Stimulation mit IL-23 nachgewiesen werden. Sie sind also beide funktionsfähig und für weitere Versuche geeignet. In der weiteren Arbeit wurde nur die Chimäre I mit der murinen TM benutzt. Die Bezeichnung **chimärer IL-23R (cIL-23R)** bezeichnet im weiteren Verlauf diese Rezeptorvariante, bestehend aus mECD, mTM und hICD. Die Aminosäuresequenz des cIL-23R ist im Anhang (Kap. 5.2) zu finden.

3.2 Klonierung und Expression von Mutations- und Deletionsvarianten

3.2.1 Varianten des chimären IL-23 Rezeptors

Um die Signaltransduktion des IL-23R *in vitro* detailliert zu untersuchen, wurden mithilfe von PCR (siehe Kap. 2.2.6) insgesamt zehn Varianten des cIL-23R kloniert. Abb. 3.7 gibt eine Übersicht der zehn erzeugte Mutations- und Deletionsvarianten des cIL-23R.

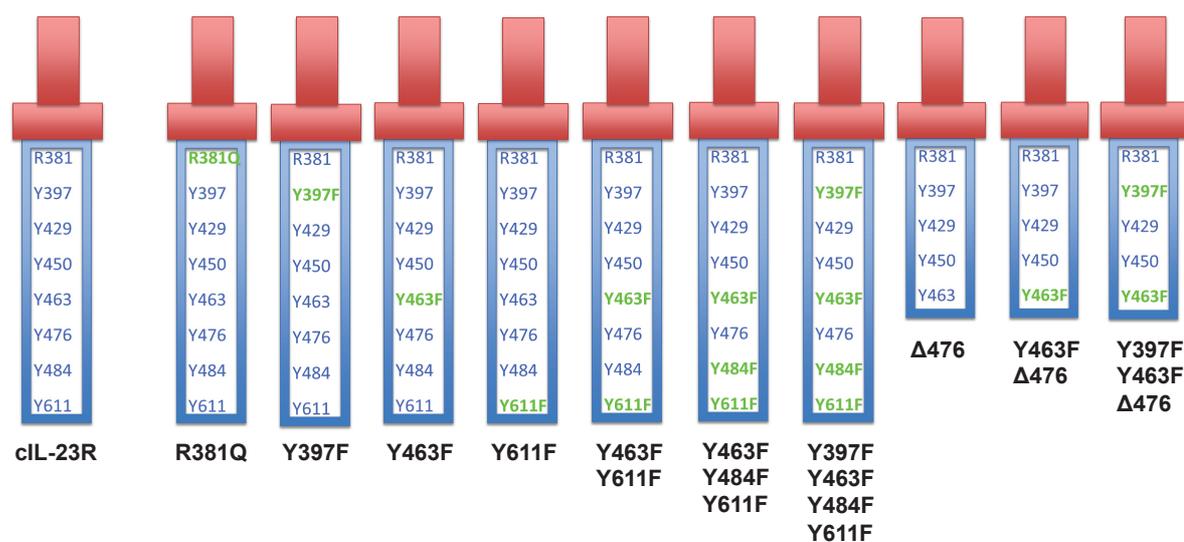


Abb. 3.7: Übersicht der erzeugten Rezeptorvarianten des cIL-23R

Schematische Darstellung der durch Mutation und Deletion klonierten Rezeptorvarianten des cIL-23R. In Rot murine ECD und TM, in Blau humane ICD mit den sieben Tyrosinresten (Y), die zum Teil zu Phenylalanin (F) mutiert sind (grün). In der ersten Mutationsvariante fand ein Austausch von Arginin (R) zu Glutamin (Q) statt.

Bei den Mutationsvarianten wurden Tyrosine (Y) in der ICD des cIL-23R durch Phenylalanin (F) ersetzt. Bei dem Vorgehen der *site-directed mutagenesis* wird durch den Einsatz von PCR-Primern genau eine Base der Rezeptor-cDNA ausgetauscht. Die Änderung des

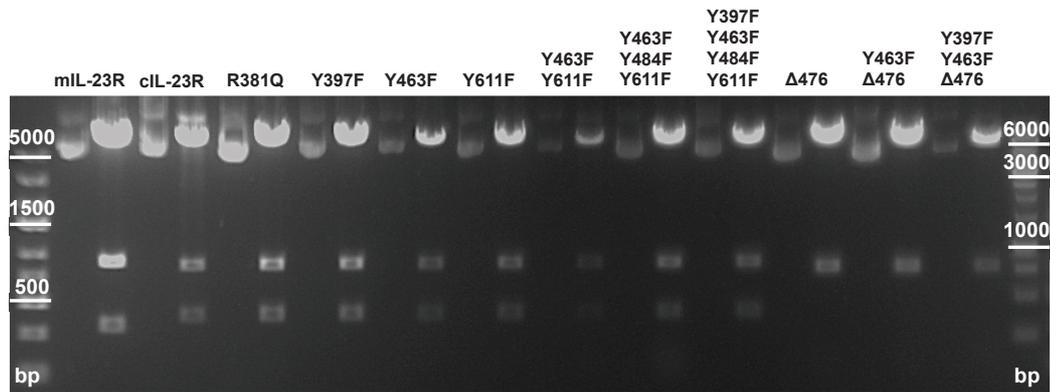


Abb. 3.8: Restriktionsanalyse der klonierten Expressionsvektoren für cIL-23R-Varianten

Die cDNA der in cDNA3.1 vorliegenden Mutations- und Deletionsvarianten des cIL-23R wurde mit H₂O verdünnt (1:10) und mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* und dem dazugehörigen Puffer 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von Ladepuffer wurden die Proben in einem 1%-igen Agarosegel analysiert. Zur Kontrolle wurde in die angrenzende linke Spur der ungeschnittene Vektor aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 100 mV trennen sich die DNA-Fragmente der Größe nach auf. Die erwarteten Fragmente der pcDNA3.1-Vektoren nach Restriktionsspaltung mit *EcoRI* sind für den mL-23R 344, 873 und 6209 bp; für den cIL-23R und die Mutationsvarianten 402, 827 und 6209 bp; für die Deletionsvarianten (Δ) 767 und 6209 bp.

Basentriplets TAT zu TTT oder TAC zu TTC führt zum gewünschten Aminosäureaustausch Y \rightarrow F. Bis zu vier Tyrosine wurden so innerhalb der cDNA des cIL-23 mutiert (Variante Y397F/Y463F/Y484F/Y611F).

Eine Besonderheit ist die Variante R381Q. Hier wurde durch die Punktmutation CGA zu CAA ein Arginin (R) zu einem Glutamin (Q) mutiert.

Bei den Deletionsvarianten wurden Primer benutzt, die die cDNA des cIL-23R nur bis zur Aminosäure 475 amplifizieren. Die C-terminalen 154 Aminosäuren der hICD inklusive der Tyrosine Y476, Y484 und Y611 (Δ 476) fehlen bei den Deletionsvarianten des cIL-23R.

Die Primer enthielten außerdem Restriktionsschnittstellen für *NotI* und *BmgBI*, sodass die Rezeptor-cDNA wieder in die Expressionsvektoren (pcDNA3.1, p409 und pMOWs-puro) kloniert werden konnte (vgl. Abb. 3.4). Des Weiteren wurden Deletionsvarianten hergestellt, die zusätzlich Punktmutationen Y \rightarrow F besitzen. Hier wurde die cDNA der Mutationsvarianten als *template* für die Deletions PCR genutzt (Y463F/ Δ 476 und Y397F/Y463F/ Δ 476).

Die cDNAs der Mutations- und Deletionsvarianten des cIL-23R wurde durch Sequenzierung überprüft.

Abb. 3.8 zeigt eine Restriktionsanalyse mit *EcoRI* von den in pcDNA3.1 vorliegenden Mutations- und Deletionsvarianten des cIL-23R. Dies ist für eine Kontrolle der cDNA sinnvoll, da die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* die Plasmide mehrfach schneidet (siehe Plasmidkarten Anhang 5.1). Die durch Agarosegelelektrophorese voneinander getrennten DNA-Fragmente stimmen mit den errechneten Fragmentgrößen für die jeweilige IL-23-

Rezeptorvariante überein.

3.2.2 Expressionskontrolle in COS 7 Zellen

Die erzeugten p409 Expressionsvektoren mit der cDNA der Rezeptorvarianten wurden für die transiente Transfektion von COS 7 Zellen verwendet. Die Voraussetzung für die weiteren geplanten Versuche ist, dass die Rezeptoren in eukaryotischen Zellen exprimiert werden. 48 h nach der Transfektion wurden Zellysate hergestellt und mittels Western Blot unter Verwendung eines α -myc Antikörpers analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.9 dargestellt. Eine deutliche Bande ist für alle Rezeptorvarianten erkennbar. Die erzeugten rekombinanten Proteine werden folglich in COS 7 Zellen exprimiert. Als Negativkontrolle dienten Lysate von untransfizierten COS 7 Zellen. Diese zeigten im Western Blot mit dem α -myc Antikörper keine Bande. Der murine IL-12R β 1, als Positivkontrolle, hat ein errechnetes Molekulargewicht von 81 kDa, der cIL-23R und seine Mutationsvarianten von 74 kDa und die Deletionsvarianten von 57 kDa. Im Western Blot bilden sich die Proteine aufgrund von posttranslationaler Glykosylierung bei einem größeren Molekulargewicht ab.

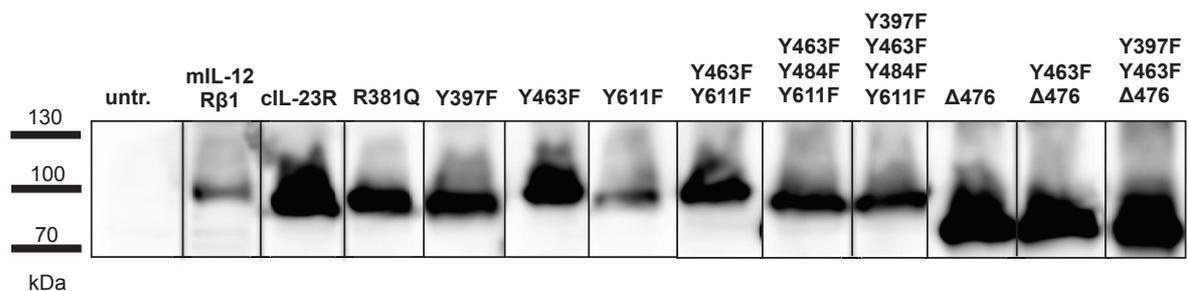


Abb. 3.9: Nachweis der rekombinanten cIL-23R-Varianten in COS 7 Zellen

COS 7 Zellen wurden mit der cDNA der Rezeptoren (vorliegend in p409) transfiziert und nach 48 h lysiert. Die Zellysate wurden auf SDS-PAA-Gele aufgetragen. Die rekombinanten Proteine wurden nach dem Molekulargewicht aufgetrennt und nach dem Transfer auf die Membran unter Verwendung eines α -myc Antikörpers detektiert.

3.3 Generierung stabiler Ba/F3-gp130 Zelllinien

Ba/F3 Zellen sind murine prä-B-Zellen, die normalerweise nur unter dem Einfluss von IL-3 proliferieren können [148]. Zytokinentzug führt zur Induktion von intrinsischer Apoptose [15]. Wenn Ba/F3 Zellen gp130 auf ihrer Oberfläche exprimieren, ist auch eine Proliferation durch Zugabe von HIL-6 möglich (siehe Kap. 2.1.7.1). Ba/F3 Zellen bieten somit ideale Voraussetzungen für die Untersuchung einer Zytokin-induzierten Signaltransduktion [147]. Ba/F3-gp130 Zellen, die in der AG Scheller zur Verfügung standen, wurden nun zunächst mit

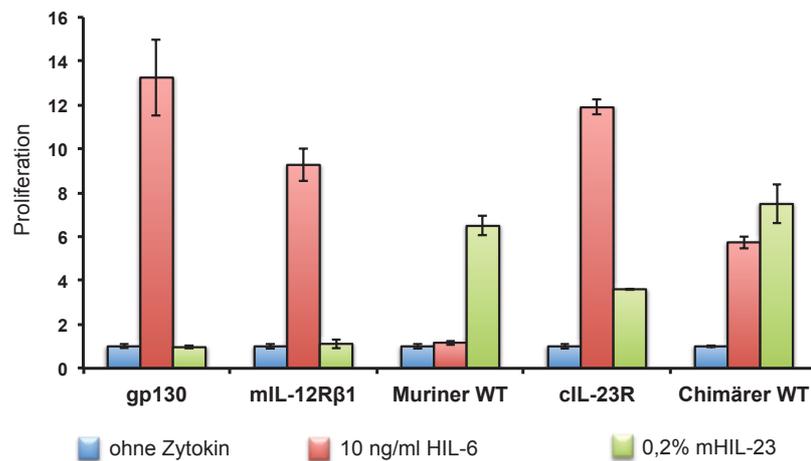


Abb. 3.10: Zytokin-abhängige Proliferation von Ba/F3 Zellen

Von stabilen BaF3-gp130 Zelllinien wurden je drei Ansätze mit der gleichen Zellzahl (5000 Zellen) hergestellt. Zum ersten Ansatz wurde kein Zytokin, zum zweiten HIL-6 (10 ng/ml) und zum dritten mHIL-23 (0,2%) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde die Zellproliferation in den drei Ansätzen durch den *CellTiter-Blue Cell Viability Assay* bestimmt. Für bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse von den unabhängig voneinander stabil transduzierten Ba/F3 Zelllinien, wurde die Negativkontrolle (unstimulierte Ba/F3 Zellen) auf 1 gesetzt und die Zytokin-abhängige Proliferation dementsprechend umgerechnet (n-fach). Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens zwei Versuchsansätze.

dem mIL-12Rβ1 transduziert [134]. Die so entstandenen Ba/F3-gp130 mIL-12Rβ1 Zellen exprimieren den Rezeptor stabil auf ihrer Oberfläche. Diese Zellen wurden weiter unter dem Einfluss von HIL-6 kultiviert. Die cDNA des mIL-12Rβ1 lag bei der Transduktion im Vektor pMOWS-hygro-GFP vor, der das Resistenzgen für Hygromycin B enthält. Durch den Zusatz dieses Antibiotikums bei der Kultivierung der Ba/F3-gp130 mIL-12Rβ1 Zellen, konnte eine Selektion dieser Zelllinie erzielt werden. Diese Zelllinie lag in der AG Scheller vor. Im nächsten Schritt wurde eine Variante des cIL-23R stabil in die Ba/F3-gp130 mIL-12Rβ1 Zellen transduziert. Da die cDNA in den retroviralen Vektor pMOWS-puro-GFP kloniert wurde, konnte die Selektion durch die Zugabe von Puromycin erfolgen.

Die Ba/F3 Zelllinien exprimieren nun beide Rezeptoren, die für die IL-23 vermittelte Signaltransduktion notwendig sind. Um die Funktionalität der Rezeptoren zu überprüfen, wurde die Proliferation dieser Zellen in Gegenwart von IL-23 untersucht. Für die Proliferationsassays wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben, vorbereitet und mit HIL-6, mHIL-23 oder ohne Zytokin inkubiert. Nach 48 h wurde die Zellproliferation mittels *CellTiter-Blue Cell Viability Assay* bestimmt. Abb. 3.10 zeigt das Ergebnis eines Proliferationsassays.

Zellen, die nur gp130, den murinen IL-12Rβ1 oder den cIL-23R exprimieren, proliferieren ausschließlich durch Zugabe von HIL-6. IL-23 kann nicht an die Zelloberfläche binden. Im Gegensatz dazu proliferiert der chimäre WT (mIL-12Rβ1+cIL-23R) durch HIL-6, aber

auch in Gegenwart von mHIL-23. Die Aktivierung der Signaltransduktion über den cIL-23R induziert die Proliferation von Ba/F3 Zellen. Diese verläuft über die humane ICD des IL-23R. Die Ba/F3 Zelllinie mit Expression vom mIL-12R β 1 und mIL-23R (muriner WT) diene als Kontrolle, da sie nur mit mHIL-23 proliferiert. Die Zelllinie wurde über einen sehr langen Zeitraum unter dem Einfluss von mHIL-23 kultiviert und hat so die Fähigkeit verloren in Gegenwart von HIL-6 zu proliferieren. Diese Zelllinie stand in der AG Scheller zur Verfügung. Um zu untersuchen, ob die Mutationen oder Deletionen im intrazellulären Teil des cIL-23R die Proliferation verhindern, wurden Ba/F3 Zelllinien mit jeder Rezeptorvariante des cIL-23R generiert. Dafür wurden Ba/F3-gp130 mIL-12R β 1 Zellen stabil mit der cDNA der Rezeptoren transduziert. Die Ergebnisse der Zytokin-abhängigen Proliferation der Mutations- und Deletionsvarianten des cIL-23R wird in Kapitel 3.5.4 dargestellt.

3.3.1 Nachweis der mIL-12R β 1 cDNA in den Ba/F3 Zelllinien

Die RNA der Ba/F3-gp130 Zelllinien wurde mit Hilfe des NucleoSpin RNA II-Kits (Machery-Nagel GmbH&Co.KG, Düren, BRD) isoliert, die darin enthaltene mRNA aufgereinigt und in cDNA umgeschrieben (siehe Kap. 2.2.6.5).

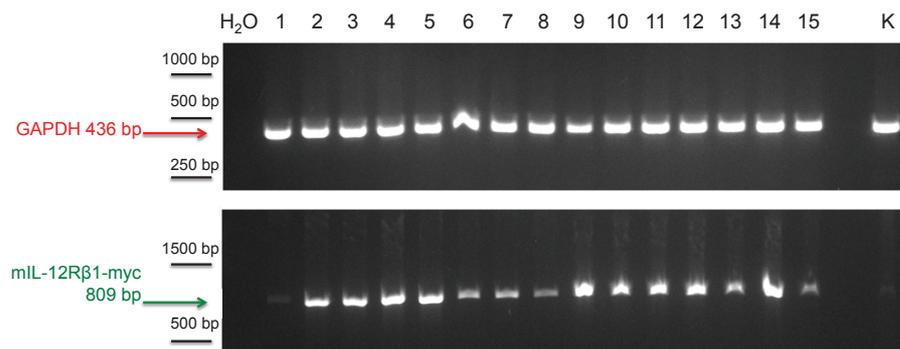


Abb. 3.11: Analyse der Transkripte aus generierten Ba/F3 Zelllinien mit cIL-23R-Varianten

Aus allen generierten Ba/F3 Zelllinien wurde die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Durch den Einsatz bestimmter Primer in der RT-PCR entstanden DNA-Fragmente definierter Größe, die durch Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden konnten. GAPDH sollte in allen Zellen vorhanden sein, der mIL-12R β nur in den Zellen, in die er stabil transduziert worden war. Als Negativkontrolle diente H₂O, 1: Ba/F3-gp130 cIL-23R 2-15: Ba/F3-gp130 mIL-12R β 1 Zelllinien mit einer Variante des cIL-23R. 2: cWT, 3: R381Q, 4: Y611E, 5: Y463E, 6: Y463F/Y611E, 7: Y463F/Y484F/Y611E, 8: Y397F/Y463F/Y484F/Y611E, 9: Δ 476, 10: Y463F/ Δ 476, 11: Y397E, 12: Y397F/Y463F/ Δ 476. 13-15: Ba/F3-gp130 mIL-12R β 1 Zelllinien mit einer Variante des mIL-23R 13: Y416F/Y504F/ Δ 541, 14: Y416F/Y504F/Y542F/ Δ 554, 15: Y416F/Y504F/Y542F/ Δ 625. K: Kontrolle Ba/F3-gp130 Zellen

Um die cDNA zu überprüfen, wurden RT-PCRs mit den Primern 5' mGAPDH/ 3' mGAPDH (1) und mIL12R C pF1/ c-myc pR1 (2) (siehe Tab. 2.3 in Kap.2.1.3) durchgeführt. Durch die Wahl der Primer entstehen Fragmente einer bestimmten Länge, die dann durch Agarosegel-

elektrophorese nachgewiesen werden können. Das Ergebnis ist in Abb. 3.11 dargestellt. In den generierten Zelllinien konnte der DNA-Abschnitt für die GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) (1), welche in allen Lebewesen exprimiert wird, nachgewiesen werden. Auch das DNA-Fragment des mIL-12R β 1 konnte dargestellt werden (2), wenn der Rezeptor in die Zellen stabil transduziert worden war.

3.3.2 Nachweis der Rezeptoren auf der Zelloberfläche

Zur Untersuchung der Expression von den Rezeptoren auf der Oberfläche der Ba/F3 Zelllinien wurden FACS-Analysen durchgeführt.

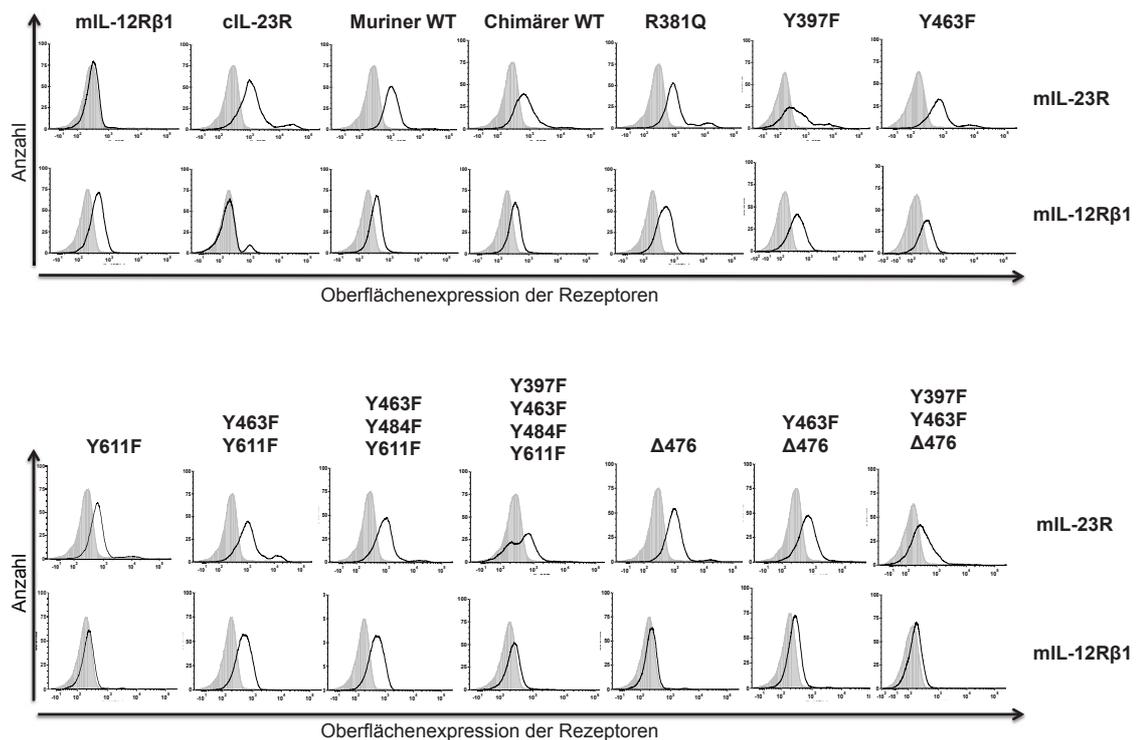


Abb. 3.12: Nachweis der Rezeptoren auf der Zelloberfläche mittels FACS-Analysen

Bei allen durch retrovirale Transduktion generierten Ba/F3 Zelllinien wurde die Oberflächenexpression der Rezeptoren IL-23R und IL-12R β 1 überprüft. Je 5×10^5 Zellen wurden mit PBS gewaschen, in FACS-Puffer gelöst und für 2 h mit den primären Antikörpern (α -IL-12R β 1 und α -mIL-23R) inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen, mit dem sekundären Antikörper inkubiert und in $500 \mu\text{l}$ FACS-Puffer resuspendiert. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. In Grau ist die Kurve von Ba/F3-gp130 Zellen ohne die Rezeptoren IL-12R β 1 und IL-23R als Negativkontrolle dargestellt. Eine Verschiebung der Verteilungskurve (*shift*) nach rechts spricht für das Vorhandensein der Rezeptoren.

Sowohl Antikörper gegen den mIL-12R β 1, als auch gegen die ECD des mIL-23R, die auch im cIL-23R enthalten ist, wurden eingesetzt. Abb. 3.12 zeigt das Ergebnis. Die grauen Histogramme bilden jeweils Ba/F3-gp130 Zellen ab, die als Negativkontrolle eingesetzt wurden.

Die schwarze Kurve zeigt die generierte Ba/F3 Zelllinie. Ein *shift* der Kurve nach rechts bedeutet, dass der Rezeptor auf der Oberfläche vorhanden ist. Die Oberflächenexpression des cIL-23R bzw. der Mutations- und Deletionsvarianten, konnte nachgewiesen werden. Die Zelllinien der Varianten Y611E, Y397F/ Y463F/ Y484F/ Y611E, Δ 476 und Y397F/ Y463F/ Δ 476 zeigen nach Anfärbung mit dem Antikörper gegen den mIL-12R β 1 nur einen geringen *shift* der Histogramme. Die Kurven liegen aber dennoch nicht über der grauen Negativkontrolle (Ba/F3-gp130 Zellen), weshalb von einer reduzierten aber vorhandenen Expression des mIL-12R β 1 ausgegangen werden kann. Als weitere Kontrolle dienten die Zelllinien Ba/F3-gp130 mIL-12R β 1 und Ba/F3-gp130 cIL-23R, die jeweils nur einen der beiden Rezeptoren auf der Oberfläche exprimieren. Dies wird durch die FACS-Analyse (Abb. 3.12) bestätigt.

3.4 Charakterisierung der IL-23-induzierten STAT3 Aktivierung

STAT3 wurde als besonders bedeutsam bei der Signaltransduktion von IL-23 beschrieben [19]. Daher steht die Aktivierung von STAT3 durch IL-23 auch im Mittelpunkt dieser Arbeit. HeLa Zellen wurden mit dem mIL-12R β 1 und dem cIL-23R co-transfiziert. Diese Zellen wurden über verschiedene Zeitspannen, zwischen 0 min bis zu 120 min mit mHIL-23 stimuliert. Die daraus hergestellten Lysate wurden durch Western Blot unter Verwendung von P-STAT3 und STAT3 Antikörpern analysiert. Das Ergebnis des Western Blots ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Als Kontrolle wurden auch untransfizierte HeLa Zellen mit mHIL-23 stimuliert.

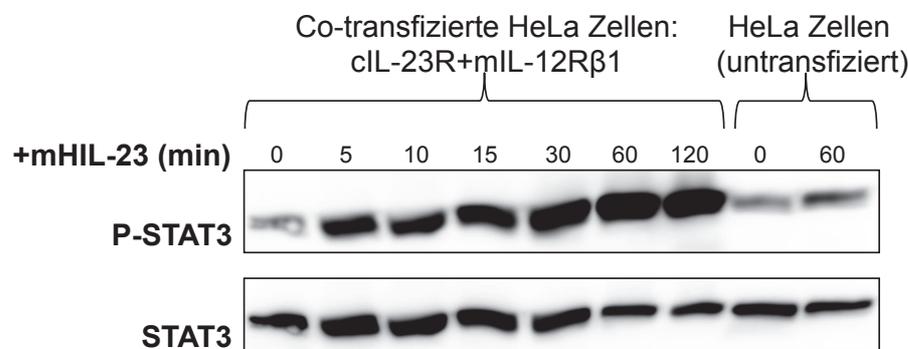


Abb. 3.13: Kinetik der IL-23-induzierten STAT3 Aktivierung im Western Blot

HeLa Zellen wurden mit dem mIL-12R β 1 und dem cIL-23R co-transfiziert und für die angegebene Zeit (0-120 min) mit 0,2% mHIL-23 stimuliert. Die Zellysate wurden dann durch Western Blot unter Verwendung von P-STAT3 und STAT3 Antikörpern analysiert. Untransfizierte HeLa Zellen wurden unstimuliert und nach 60 min Stimulation mit 0,2% mHIL-23 als Negativkontrolle ebenfalls analysiert.

Die co-transfizierten HeLa Zellen zeigten bereits nach 5-minütiger Stimulation mit mHIL-23 eine deutlich stärkere Phosphorylierung von STAT3. Auch nach einer Stimulationszeit von bis zu 120 min bleibt dieses Signal erhalten. Eine Abschwächung der P-STAT3 Bande im

Western Blot ist nicht zu erkennen. Bei den unstimulierten HeLa Zellen (0 min) ist keine Phosphorylierung von STAT3 zu erwarten. Die dennoch geringe Bande, die im Western Blot detektiert wurde, ist als unspezifisch anzusehen, da sie ebenso in den untransfizierten HeLa Zellen zu erkennen ist, die als Negativkontrolle dienten. Die STAT3 Blots zeigen eine gleichwertige Verteilung des Proteins in den Zellysaten.

Zu einem vergleichbaren Ergebnis führten FACS-Analysen der transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen nach Stimulation mit mHIL-23. Nach intrazellulärer Färbung mit einem P-STAT3 Antikörper erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie. Abb. 3.14 zeigt die Ergebnisse für die Aktivierung von STAT3 in Ba/F3-gp130 Zellen, die den chimären WT (mIL-12R β 1+cIL-23R) exprimieren und Ba/F3-gp130 Zellen mit dem murinen WT (mIL-12R β 1 und mIL-23R).

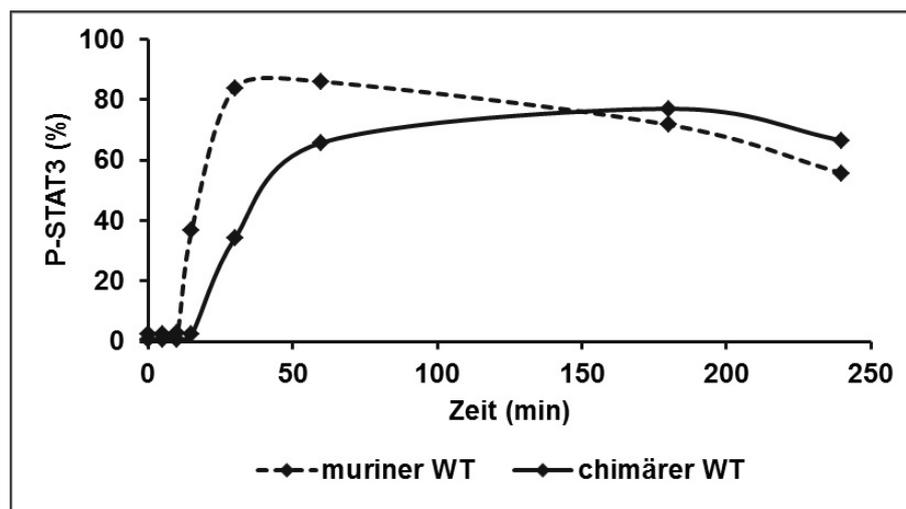


Abb. 3.14: Kinetik der IL-23-induzierten STAT3 Aktivierung in FACS-Analyse

Die stabil transduzierten Zelllinien Ba/F3-gp130 mIL-12R β 1 mIL-23R (muriner WT) und Ba/F3-gp130 mIL-12R β 1cIL-23R (chimärer WT) wurden dreimal mit PBS gewaschen und 4 h in Serum-freien Medium inkubiert. Ansätze von 1×10^6 Zellen wurden unterschiedlich lange mit mHIL-23 stimuliert. Die Zellen wurden mit 2%-igem PFA fixiert und durch 90%-iges Methanol permeabilisiert. Nach Inkubation mit α -P-STAT3 erfolgte die Analyse mittels FACS.

Ein Anstieg der intrazellulären STAT3 Phosphorylierung bis ca. 50-minütiger Stimulationszeit mit mHIL-23 wurde beobachtet. Danach blieb das Signal nahezu konstant. Ein Abfall der STAT3 Aktivierung und damit verbundene negative Regulation der IL-23-induzierten STAT3 Phosphorylierung wurde nicht beobachtet. IL-23 induziert somit eine Langzeit-Aktivierung von STAT3. Dies zeigen sowohl die Western Blot Analysen mit HeLa Zellysaten, als auch die FACS-Analysen mit Ba/F3 Zellen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivierung von STAT3 durch IL-23 nicht vollständig ausgeschaltet werden kann. Eine negative Regulation durch SOCS-Proteine wurde bisher vor allem bei der STAT3 Phosphorylierung durch IL-6 beobachtet [154]. 2006 wurde postuliert, dass auch die Signaltransduktion von IL-23 durch SOCS3 reguliert wird [137]. Ob

dies wie bei IL-6 der Fall ist, ist noch unklar (siehe Diskussion Kap. 4.1.2).

3.5 Analyse der Rezeptorvarianten des chimären IL-23R

3.5.1 R381Q zeigt ein abgeschwächtes STAT3-Signal

Die Mutationsvariante R³⁸¹Q des humanen IL-23R ist beim Menschen als SNP bekannt. Dabei ist die Aminosäure an der Stelle 381 in der ICD des humanen IL-23R, die im Wildtyp ein Arginin ist, gegen ein Glutamin ausgetauscht. Diese Mutation scheint bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen von Bedeutung zu sein ([127], siehe Kap. 1.4.3). Im IL-23R führt die Mutation (human R³⁸¹Q, murin R⁴⁰⁰Q) zu einem abgeschwächten IL-23-induzierten STAT3 Signal [140]. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob dies ebenfalls bei dem chimären Rezeptor auftritt.

Hierfür wurden HeLa Zellen mit der cDNA des mLIL-12R β 1 und des cIL-23R R381Q co-transfiziert. Nach Stimulation mit mHIL-23 wurde im Western Blot ein verringertes P-STAT3 Signal detektiert (siehe Abb.3.15).

Der als Positivkontrolle verwendete chimäre WT (cIL-23R+mIL-12R β 1) zeigte im Gegensatz dazu eine stärkere P-STAT3 Aktivierung nach Stimulation mit mHIL-23. Als Negativkontrollen dienten Lysate von HeLa Zellen, die ausschließlich mit dem cIL-23R R381Q bzw. nur mit dem mLIL-12R β 1 transfiziert worden waren. Diese Zelllinien sind durch die Expression von nur einem der beiden Rezeptoren nicht zur IL-23-vermittelten Signaltransduktion fähig; im Western Blot zeigt sich kein P-STAT3 Signal nach Stimulation mit mHIL-23. Zum Nachweis der Rezeptoren wurden die angefertigten HeLa Zelllysate außerdem mit einem α -myc Antikörper und einem α -mIL-23R beprobt.

Zusätzlich wurden Ba/F3-gp130 Zellen stabil mit den Rezeptoren transduziert. Die erhaltenen Ba/F3 Zelllinien wurden ebenfalls hinsichtlich STAT3 Aktivierung und Rezeptorexpression im Western Blot analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.15 dargestellt. Auch hier dienten Zelllinien, die nur einen der beiden relevanten Rezeptoren (cIL-23R oder mLIL-12R β 1) exprimieren, als Negativkontrollen. Zusätzlich wurden zum Vergleich Zelllysate von Ba/F3-gp130 Zellen aufgetragen, die ohne Zytokin, mit HIL-6 oder mit mHIL-23 stimuliert worden waren. Erwartungsgemäß zeigt sich ein deutliches P-STAT3 Signal nach Stimulation mit HIL-6 und keine P-STAT3-Aktivierung nach Stimulation mit mHIL-23. Die Mutation R³⁸¹Q im cIL-23 der transduzierten Ba/F3-gp130 mLIL-12R β 1 Zellen führt zu einem deutlich abgeschwächten P-STAT3 Signal nach Stimulation mit mHIL-23. Sowohl nach Stimulation der Ba/F3-gp130 Zellen mit HIL-6, als auch nach Stimulation des Ba/F3-gp130 chimärer WT mit mHIL-23 ist ein deutlich stärkeres P-STAT3 Signal zu erkennen.

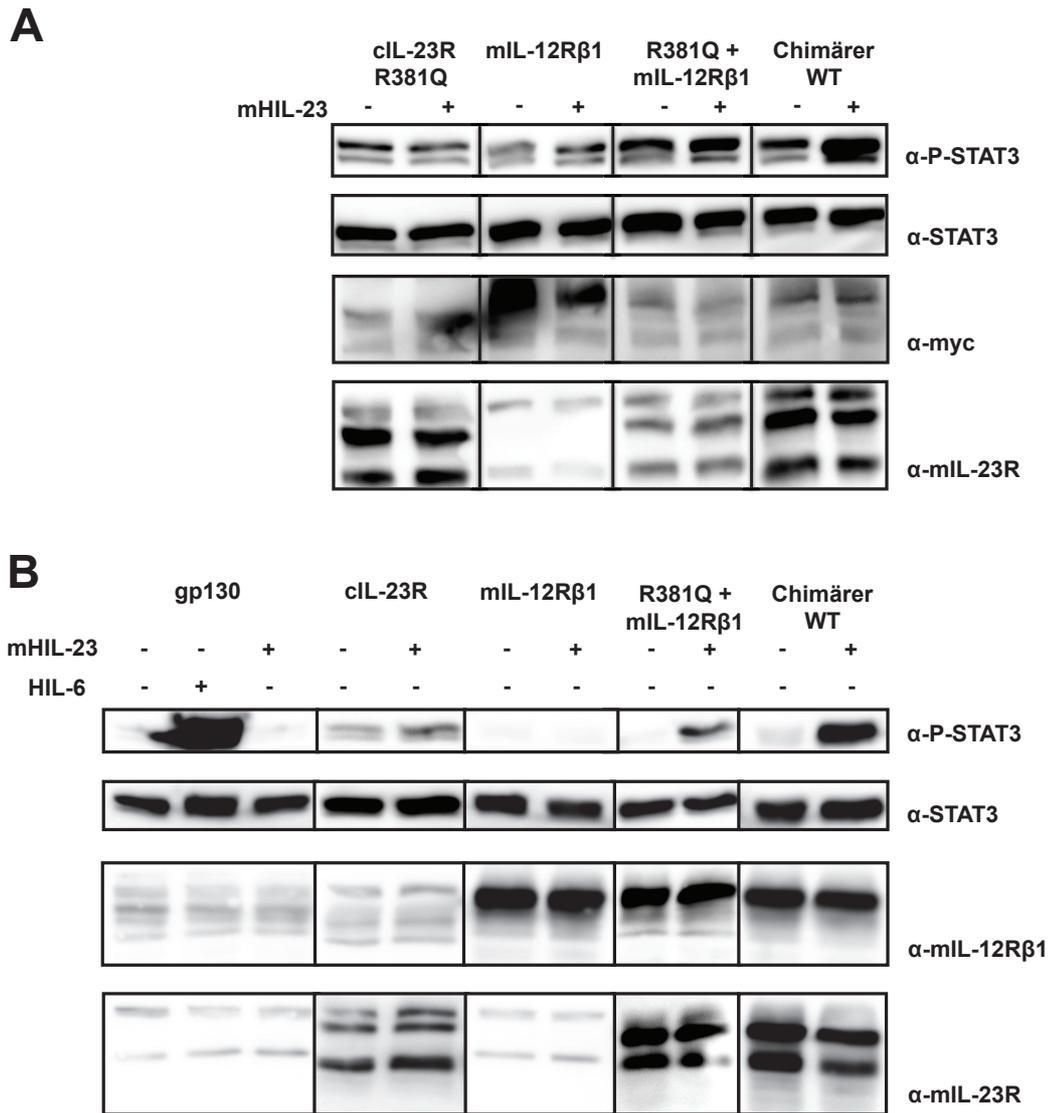


Abb. 3.15: Western Blot mit HeLa und Ba/F3 Zellysaten mit cIL-23R R381Q

A: HeLa Zellen wurden mit den p409 Expressionsvektoren mit der cDNA der Mutationsvariante R381Q des cIL-23R oder des mIL-12R β 1 transfiziert. Außerdem erfolgten Co-Transfektionen mit dem mIL-12R β 1 und dem cIL23R R381Q oder dem cIL-23R (chimärer WT). Die Zellen wurden über Nacht in Serum-freiem Medium kultiviert und dann für 15 min mit 0,2% mHIL-23 stimuliert (+). Zellysate wurden hergestellt und 50 μ g Gesamtprotein pro Spur des SDS-PAA-Gels geladen. Die Proteine wurden durch Western Blot mit Phospho-STAT3 Antikörper und α -myc Antikörper detektiert. Die Antikörper wurden von der Membran entfernt (*stripping*) und mit STAT3 Antikörpern bzw. α -mIL-23R erneut beprobt. B: Stabil transduzierte Ba/F3 Zelllinien wurden drei Mal mit PBS gewaschen, 5 h in Serum-freiem Medium kultiviert und für 10 min mit 0,2% mHIL-23 stimuliert. Ba/F3-gp130 Zellen wurden außerdem mit HIL-6 stimuliert. Zellysate wurden hergestellt und im Western Blot unter Verwendung von α -P-STAT3, α -STAT3, α -mIL-12R β 1 und α -mIL-23R analysiert. Die Ergebnisse stehen repräsentativ für mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführte Versuchsansätze.

3.5.1.1 Keine verringerte Proliferation in Ba/F3 Zellen durch R381Q

Die IL-23-abhängige Proliferation der Ba/F3-gp130 mL-12R β 1 cIL-23R R381Q Zellen ist im Vergleich zum WT nicht abgeschwächt. Dies ergaben Proliferationsassays mit den generierten Ba/F3 Zelllinien. Das Ergebnis zeigt Abb. 3.16. In den Proliferationsassays wird die Eigenschaft der Ba/F3 Zellen genutzt, nur Zytokin-abhängig zu proliferieren. Die Proliferation von Ba/F3-gp130 Zelllinien unter 48-stündiger Stimulation mit HIL-6 wird jeweils als Positivkontrolle gewertet. Die Ba/F3-gp130 mL-12R β 1 cIL-23R Zelllinie zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Proliferation nach Stimulation mit HIL-6 und mHIL-23. Ebenso verhält sich auch die Zelllinie mit der Mutation R381Q im cIL-23R (Ba/F3-gp130 mL-12R β 1 cIL-23R R381Q).

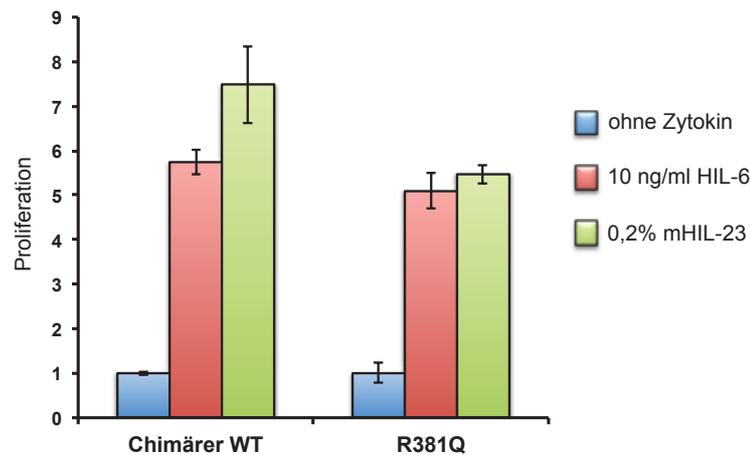


Abb. 3.16: R381Q verhindert die IL-23-abhängige Proliferation von Ba/F3 Zellen nicht

Für die Analyse der Zytokin-abhängigen Proliferation von stabilen BaF3-gp130 Zelllinien wurden je drei Ansätze mit der gleichen Zellzahl (5000 Zellen) hergestellt. Davon wurde zum ersten Ansatz kein Zytokin, zum zweiten HIL-6 (10 ng/ml) und zum dritten mHIL-23 (0,2%) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde die Zellproliferation in den drei Ansätzen durch den *CellTiter-Blue Cell Viability Assay* bestimmt. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse von den unabhängig voneinander stabil transduzierter Ba/F3 Zelllinien, wurde die Negativkontrolle (unstimulierte Ba/F3 Zellen) auf 1 gesetzt und die Zytokin-abhängige Proliferation dementsprechend berechnet (n-fach). Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens zwei Versuchsansätze.

3.5.2 Mutation von Tyrosinen verhindert die STAT3 Phosphorylierung nicht

Der Tyrosinrest (Y) 611 des humanen IL-23R wurde als Bindestelle für STAT3 postuliert [19] und die Aminosäuresequenz pY⁶¹¹FPQ wurde als typisches Bindemotiv für STAT3 identifiziert (siehe Kap. 1.4.2). Weitere Bindestellen für STAT3 im humanen IL-23R sind bisher nicht bekannt. Ebenso wurden Y397 (SHP2) und Y484 (STAT4) als mögliche Bindestellen für Signalmoleküle postuliert [19]. Um die Beteiligung der Tyrosine innerhalb der ICD des hu-

manen IL-23R an der Aktivierung von STAT3 durch IL-23 zu untersuchen, wurden zunächst einzelne und im Verlauf bis zu vier der sieben Tyrosine im cIL-23R mutiert. Tyrosin 463 ist nur im humanen IL-23R vorhanden und nicht im murinen. Mit der Sequenz pY⁴⁶³PQ ähnelt es dem Bindemotiv für STAT3 und wurde daher als weitere mögliche Bindestelle für STAT3 in Betracht gezogen.

Die Analyse der STAT3-Aktivierung erfolgte mittels Western Blot. Die Experimente wurden in zwei Zellsystemen durchgeführt. Zum einen durch transiente Transfektion der Rezeptoren in HeLa Zellen und zum anderen durch stabil transduzierte Ba/F3-gp130 Zelllinien. Die Zellen enthielten neben der Variante des cIL-23R auch den mL-12R β 1. Nur bei Expression beider Rezeptoren kann mHIL-23 an den entsprechenden Rezeptorkomplex binden, was eine Analyse der IL-23-abhängigen Signaltransduktion ermöglicht.

Die Ergebnisse zeigen erstaunlicherweise, dass die IL-23-vermittelte STAT3 Phosphorylierung durch Mutation der Tyrosine nicht verhindert wird (siehe Abb. 3.17).

Als Positivkontrolle dienen HeLa und Ba/F3-gp130 Zellen, die den chimären WT mit dem mL-12R β 1 und dem cIL-23R exprimieren. Im Western Blot ist nach IL-23 Stimulation ein P-STAT3 Signal zu detektieren. Die Mutation von einzelnen Tyrosinen zu Phenylalanin innerhalb des cIL-23R (Y397F, Y463F und Y611F) führt in den HeLa und Ba/F3 Zellen zu keiner Verringerung des P-STAT3-Signals im Western Blot nach Stimulation mit mHIL-23. Die Expression der Rezeptoren wurde durch den Einsatz von α -mIL-12R β 1 und α -mIL-23R Antikörpern nachgewiesen. An dieser Stelle sei erwähnt, dass in Western Blots mit HeLa Zelllysaten schon im unstimulierten Zustand eine geringe Hintergrundaktivität von P-STAT3 nachweisbar ist. Die Steigerung der Intensität des Signals nach Stimulation der Zellen mit mHIL-23 ist aber dennoch deutlich und konnte in mindestens zwei unabhängigen Versuchsansätzen verifiziert werden. Die Ergebnisse der Western Blot Analysen der Ba/F3 Zelllysate bieten ein noch klareres Bild, da in den unstimulierten Zellen keine STAT3 Hintergrundaktivität vorhanden ist. Eine quantitative Aussage über die STAT3 Aktivierung kann durch diese Versuchsergebnisse jedoch nicht getroffen werden.

Im nächsten Schritt wurden Mutationsvarianten des cIL-23R hergestellt, in denen mehrere Tyrosine zu Phenylalanin mutiert wurden. Kombinationen der Mutationen (Y463F/Y611F, Y463F/Y484F/Y611F und Y397F/Y463F/Y484F/Y611F) des cIL-23R wurden generiert und zusammen mit dem mL-12R β 1 in die Zellsysteme eingebracht.

Alle Mutationsvarianten zeigten nach Analyse im Western Blot sowohl in HeLa, als auch in BaF3-Zellen ein deutliches STAT3-Signal. Sogar der cIL-23R, in dem alle Tyrosine, die als mögliche Bindestellen für Signalmoleküle im IL-23R postuliert worden sind, mutiert wurden (Y397F/Y463F/Y484F/Y611F), zeigte keine Beeinträchtigung der STAT3 Phosphorylierung nach Stimulation mit IL-23 (siehe Abb. 3.17). Die Ergebnisse der Western Blot Analysen mit den Mutationsvarianten zeigen, dass die IL-23-vermittelte STAT3 Aktivierung zumindest nicht nur auf Tyrosinmotive in der ICD des humanen IL-23R zurückzuführen ist.

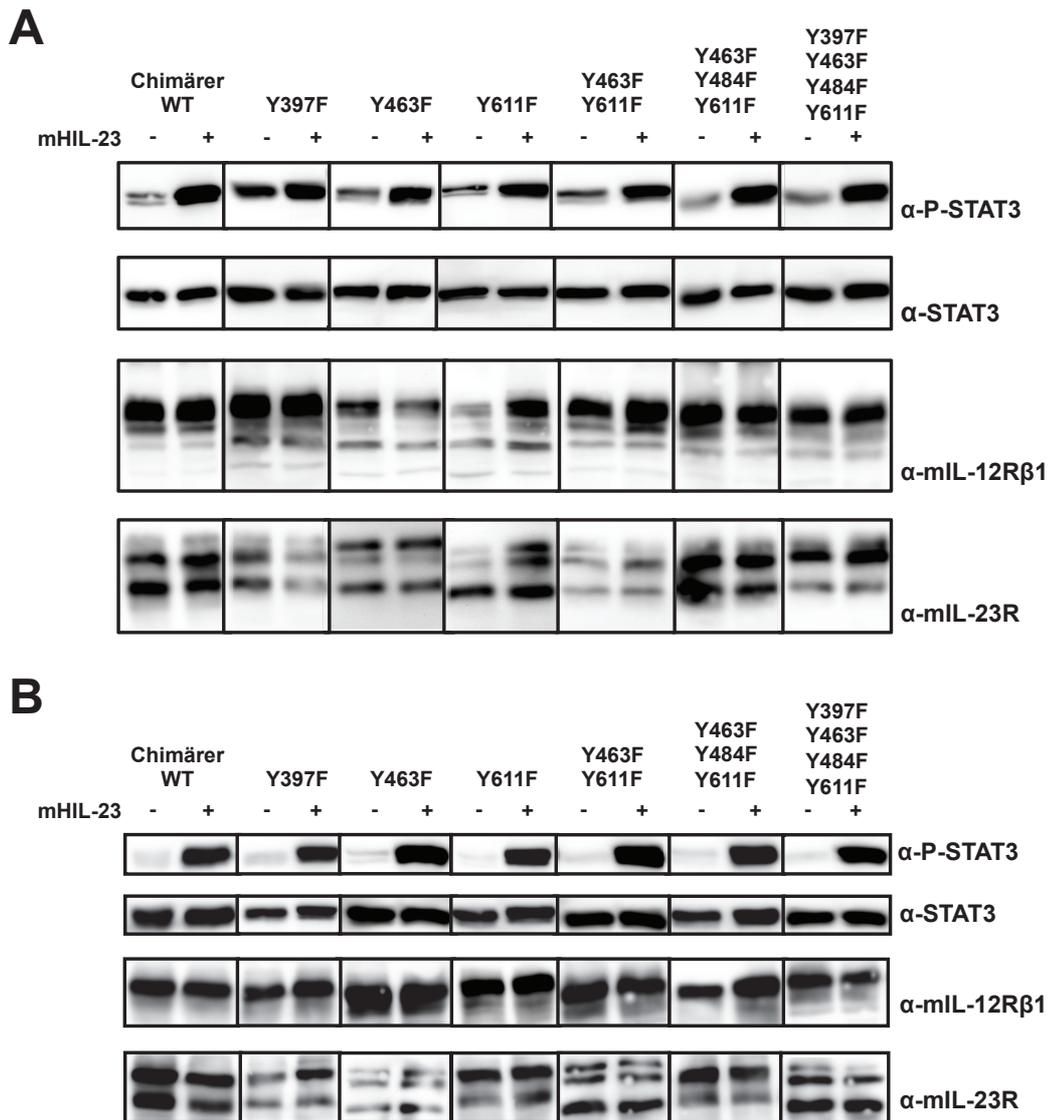


Abb. 3.17: Western Blot mit HeLa und Ba/F3 Zelllysaten der Mutationsvarianten des cIL-23R

A: HeLa Zellen wurden transient mit dem IL-12R β 1 und einer Mutationsvariante des cIL-23R transfiziert. Die Zellen wurden über Nacht in Serum-freien Medium kultiviert und anschließend für 15 min mit 0,2% mHIL-23 stimuliert (+). Zelllysate wurden hergestellt und 50 μ g Gesamtprotein pro Spur geladen. Nach Transfer der Proteine auf die Membran wurden diese mit α -P-STAT3, α -STAT3, α -mIL-12R β 1 und α -mIL-23R analysiert. B: Ba/F3-gp130 mIL-12R β 1 Zellen wurden zusätzlich stabil mit den Mutationsvarianten des cIL-23R transduziert. Die Zelllinien wurden drei Mal mit PBS gewaschen, 5 h in Serum-freien Medium kultiviert und für 10 min mit 0,2% mHIL-23 stimuliert. Zusätzlich wurden ebenfalls α -STAT3, α -mIL-12R β 1 und α -mIL-23R Blots von allen verwendeten Lysaten angefertigt. Die Ergebnisse stehen repräsentativ für mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführte Versuchsansätze.

Um weitere Informationen über die Lokalisation eines möglichen Bindemotives für STAT3 innerhalb cIL-23R zu bekommen wurden daher Deletionsvarianten des Rezeptors generiert und analysiert.

3.5.3 Deletion des cIL-23R verhindert STAT3 Phosphorylierung

Zusätzlich zu den Mutationen wurde die Auswirkung der Deletion des C-terminalen Bereichs der ICD des cIL-23R untersucht (Übersicht der Mutations- und Deletionsvarianten siehe Kap. 3.2.1, Abb. 3.7). Auch hier wurde durch Western Blot die STAT3 Phosphorylierung in HeLa und BaF3 Zellen nach Stimulation mit mHIL-23 analysiert. Keine der Deletionsvarianten des cIL-23R zeigt noch eine Aktivierung von STAT3 nach Stimulation mit IL-23.

Den Deletionsvarianten fehlen, durch Einsatz spezieller Primer in der PCR (siehe Kap. 3.2.1), die C-terminal gelegenen 154 Aminosäure der humanen ICD des cIL-23R. In dem deletierten Abschnitt sind auch die Tyrosine Y476, Y484 und Y611 enthalten. Die Rezeptorvarianten werden als $\Delta 476$ bezeichnet. Zusätzlich wurde in dem deletierten cIL-23R zunächst das Tyrosin 463, welches nur im humanen Rezeptor vorhanden ist, zu Phenylalanin mutiert (Y463F/ $\Delta 476$). Im nächsten Schritt wurde dann außerdem das Tyrosin Y397 mutiert (Y397F/Y463F/ $\Delta 476$), welches als potentielle SH2 Bindestelle beschrieben worden ist [19]. Abb. 3.18 zeigt das Ergebnis der Western Blot Analysen mit den drei generierten Deletionsvarianten und dem Chimären WT als Positivkontrolle. Nach Stimulation mit mHIL-23 zeigt keine der Deletionsvarianten eine intrazelluläre STAT3 Phosphorylierung.

Bei HeLa Zellen, die zuvor transient mit dem mIL-12R β 1 und mit einer Deletionsvariante des cIL-23R transfiziert worden sind, zeigt sich kein Unterschied in der Ausprägung der STAT3 Aktivierung mit oder ohne vorherige Stimulation der Zellen mit mHIL-23. Als Positivkontrolle dienen HeLa Zellen mit dem chimären WT (mIL-12R β 1+cIL-23R), die eine deutlich stärkere P-STAT3-Bande nach 15-minütiger Stimulation der HeLa Zellen mit mHIL-23 aufweisen. Die Ergebnisse stimmen mit denen der stabil mit den Rezeptoren transduzierten Ba/F3 Zellen überein. In Western Blot Analysen mit P-STAT3 Antikörper ist nur beim chimären WT ein entsprechendes Signal nach Stimulation mit IL-23 zu erkennen. Schon die Deletion des cIL-23R ($\Delta 476$) alleine reicht aus, um eine STAT3 Phosphorylierung zu verhindern. Eine Aktivierung von STAT3 über den Tyrosinrest Y463 zeigt sich im Western Blot mit den generierten HeLa und Ba/F3 Zellen nicht.

3.5.4 Analyse der IL-23-abhängigen Proliferation

Die Ba/F3-gp130 Zelllinien der Mutations- und Deletionsvarianten des cIL-23R sollten hinsichtlich ihrer Zytokin-abhängigen Proliferation untersucht werden. Dafür wurden je drei Ansätze mit einer Zellzahl von 5000 Zellen hergestellt, kein Zytokin, HIL-6 (10 ng/ml) oder mHIL-23 (0,2%) hinzugegeben und nach einer Inkubationszeit von mindestens 48 h

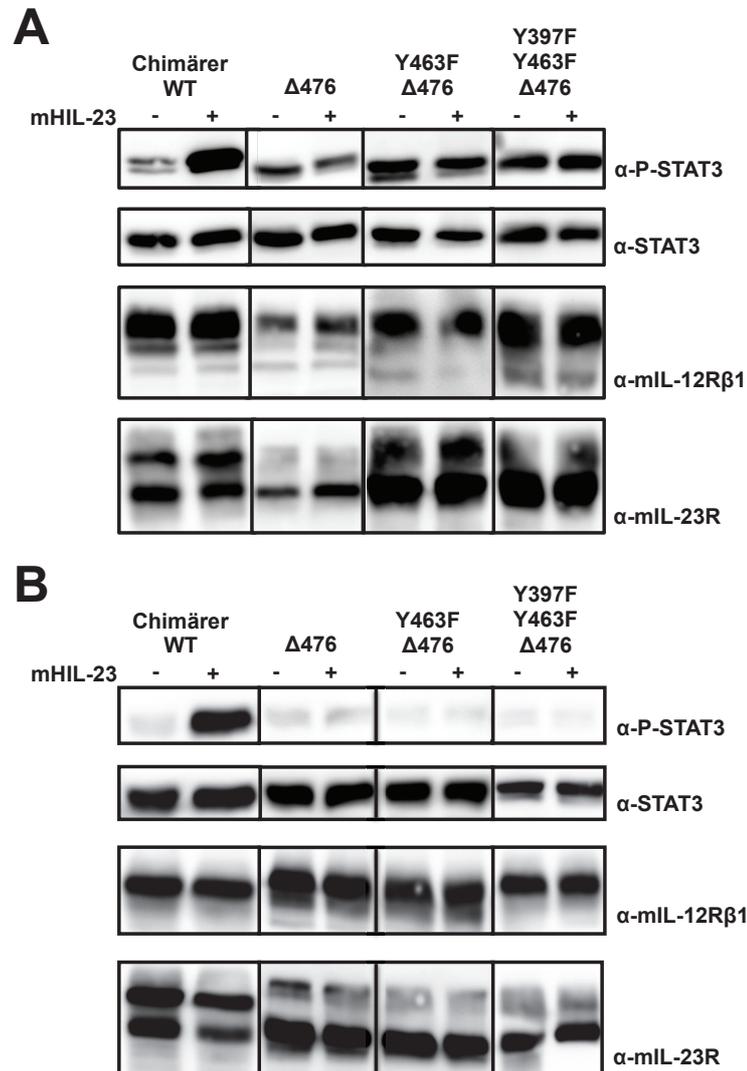


Abb. 3.18: Western Blot mit HeLa und Ba/F3 Zelllysaten der Deletionsvarianten

A: HeLa Zellen wurden transient mit dem mIL-12R β 1 und einer Deletionsvariante des cIL-23R transfiziert. Die Zellen wurden über Nacht in Serum-freiem Medium kultiviert und dann für 15 min mit 0,2% mHIL-23 stimuliert (+). Die Zelllysate wurden durch Western Blot unter Verwendung von α -P-STAT3, α -STAT3, α -mIL-12R β 1 und α -mIL-23R Antikörpern analysiert. B: Western Blot Analyse der Ba/F3 Zelllysate von Ba/F3-gp130 mIL-12R β 1 Zellen, die zusätzlich stabil mit den Deletionsvarianten des cIL-23R transduziert worden waren. Die Zelllinien wurden drei Mal mit PBS gewaschen, 5 h in Serum-freiem Medium kultiviert und für 10 min mit 0,2% mHIL-23 stimuliert. α -P-STAT3, α -STAT3, α -mIL-12R β 1 und α -mIL-23R Blots wurden von allen verwendeten Lysaten angefertigt. Die Ergebnisse stehen repräsentativ für mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführte Versuchsansätze.

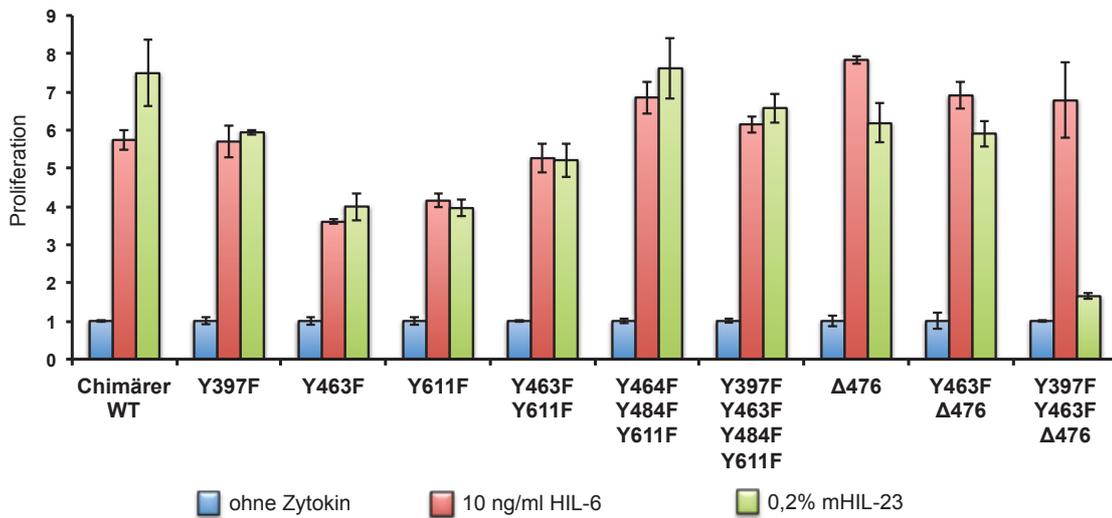


Abb. 3.19: IL-23-abhängige Proliferation der Ba/F3-gp130 Zelllinien mit cIL-23R-Varianten

Für die Analyse der Zytokin-abhängige Proliferation von stabilen BaF3-gp130 Zelllinien wurden je drei Ansätze mit der gleichen Zellzahl (5000 Zellen) hergestellt. Davon wurde zum ersten Ansatz kein Zytokin, zum zweiten HIL-6 (10 ng/ml) und zum dritten mHIL-23 (0,2%) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde die Zellproliferation in den drei Ansätzen durch den *CellTiter-Blue Cell Viability Assay* bestimmt. Für bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse von den unabhängig voneinander stabil transduzierten Ba/F3 Zelllinien, wurde die Negativkontrolle (unstimulierte Ba/F3 Zellen) auf 1 gesetzt und die Zytokin-abhängige Proliferation dementsprechend umgerechnet (n-fach). Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens zwei Versuchsansätze.

die Proliferation bestimmt. Abb. 3.19 zeigt das Ergebnis.

Alle Ba/F3-gp130 Zelllinien proliferieren ohne Zytokinzugabe nicht (Negativkontrolle). Unter Zugabe von HIL-6 proliferieren alle generierten Zelllinien, da sie gp130 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Eine Ausnahme dabei bildet die Ba/F3-gp130 Zelllinie des murinen WT, die hier als Kontrolle dient (vgl. Kap. 3.3).

Interessant für diese Arbeit ist vor allem die Proliferation unter dem Einfluss von IL-23. Zelllinien, die nur einen der Rezeptoren für die Signaltransduktion von IL-23 exprimieren, also nur den murinen IL-23R oder den murinen IL-12R β 1 oder den chimären IL-23R, zeigen keine Proliferation unter mHIL-23. Der chimäre WT (mIL-12R β 1/ cIL-23R) proliferiert mit mHIL-23 (Positivkontrolle, vgl. Kap. 3.3).

Die Proliferation von allen generierten Ba/F3-gp130 Zelllinien, die jeweils den mIL-12R β 1 und eine Mutations- bzw. Deletionsvariante des cIL-23R besitzen, wurde untersucht und das Ergebnis in mindestens zwei unabhängigen Versuchsansätzen verifiziert. Nur die Doppelmutations- und Deletionsvariante Y397F/Y463F/ Δ 476 war nicht zur Proliferation unter dem Einfluss von mHIL-23 fähig. Alle anderen Zelllinien weisen keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Zytokin-abhängigen Wachstum unter HIL-6 und mHIL-23 auf. Da alle Mutationsvarianten des cIL-23R eine STAT3-Aktivierung im Western Blot gezeigt

3.5 Analyse der Rezeptorvarianten des chimären IL-23R

hatten, war auch eine IL-23-abhängige Proliferation zu erwarten. Kein STAT3 Signal war bei den Deletionsvarianten nachgewiesen worden. Die Rezeptorvarianten $\Delta 476$ und Y463F/ $\Delta 476$ proliferierten aber, STAT3 unabhängig, unter Stimulation mit mHIL-23. Die Ba/F3-gp130 mIL-12R $\beta 1$ Zelllinie mit dem cIL-23R Y397F/Y463F/ $\Delta 476$ war als einzige der Rezeptorvarianten nicht zur IL-23-abhängigen Proliferation fähig. Sie wuchs nur unter Stimulation mit HIL-6. Die Mutation von Tyrosin 397 zu Phenylalanin ist also, im deletierten cIL-23R, entscheidend um die IL-23-abhängigen Proliferation zu unterdrücken.

Die Versuchsergebnisse zu den Rezeptorvarianten des chimären IL-23R sind in einer Übersicht in Abb. 3.20 zusammengefasst.

Wie in der Literatur bereits postuliert wurde, konnte bestätigt werden, dass die Mutation R381Q im IL-23R zu einer Verminderung des STAT3 Signal führt. Die Proliferation der Ba/F3 Zellen zeigte sich durch diese Mutation aber nicht beeinträchtigt.

Aminosäuren	Postulierte Bindestellen	Chimärer WT	R381Q	Y397F	Y463F	Y611F	Y463F Y611F	Y463F Y484F Y611F	Y397F Y463F Y484F Y611F	$\Delta 476$	Y463F $\Delta 476$	Y397F Y463F $\Delta 476$
R381TGI	JAK2	R	Q	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Y397EDI	SHP2	Y	Y	F	Y	Y	Y	Y	F	Y	Y	F
Y429VDP		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Y450KKE		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Y463PQ	nur human	Y	Y	Y	F	Y	F	F	F	Y	F	F
Y476IPD		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			
Y484KPQ	STAT4	Y	Y	Y	Y	Y	Y	F	F			
Y611FPQ	STAT1/3	Y	Y	Y	Y	F	F	F	F			
Expression der IL-23 Rezeptoren auf der Zelloberfläche (FACS)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aktivierung von STAT3 (in HeLa Zellen)		+	↓	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Aktivierung von STAT3 (in Ba/F3 Zellen)		+	↓	+	+	+	+	+	+	-	-	-
IL-23 abhängige Proliferation von Ba/F3 Zellen		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Abb. 3.20: Zusammenfassung der Ergebnisse zu den cIL-23R-Varianten

In allen HeLa und Ba/F3 Zellen, die den mIL-12R $\beta 1$ und eine Mutationsvariante des cIL-23R enthielten, konnte durch Western Blot Analysen eine STAT3 Phosphorylierung nachgewiesen werden. In den Zelllinien der Deletionsvarianten hingegen konnte keine STAT3 Aktivierung beobachtet werden. Demzufolge muss es eine Tyrosin-unabhängige nicht-kanonische STAT3 Aktivierung innerhalb des IL-23R geben. Da die Deletionsvarianten keine STAT3 Phosphorylierung zeigten, unabhängig davon, ob Y463 mutiert war oder nicht, konnte ausgeschlossen werden, dass dieser Tyrosinrest an der Aktivierung von STAT3 durch IL-23

beteiligt ist.

Die weitere Erkenntnis aus den bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Versuchen ist, dass erst die Mutation von Y397 die Proliferation der Deletionsvarianten verhindert. Die Deletionsvarianten $\Delta 476$ und Y463F/ $\Delta 476$ zeigten keine STAT3 Aktivierung, aber proliferierten unter mHIL-23 Stimulation. Diese Proliferation war also STAT3-unabhängig und beweist so die Beteiligung eines anderen Signalweges. Erst die Variante Y397F/Y463F/ $\Delta 476$ des cIL-23R zeigte weder STAT3 Aktivierung, noch IL-23-abhängige Proliferation. Y397 ist also für diese Signalweiterleitung notwendig.

3.6 Identifikation eines neuen STAT3 Bindemotives im IL-23R

3.6.1 Generierung von Deletionsvarianten des murinen IL-23R

Die Ergebnisse aus Western Blot- und Proliferationsanalysen des cIL-23R lassen vermuten, dass im C-terminalen Bereich des Rezeptors eine Tyrosin-unabhängige Bindestelle für STAT3 existiert. Die Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen zum murinen IL-23R überein (siehe Diskussion Kap.4.2 und [134]). Die Deletion der C-terminalen 142 Aminosäuren der murinen ICD (bzw. 154 AS der humanen ICD) des IL-23R verhindert die STAT3 Phosphorylierung.

Um den Bereich der ICD des mLIL-23R näher zu charakterisieren, wurden neue Deletionsvarianten generiert. Als Vorlage (*template*) für die Deletions-PCR diente die cDNA der Mutationsvariante Y416F/Y504F/Y542F/Y626F (siehe Abb. 3.21) des mLIL-23R. Diese Variante zeigte eine STAT3 Phosphorylierung durch Stimulation mit IL-23 in Ba/F3 Zellen (Ergebnisse nicht dargestellt, D. Floss 2013 [134]).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden zunächst weiteren Deletionsvarianten des murinen IL-23R generiert, da ein vergleichbarer Aktivierungsmodus von STAT3 im humanen IL-23R vermutet werden kann (siehe Diskussion Kap. 4.2).

Die Deletion (Δ) des murinen Rezeptors (mIL-23R Y416F/Y504F/Y542F/Y626F) erfolgte ab Aminosäure 541, 554 und 625. Die Klonierung erfolgte, nach Behandlung mit dem Restriktionsenzym *PmeI* direkt in den dephosphorylierten p409-Vektor. In Abb. 3.22 ist eine Restriktionsanalyse der klonierten Expressionsvektoren mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* dargestellt. Dieses Enzym schneidet die cDNA der in p409 vorliegenden mLIL-23-Rezeptorvarianten mehrfach. Die nach Agarosegelelektrophorese voneinander getrennten DNA-Fragmente stimmen mit der errechneten Fragmentgröße überein (Plasmidkarten siehe Anhang 5.1).

Analog zum Vorgehen im cIL-23R erfolgte nun die Klonierung der cDNA in den Expressionsvektor pMOWS-puro-GFP (siehe Kap. 3.1.1, Abb. 3.4). Ba/F3-gp130 mLIL-12R β 1 Zellen wurden mit den neuen Deletionsvarianten des mLIL-23R stabil transduziert. Die Oberflächenexpression der Rezeptoren wurde mittels Durchflusszytometrie bestätigt (siehe Abb.

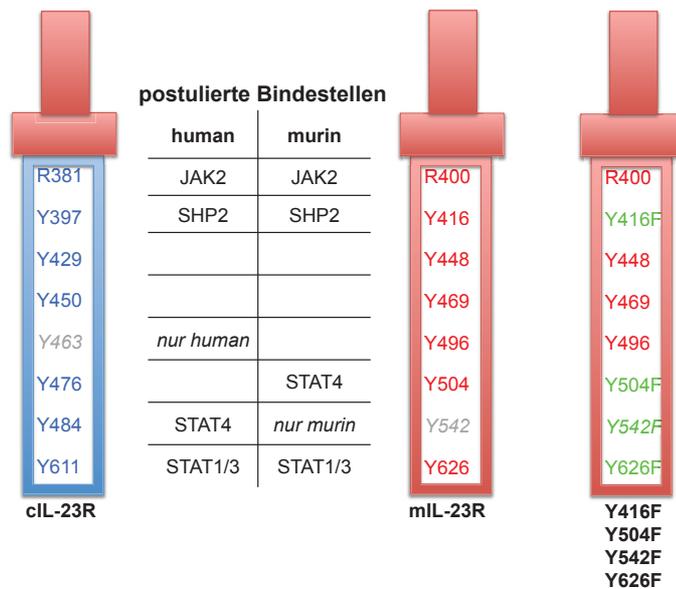


Abb. 3.21: Schematische Darstellung des cIL-23R (rot: murine ECD und TM, blau: humane ICD), des mIL-23R und der Mutationsvariante Y416F/Y504F/Y542F/Y626F des mIL-23R

Der strukturelle Aufbau des murinen und humanen IL-23R stimmt überein, beide besitzen sieben Tyrosine in der ICD. Das Tyrosin 463 ist in der Aminosäuresequenz nur im humanen, das Tyrosin 542 nur im murinen Rezeptor zu finden (grau). Mögliche Bindestellen für Jak2, SHP2, STAT4 und STAT1/ 3 innerhalb des murinen und humanen IL-23R wurden postuliert (vgl. Tabelle 1.1).

3.23).

3.6.2 Analyse der Deletionsvarianten des murinen IL-23R

Nach Stimulation der generierten Ba/F3 Zellen mit mHIL-23 wurden Zelllysate hergestellt und mit Western Blots analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.24 dargestellt. Nur die Rezeptorvariante Y416F/ Y504F/ Y542F/ Δ 625 zeigt ein IL-23-abhängiges STAT3 Signal. Sowohl Y416F/Y504F/ Δ 541, als auch Y416F/Y504F/Y542F/ Δ 554 zeigt keine STAT3 Phosphorylierung nach Stimulation mit mHIL-23. Als Postivkontrolle dienten Ba/F3-gp130 mIL-12R β 1 cIL-23R Zellen, die ebenfalls eine Aktivierung von STAT3 nach Stimulation der Zellen mit mHIL-23 zeigen. Die Aktivität ist vergleichbar mit der in den Ba/F3 Zellen der Rezeptorvariante Y416F/Y504F/Y542F/ Δ 625 (siehe Abb. 3.21). Die Expression der Rezeptoren wurden durch den Einsatz von Antikörpern gegen den mIL-12R β 1 und den mIL-23R überprüft. In allen analysierten Zelllysaten zeigen sich deutliche Banden im Western Blot.

Im nächsten Schritt wurde die Zytokin-abhängige Proliferation der generierten Rezeptorvarianten de mIL-23R analysiert. Darin zeigte sich, dass nur die Deletionsvariante Y416F/Y504F/Y542F/ Δ 625 in Abhängigkeit von IL-23 proliferieren kann. Die beiden anderen Zelllinien, Y416F/Y504F/ Δ 541 und Y416F/Y504F/Y542F/ Δ 554 zeigten eine deutlich

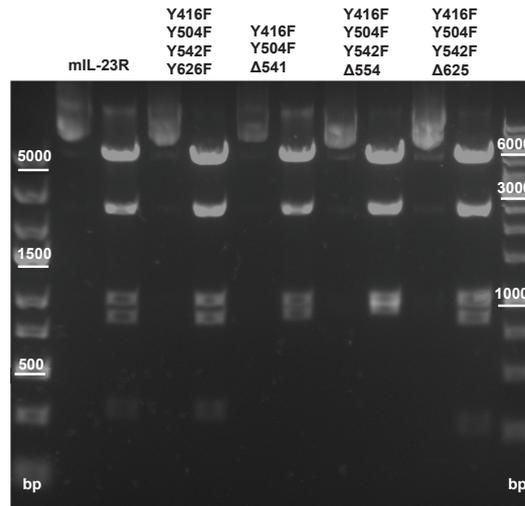


Abb. 3.22: Restriktionsanalyse der klonierten Expressionsvektoren der Deletionsvarianten des mIL-23R
 Die cDNA der im p409-Vektor vorliegenden neuen Deletionsvarianten des mIL-23R wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* und dem dazugehörigen Puffer 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von Ladepuffer wurden die Proben auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich wurde zur Kontrolle der unverdaute Vektor aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 100 mV trennen sich die DNA-Fragmente der Größe nach auf. Die erwarteten Fragmente der p409-Vektoren nach Restriktionsspaltung mit *EcoRI* sind: mIL-23R und Y416F/Y504F/Y542F/Y626F: 344, 873, 1008, 2436, 5150 bp; Y416F/Y504F/Δ541: 905, 1008, 2436, 5150 bp; Y416F/Y504F/Y542F/Δ554: 944, 1008, 2436, 5150 bp; Y416F/Y504F/Y542F/Δ625: 284, 873, 1008, 2436, 5150 bp.

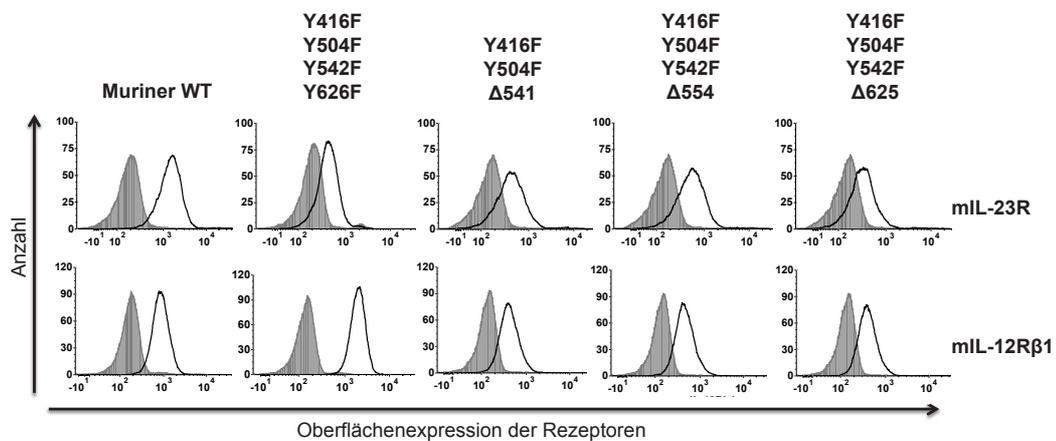


Abb. 3.23: Nachweis der Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Ba/F3 Zellen mittels FACS-Analysen
 Bei allen durch retrovirale Transduktion generierten Ba/F3 Zelllinien wurde die Oberflächenexpression der Rezeptoren IL-23R und IL-12Rβ1 überprüft. Je 5×10^5 Zellen wurden mit PBS gewaschen, in FACS-Puffer gelöst und für 2 h mit den primären Antikörpern (α -IL-12Rβ1 und α -mIL-23R) inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen, mit dem sekundären Antikörper 1 h lang inkubiert und in $500 \mu\text{l}$ FACS-Puffer gelöst. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. In Grau ist die Kurve von Ba/F3-gp130 Zellen ohne die Rezeptoren IL-12Rβ1 und IL-23R als Negativkontrolle dargestellt. Ein Verschiebung der Verteilungskurve (*shift*) nach rechts spricht für das Vorhandensein der Rezeptoren.

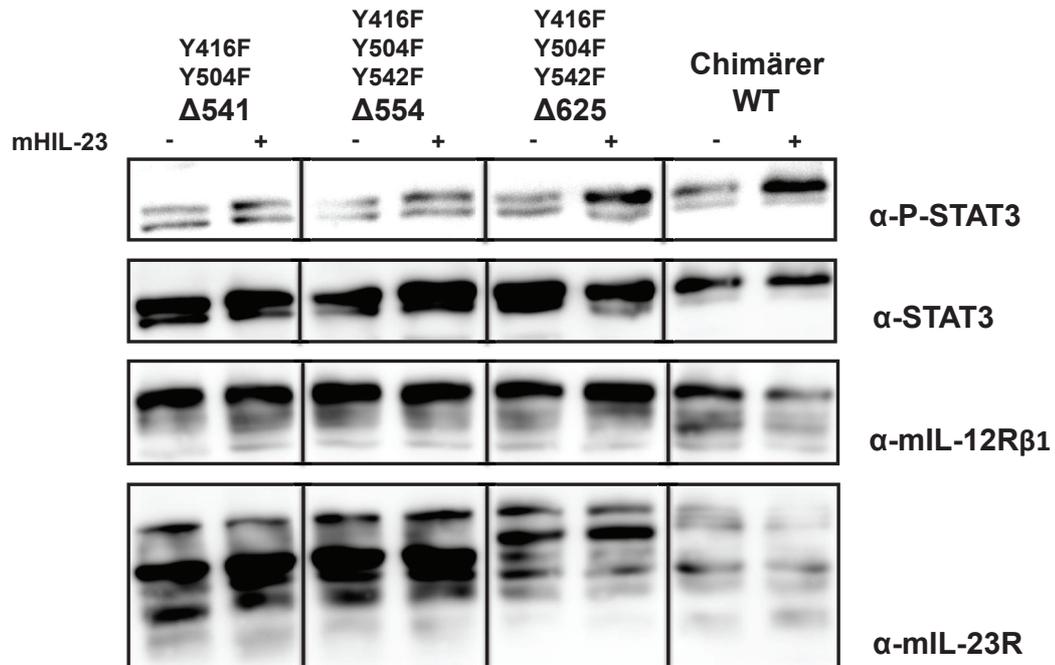


Abb. 3.24: Analyse der STAT3 Aktivierung durch IL-23 in den Deletionsvarianten des mIL-23R

Ba/F3-gp130 mIL-12Rβ1 wurden zusätzlich stabil mit den neuen Deletionsvarianten des mIL-23R transduziert. Die Zellen wurden drei Mal mit PBS gewaschen, 5 h in Serum-freien Medium kultiviert und für 10 min mit 0,2% mHIL-23 stimuliert. Zellysate wurden hergestellt und unter Verwendung von α-P-STAT3, α-STAT3, α-mIL-12Rβ1 und α-mIL-23R Antikörpern analysiert.

geringe Proliferation unter der Stimulation mit mHIL-23 im Vergleich zur Proliferation unter HIL-6. Das Ergebnis des Proliferationsassays ist in Abbildung 3.25 dargestellt. Als Kontrollen dienten Ba/F3 Zellen mit dem murinen WT (Positivkontrolle) und Ba/F3-gp130 Zellen (Negativkontrolle). Ebenfalls als Kontrolle diente die Mutationsvariante des mIL-23R (Y416F/Y504F/Y542F/Y626F), die die Grundlage für die Generierung der Deletionsvarianten bildete und unter IL-23-Stimulation in vorherigen Versuchen STAT3 Aktivierung (im Western Blot) und Proliferation gezeigt hatte (Floss 2013 [134]).

Durch die Ergebnisse der Western Blots und Proliferationsanalysen konnte der Bereich im C-terminalen Abschnitt des IL-23R, in dem ein STAT3 Motiv vermutet werden kann, weiter eingegrenzt werden.

Zwischen den Aminosäuren 554 bis 624 in der ICD des mIL-23R muss ein nicht-kanonisches STAT3 Bindemotiv liegen, denn die Variante, die ab AS 554 deletiert ist, zeigte kein P-STAT3 Signal und keine Proliferation durch mHIL-23. Wenn der Rezeptor jedoch erst bei AS 624 endet, ist die Aktivierung von STAT3 durch IL-23 wieder möglich.

Die Aminosäuresequenz der humanen ICD des IL-23R stimmt in diesem Bereich größtenteils mit der des murinen Rezeptors überein, daher kann auch hier in diesem Abschnitt ein STAT3 Bindemotiv vermutet werden (siehe Diskussion Kap. 4.1.1).

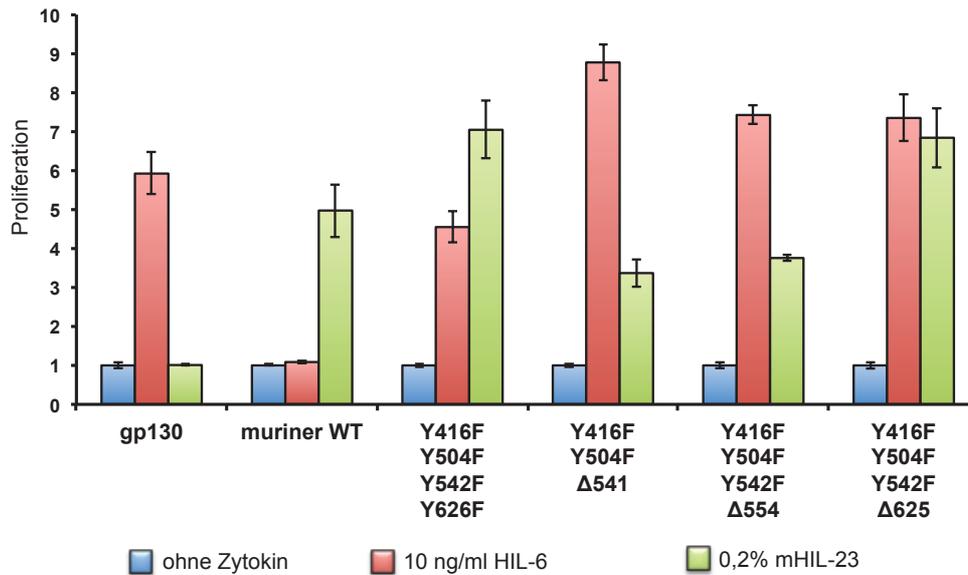


Abb. 3.25: IL-23-abhängige Proliferation der mIL-23R-Deletionsvarianten

Für die Analyse der Zytokin-abhängigen Proliferation von stabilen BaF3-gp130 Zelllinien wurden je drei Ansätze mit der gleichen Zellzahl (5000 Zellen) hergestellt. Davon wurde zum ersten Ansatz kein Zytokin, zum zweiten HIL-6 (10 ng/ml) und zum dritten mHIL-23 (0,2%) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde die Zellproliferation in den drei Ansätzen durch den *CellTiter-Blue Cell Viability Assay* bestimmt. Für bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse von den unabhängig voneinander stabil transduzierten Ba/F3 Zelllinien, wurde die Negativkontrolle (unstimulierte Ba/F3 Zellen) auf 1 gesetzt und die Zytokin-abhängige Proliferation dementsprechend umgerechnet (n-fach). Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens zwei Versuchsansätze.

3.7 IL-23 aktiviert den MAPK-Signalweg

Die Ergebnisse der Proliferationsassays führen zu dem Schluss, dass neben der Aktivierung von STAT3 weitere Signalwege durch IL-23 stimuliert werden. Demzufolge wurde nun untersucht, ob eine Aktivierung der MAPK-Kaskade durch IL-23 erfolgt. Dafür wurde die Ba/F3-gp130 Zelllinie mit beiden Rezeptoren für die Signaltransduktion von IL-23, mIL-12R β 1 und cIL-23R, mit mHIL-23 stimuliert, Zellysate hergestellt und die Aktivierung von ERK (*extracellular-signal regulated kinases*) durch Western Blot Analyse untersucht. ERK wird im Laufe des MAPK-Signalweges phosphoryliert [155]. Nach 30-minütiger Stimulation mit mHIL-23 zeigten die Ba/F3-gp130 mIL-12R β cIL-23R Zellen ein deutliches Phospho-ERK Signal nach Western Blot Analyse im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (siehe Abb. 3.26).

Um diese Beobachtung zu verifizieren, kamen außerdem zwei Inhibitoren der MAPK-Kaskade zum Einsatz: PD98059 ist ein Inhibitor von MEK1 (*mitogen/ extracellular signal-*

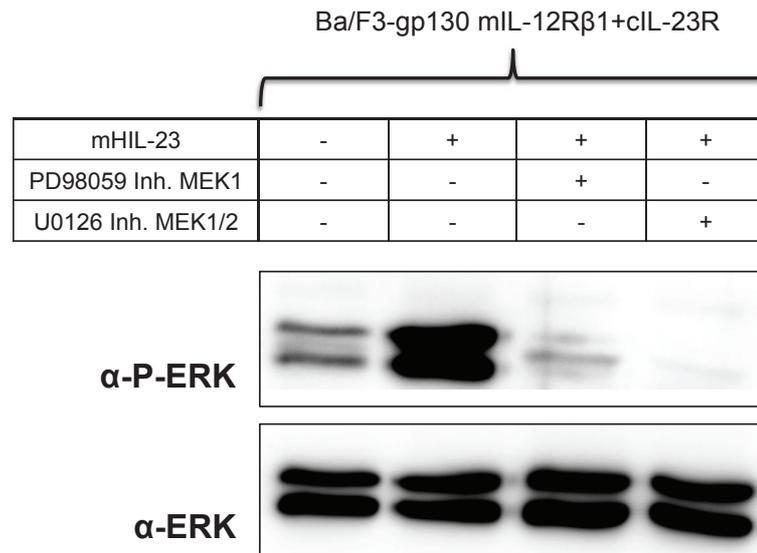


Abb. 3.26: Aktivierung von ERK durch IL-23

Ba/F3-gp130 Zellen mit dem mIL-12R β 1 und dem cIL-23R wurde mit PBS gewaschen und auf vier Versuchsansätze verteilt. Ein Teil der Zellen blieb unstimuliert, die übrigen drei Versuchsansätze wurden 30 min mit mHIL-23 stimuliert. Davon wurde zu einem Ansatz MEK Inhibitor PD98059 und zu einem Ansatz U0126 mit je einer Konzentration von 20 μ M (in DMSO) hinzugegeben. Zelllysate wurde hergestellt und mittels Western Blot unter Verwendung von α -P-ERK und α -ERK Antikörper analysiert.

regulated kinase, MAP-Kinase-Kinase) und U0126 von MEK1/2. Die Inhibitoren wurden mit einer Konzentration von 20 μ M eingesetzt. Da ERK *downstream* von MEK1/2 in der MAPK-Kaskade zu finden ist, kann der Einsatz der Inhibitoren die ERK Phosphorylierung unterdrücken. Das konnte auch hier gezeigt werden. Durch den gleichzeitigen Einsatz der MEK-Inhibitoren PD98059 oder U0126 wird eine Aktivierung von ERK, die durch Stimulation von mHIL-23 in den Ba/F3 Zellen ausgelöst werden kann, verhindert. Im Western Blot unter Verwendung des α -P-ERK Antikörpers ist keine Bande detektierbar (siehe Abb. 3.26). Eine Aktivierung des MAPK-Weges über den Rezeptorkomplex von IL-23 scheint demnach möglich zu sein (siehe Diskussion 4.1.4).

Diskussion

4.1 Signaltransduktion über den chimären IL-23 Rezeptor

4.1.1 Neues STAT3-Motiv im C-terminalen Teil des IL-23 Rezeptors

Die klassische, kanonische Aktivierung von STAT3 erfolgt über die Bindung an einen phosphorylierten Tyrosinrest innerhalb des Rezeptors. Dieser ist charakterisiert durch das Motiv pY-X-X-Q [156, 129]. STAT3 erkennt mit seiner SH2 Domäne diese Region und wird durch Bindung an das phosphorylierte Tyrosin aktiviert. Im phosphorylierten Zustand kann STAT3 als Homodimer in den Zellkern gelangen und dort die Expression der Zielgene beeinflussen. Für die Signaltransduktion von IL-23 ist die Aktivierung von STAT3 als wichtigste und stärkste Komponente beschrieben [19]. Mit dem Tyrosin 611 und den nachfolgenden drei Aminosäuren ist auch eine Region, die mit dem Motiv für die klassische Aktivierung von STAT3 übereinstimmt (Y⁶¹¹FPQ), im humanen IL-23R vorhanden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen aber, dass eine Mutation dieses Tyrosinrestes die STAT3 Phosphorylierung durch IL-23 nicht verhindert. Dies wurde ebenfalls für den murinen IL-23R (Y⁶²⁶FPQ) gezeigt [134]. Auch die Mutation von mehreren (bis zu vier der sieben Tyrosine innerhalb des IL-23R) führt zu keiner Veränderung der STAT3 Aktivierung in den generierten Ba/F3 und HeLa Zelllinien.

Dabei wurde im Rahmen der Arbeit das Augenmerk auf die weiteren Tyrosine gerichtet, die als mögliche Bindestellen für Signalmoleküle postuliert worden waren (siehe Kap. 1.4.2). Das Tyrosin Y397 ist als potentielle SHP2 Bindestelle für die STAT3 Aktivierung von Bedeutung [19] und liegt außerdem nahe der möglichen Jak2 Bindestelle [127]. Y484 ist als Bindestelle für STAT4 beschrieben [19] und Y463, welches nur im humanen IL-23R vorhanden ist, ähnelt mit der Sequenz Y⁴⁶³PQ dem klassischen STAT3 Bindemotiv (YXXQ). Die Tyrosine Y429, Y450 und Y476 befinden sich nicht in einer Aminosäuresequenz, die einem Bindemotiv für STAT3 ähnelt. Daher gilt es als unwahrscheinlich, dass sie an der Signaltransduktion

beteiligt sind.

Mutationsvarianten des cIL-23R wurden generiert, in denen mehrere Tyrosine zu Phenylalanin mutiert wurden. Zusammen mit dem mL-12R β 1 wurden diese dann in zwei verschiedene Zellsysteme eingebracht. Alle Mutationsvarianten zeigten sowohl in HeLa, als auch in BaF3 Zellen eine Aktivierung von STAT3 nach Stimulation mit IL-23. Sogar der cIL-23R, in dem alle vier Tyrosine mutiert wurden (Y397F/Y463F/Y484F/Y611F), die als Bindestellen für Signalmoleküle innerhalb des IL-23R postuliert wurden, zeigte keine Beeinträchtigung der STAT3 Phosphorylierung nach Stimulation mit IL-23 (siehe Abb. 3.17).

Eine quantitative Auswertung zu der Aktivierung von STAT3 ist durch die hier durchgeführten Western Blots allerdings nicht möglich. Eine Aussage inwieweit die STAT3 Phosphorylierung durch IL-23 nach Mutation der Tyrosine im IL-23R vermindert ist, kann demnach nicht getroffen werden. In den HeLa Zellen ist zudem auch im unstimulierten Zustand eine geringe STAT3-Aktivität zu erkennen, wodurch die Auswertung der Western Blots zusätzlich erschwert wird. Sicher bleibt aber, dass die Signalintensität von P-STAT3 in HeLa und Ba/F3 Zellen nach Stimulation mit IL-23, trotz Mutation der Tyrosine, ansteigt.

Erst die Deletion des Rezeptors (Δ 476) verhindert die STAT3 Aktivierung (siehe Abb. 3.18). Wir konnten damit eine Tyrosin-unabhängige, nicht-kanonische Aktivierung von STAT3 über den IL-23R nachweisen.

Für die Signaltransduktion über den murinen IL-23R konnte der Bereich schon weiter eingegrenzt werden. In dieser Arbeit wird der Unterschied zwischen den Deletionsvarianten Y416F/Y504F/Y542F/ Δ 554 und Y416F/Y504F/Y542F/ Δ 625 aufgezeigt. Die Rezeptorvariante Y416F/Y504F/Y542F/ Δ 554 zeigte in transduzierten BaF3 Zellen, unter Stimulation von IL-23, keine STAT3 Phosphorylierung und es wurde keine Proliferation der Zellen beobachtet (siehe Kap. 3.6.1). Die Zelllinien mit der Variante Y416F/Y504F/Y542F/ Δ 625 hingegen waren noch zu STAT3 Phosphorylierung und Proliferation durch Stimulation mit IL-23 fähig. Der Abschnitt in dem eine Tyrosin-unabhängige, nicht-kanonische Aktivierung von STAT3 stattfindet, wurde auf einen Abschnitt von 71 Aminosäuren (AS 554-624) innerhalb des murinen IL-23R eingegrenzt. Dies ist zusammenfassend in der Abb. 4.1 dargestellt. Obwohl diese Versuche zu weiteren Deletionsvarianten nur mit dem murinen IL-23R durchgeführt wurden, ist in Abb.4.1 dennoch auch die Aminosäuresequenz des humanen IL-23R dargestellt, deren Präsenz kritisch für die STAT3 Aktivierung ist. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche mit dem chimären IL-23R (humane ICD) sprechen dafür, dass beim Menschen ebenfalls in diesem Rezeptorbereich ein Bindemotiv für STAT3 vorhanden ist (siehe Kap. 4.2).

In weiteren Versuchen konnte dieser Bereich in der AG Scheller nun auf 17 Aminosäuren eingegrenzt werden [134] (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Deletion der Aminosäuren 554 bis 570 führt zum fast vollständigen Verschwinden von STAT3 Phosphorylierung nach IL-23-Stimulation von Ba/F3 Zellen im Western Blot. In FACS-Analysen konnte keine STAT3 Aktivierung in dieser Ba/F3 Zelllinie (Y416F/Y504F/Y542F/Y626F/ Δ 554-570) nachgewie-

IL-23R zu finden, liegt aber außerhalb des für die IL-23-abhängige STAT3 Aktivierung kritischen Aminosäurebereiches (murin 554 bis 570). Bisher wurde auch kein Signalweg erkannt, bei dem es über CK1 zu einer STAT3 Phosphorylierung kommt [134]. In der Literatur wird allerdings beschrieben, dass CK2 eine Rolle bei der STAT Aktivierung von Onkostatin M (OSM) spielt, welches wiederum Mitglied der IL-6 Familie ist [160].

Eine direkte Aktivierung von STAT3 wurde beispielsweise für die Interaktion einer Isoform des 14-3-3 Proteins (ζ) mit STAT3 beschrieben [161]. Die Verbindung ist nur möglich wenn der Serinrest 727 innerhalb von STAT3 im phosphorylierten Zustand vorliegt. Ob eine solche Interaktion über das Protein 14-3-3 ζ oder ähnliche Moleküle auch bei der Signaltransduktion über den IL-23R vorliegt, konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Die Möglichkeit der Phosphorylierung von STAT3 über den PI3K/Akt-Signalweg ([52], siehe 4.1.4) konnte ebenfalls widerlegt werden. Die Mutationsvariante mIL-23R Y416F/Y504F/Y542F/Y626F zeigte in Western Blots keine Aktivierung von PI3K/Akt, wohl aber eine Tyrosin-unabhängige Aktivierung von STAT3 (D. Floss, [134]).

Alle bisherigen Überlegungen führten zu keiner abschließenden Erklärung über den Mechanismus der nicht-kanonische STAT3 Aktivierung über den C-terminalen Bereich des IL-23R. Die Bedeutung des IL-12R β 1 an der IL-23-abhängigen Signaltransduktion wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Daher bleibt unklar, ob auch über diesen Weg eine Beeinflussung der STAT3 Phosphorylierung möglich ist.

4.1.2 Negatives Feedback durch Socs3 verhindert IL-23-abhängige STAT3 Langzeitaktivierung nicht

Socs-Proteine sind klassische Inhibitoren im Netzwerk der Zytokine. Sie sind wichtig für die negative Regulation einer Immunantwort [137]. Für die Signaltransduktion von IL-6 wurde die Beteiligung von Socs3 nachwiesen [1]. Diese ist essentiell für die Funktion von IL-6 und verhindert die Ansammlung von IL-6-abhängigem P-STAT3 bei der Aktivierung einer Entzündungsreaktion [154]. Ob auch für die Signaltransduktion von IL-23 eine negative Feedback-Schleife durch Socs3 oder einen anderen Inhibitor besteht, ist bisher unklar.

Chen und Kollegen postulierten 2006, dass Socs3 die Signaltransduktion von IL-23 negativ reguliert und so an der Entwicklung und Differenzierung von TH17 Zellen beteiligt ist [137]. In Versuchen mit Socs3-defizienten T-Zellen konnte, durch den Verlust von Socs3, eine erhöhte STAT3 Phosphorylierung nach Stimulation mit IL-23 nachgewiesen werden. Zudem wurde eine vermehrte Entwicklung und Differenzierung von TH17 Zellen beschrieben, gemessen an einer erhöhten Produktion von IL-17A [137]. Da die Entwicklung von TH17 Zellen aber unter anderem auch von IL-6-abhängig ist, beweist dies den Zusammenhang zwischen IL-23 und Socs3 nicht [134, 137].

In dieser Arbeit wurde in Western Blot Analysen mit HeLa Zellen (cIL-23R) und FACS-Analysen mit Ba/F3 Zelllinien (cIL-23R und mIL-23R) kein Abfall der STAT3 Phosphorylie-

zung nach Stimulation mit IL-23 über eine Zeit von bis zu 60 min festgestellt (siehe Kap. 3.4). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivierung von STAT3 durch IL-23 nicht durch Socs-Proteine unterdrückt werden kann. Diese negative Regulation wurde bisher vor allem bei der STAT3 Phosphorylierung durch IL-6 beobachtet. Im Vergleich zeigten Ba/F3-gp130 Zellen, die mit HIL-6 stimuliert wurden, nach 5-10 min ihre maximale STAT3 Aktivierung. Bis zu einer Stimulationszeit von 60 min fällt das Signal deutlich ab [134]. Dies zeigt sich in den durchgeführten Kinetikversuchen zur IL-23-abhängigen STAT3 Phosphorylierung nicht und auch de Paus und Kollegen 2008 beschrieben in FACS-Analysen eine Langzeitaktivierung von STAT3 durch IL-23 über 60 min in humanen T-Zell-Blasten [138].

Da die Hemmung der STAT3 Aktivierung durch Socs3 vor allem durch deren SH2 Domäne [162] und Bindung an Phosphotyrosine verläuft [163], könnte die identifizierte Tyrosin-unabhängige STAT3 Phosphorylierung eine Erklärung für das Fehlen der negativen *feed-back*-Schleife sein.

4.1.3 Bindung von Jak2 an den IL-23R

Jak2 ist ein wichtiges Protein bei der Signaltransduktion über den IL-23R [19]. Die Rezeptorsequenz zwischen I384 bis E398 im humanen bzw. I403 bis E417 im murinen IL-23R wurde als Bindestelle von Jak2 an den IL-23R postuliert und ist in verschiedenen Spezies konserviert [127]. Zellen, denen diese Aminosäuresequenz fehlt, sind nicht zu einer Aktivierung von STAT3 nach Stimulation mit IL-23 fähig und zeigen auch keine IL-23-abhängige Proliferation (D.Floss, *unpublished*). In der Arbeitsgruppe von Prof. Scheller konnte allerdings nachgewiesen werden, dass bei Co-Präzipitation eine Deletion dieser Aminosäuresequenz keine Auswirkung auf die Bindung von Jak2 an den IL-23R hat. Vielmehr konnte die Sequenz E455 bis E479 im mIL-23R als kritischer Bereich für die Assoziation von Jak2 an den IL-23R identifiziert werden (D.Floss, *unpublished*). Dennoch scheint der proximale Abschnitt des IL-23R von großer Bedeutung für die Aktivierung von Jak2 und essentiell für die IL-23-abhängige Signaltransduktion zu sein.

Die genetische Rezeptorvariante R381Q kommt als SNP in der Bevölkerung vor und wirkt sich protektiv bei Autoimmunerkrankungen wie M. Crohn aus ([140], siehe Kap. 1.4.3). In dieser Arbeit konnte eine reduzierte STAT3 Aktivierung durch die Mutation R381Q im cIL-23R nachgewiesen werden (siehe Kap. 3.5.1) und bestätigt damit die Arbeit von de Paus und Kollegen 2008 [138]. Die IL-23-abhängige Proliferation in Ba/F3-gp130 mIL-12R β 1 cIL-23R R381Q Zellen zeigte sich jedoch unverändert im Vergleich zum Wildtyp. Vermutet werden kann, dass die Konzentration an mHIL-23, mit der die Zellen stimuliert wurden, zu hoch war. Eine Versuchsreihe, in der die Ba/F3 Zellen mit geringeren Konzentrationen von mHIL-23 stimuliert werden, sollte durchgeführt werden.

Auch die funktionelle Auswirkung vom SNP R381Q im IL-23R wurde bereits beschrieben, indem eine reduzierte Produktion von IL-17 in TH17 Zellen mit der Mutation R381Q nach-

gewiesen werden konnte [141]. Das Arginin 381 liegt nahe der TM im N-terminalen Bereich der ICD des hIL-23R. Dabei befindet es sich weder innerhalb der postulierten Bindestelle von Jak2 (AS 384-398, [127]), noch in der Aminosäuresequenz, die mit Jak2 assoziiert ist (D. Floss, *unpublished*). Der genaue Mechanismus, inwieweit die Aktivierung von Jak2 von dem proximalen Bereich der intrazellulären Domäne des IL-23R abhängig ist, oder wie es sonst zu einer Abschwächung der IL-23-abhängigen Signaltransduktion *in vitro* und *in vivo* kommt, konnte aber bisher nicht geklärt werden.

Für die Signaltransduktion von IL-23 wurde, neben der Aktivierung des Jak-STAT-Weges über den IL-23R, auch eine Beteiligung von Tyk2 über den IL-12R β 1 beschrieben [18]. Das Box1-Motiv, welches sich im mIL-12R β 1 befindet, konnte als essentiell für die Aktivierung von STAT3 durch IL-23 identifiziert werden (Dissertation T. Klöcker). In dieser Arbeit wurde dies nicht weiter betrachtet. In welchem Maß auch die Signaltransduktion über den cIL-23R dadurch beeinflusst wird, bleibt unklar. Ein Einfluss auf die Ergebnisse zur IL-23-abhängigen Aktivierung von STAT3, sowie zur Zytokin-abhängigen Proliferation der Ba/F3 Zellen wäre denkbar.

4.1.4 Beteiligung von weiteren Signalwegen

Die Ergebnisse der Western Blot Analysen und Proliferationsassays mit den Mutations- und Deletionsvarianten des IL-23R weisen auf die Beteiligung weiterer Signalwege hin. Eine STAT3-unabhängige Proliferation der Ba/F3 Zellen unter Stimulation mit IL-23 konnte über die Rezeptorvarianten Δ 476 und Y463F/ Δ 476 nachgewiesen werden (siehe Kap. 3.5.3). Diese zeigten im Western Blot keine STAT3 Phosphorylierung nach Stimulation mit IL-23, wiesen aber keine Abschwächung der IL-23-abhängigen Proliferation auf.

Eine Mutation von Y397 verhindert die Proliferation der Deletionsvarianten (Y397F/Y463F/ Δ 476). Daraus folgt, dass dieses Tyrosin als Bindedomäne für Signalmoleküle und für die Aktivierung weiterer Signalwege relevant ist.

Die Signaltransduktion von IL-23 verläuft vor allem über die Aktivierung von STAT3 [19]. Aber auch andere Signalwege sind beteiligt. Dabei werden die Aktivierung von STAT1, 4, 5 [19], NF κ B und PI3K/Akt [52] durch IL-23 postuliert (siehe Kap.1.4.2). Abb. 4.2 gibt eine Übersicht über den Verlauf von möglichen Signalkaskaden über den IL-23R.

Versuche zur Phosphorylierung von STAT1 und STAT4 durch IL-23 wurden mit HeLa Zelllysaten durchgeführt. Eine Aktivierung von STAT4 durch Stimulation mit IL-23 konnte für transfizierte HeLa Zellen mit den Rezeptoren des murine Wildtyps (mIL-12R β 1 + mIL-23R), ebenso wie für den chimären Wildtyp (mIL-12R β 1 + cIL-23R), nachgewiesen werden. Allerdings zeigten die unstimulierten HeLa Zellen eine deutliche Hintergrundaktivität, wodurch die Aussagekraft gering wird. Die Western Blot mit P-STAT1-Antikörpern zeigten keine deutliche Signalsteigerung nach Stimulation mit mHIL-23 (Ergebnisse nicht dargestellt).

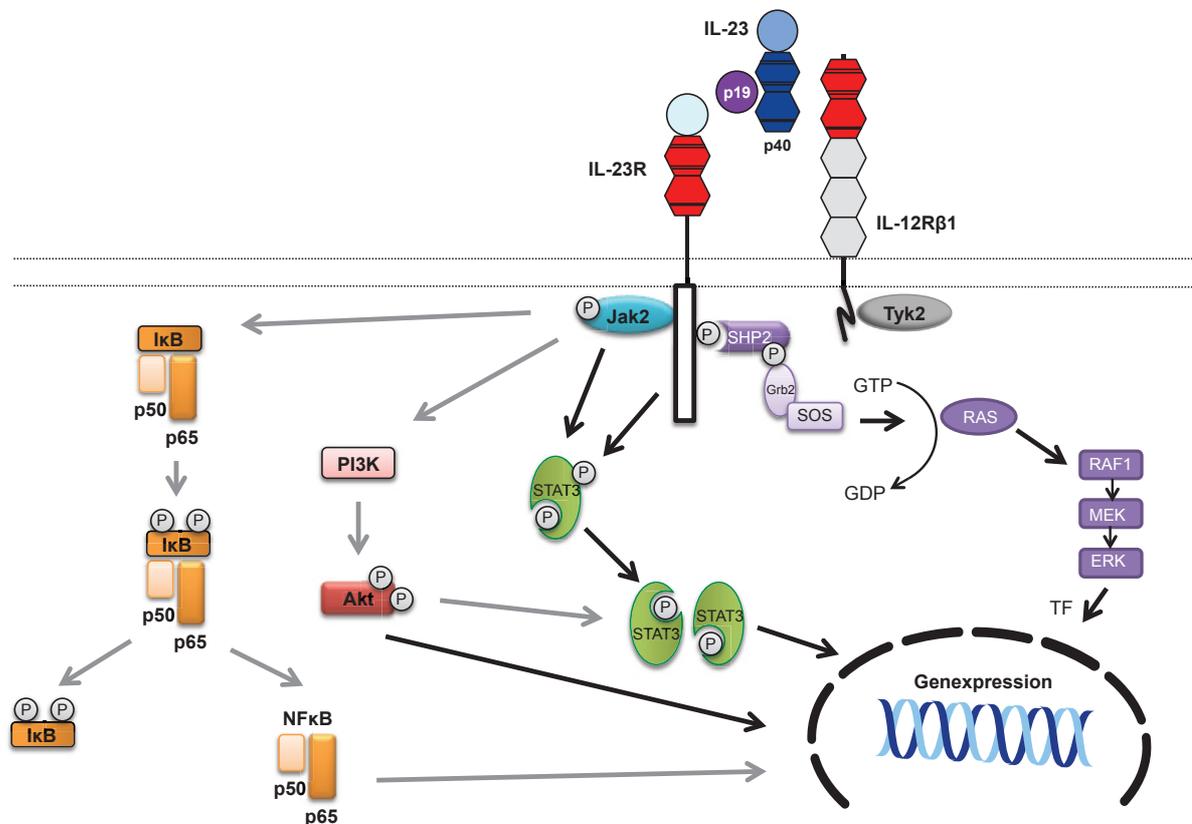


Abb. 4.2: Mögliche Signalwege über den IL-23R

Die Bindung von IL-23 an den heterodimeren Rezeptorkomplex, bestehend aus IL-12Rβ1 und IL-23R, führt zur Aktivierung verschiedener Signalmoleküle. Signalwege, die in der AG Scheller bestätigt oder gefunden wurden, sind durch schwarze Pfeile hervorgehoben, die weiteren postulierten Signalwege mit grauen Pfeilen versehen. Das zentrale Molekül der IL-23-abhängigen Signalweiterleitung ist STAT3, welches über Bindung an von Jak2 phosphorylierten Tyrosinen (Parham, 2002 [19]) und nicht-kanonisch über ein Bindemotiv im C-terminalen Bereich des IL-23R aktiviert werden kann. Über Jak2 können zudem IκB und PI3K aktiviert werden (Cho, 2006 [52]). Über PI3K/Akt kann wiederum STAT3 aktiviert werden (Cho, 2006 [52]). Unsere AG zeigte allerdings, dass die Aktivierung von PI3K/Akt auch STAT3-unabhängig Einfluss auf die zelluläre Genexpression nehmen kann (Floss, 2013 [134]). Das Tyrosin 397 ist als SHP2-Bindedomäne postuliert (Parham, 2002 [19]). Über dessen Phosphorylierung kann es zu einer Aktivierung von Grb2 (*growth factor receptor bound protein*) kommen und zur Auslösung der MAPK-Signalkaskade (Floss, 2013 [134]). Ebenfalls beteiligt an der IL-23-abhängigen Signaltransduktion ist der IL-12Rβ1 über Aktivierung der Tyrosin Kinase 2 (Tyk2) (AG Scheller, Dissertation T. Klöcker).

Über die Aktivierung von Jak2 durch IL-23 können, neben STAT-Molekülen, auch PI3K und NF- κ B phosphoryliert werden. Dies wurde von Cho und Kollegen 2006 durch den Einsatz von verschiedenen Inhibitoren in einem Mausmodell gezeigt. Der PI3K-Inhibitor LY294002, NF- κ B-Inhibitor PDTC und Jak2-Inhibitor AG490 verringerten die IL-23-induzierte IL-17 Expression in CD4+ T-Zellen. Außerdem konnte eine verringerte Phosphorylierung von PI3K/Akt durch den Einsatz von LY294002 und AG490 nach Aktivierung mit IL-23 nachgewiesen werden, sowie eine verringerte Phosphorylierung von I κ B α nach Einsatz von PDTC und AG490 [52].

In dieser Arbeit konnte die Aktivierung der MAPK-Kaskade durch IL-23 nachgewiesen werden. Im Western Blot mit Ba/F3-gp130 IL-12R β 1 IL-23R Zellen zeigte sich eine Phosphorylierung von ERK durch Stimulierung der Zellen mit mHIL-23. Außerdem konnte dieses P-ERK-Signal durch den Einsatz von zwei MEK-Inhibitoren (PD98059 und U0126) unterdrückt werden (siehe Kap. 3.7). Diese Ergebnisse stehen denen von Cho und Kollegen 2006 entgegen, deren Versuchsergebnisse keine Wirkung des MEK-Inhibitors PD98059 auf die IL-23-induzierte IL-17 Expression im Mausmodell nachweisen konnte [52].

Allerdings wurde im Rahmen dieser Arbeit die Beteiligung des MAPK-Signalweges an der Signaltransduktion von IL-23 nur durch Versuchen mit Ba/F3 Zellen nachgewiesen. Für eine größere Aussagekraft sollten Versuchen in mindestens einem zweiten Zellsystem folgen.

Für die Signaltransduktion von IL-6 ist eine Aktivierung der MAPK-Kaskade bereits beschrieben [135]. In der intrazellulären Domäne von gp130 wurde eine Aktivierung von SHP2 über das N-terminal gelegene Tyrosin 759 (murin Y757) beschrieben [156]. Durch die Bindung von SHP2 an ein Tyrosinmotiv wird es phosphoryliert [164]. Dadurch kann Grb2 (*growth factor receptor bound protein 2*) mit seiner SH2-Domäne binden, bildet einen Komplex mit dem *guanine nucleotide exchange factor* SOS und bewegt sich in Richtung Zellmembran. Die dadurch entstehende Nähe zum membrangebundenen G-Protein Ras führt zu einer Umwandlung von GDP zu GTP [135]. Die weitere MAPK-Kaskade kann dann, wie in Abb. 4.2 dargestellt, ablaufen. Analog zur Signaltransduktion von IL-6 ist die Bindung und Aktivierung von SHP2 an pY397 des humanen IL-23R und damit die Auslösung der MAPK-Kaskade denkbar. Die Frage, ob die STAT3-unabhängige Proliferation der Ba/F3 Zellen mit der Rezeptorvariante Y397F/ Y463F/ Δ 476 auf die Aktivierung von ERK zurückzuführen ist, oder ob weitere Signalmoleküle dafür nötig sind, kann nicht abschließend beantwortet werden.

4.2 Der murine und der humane IL-23 Rezeptor

4.2.1 Struktureller Vergleich

Die cDNA des murinen und des humanen IL-23R sind in der *GenBank database* unter der Zugangsnummer AF461422 (hIL-23R) und AF461423 (mIL-23R) hinterlegt. Die Aminosäuresequenzen, für die die cDNA kodiert, weisen eine Gleichheit von 66% und eine

Ähnlichkeit von 77% auf [19]. Im Alignment der Aminosäuresequenzen des murinen und des humanen IL-23R (Abb. 4.3) sind alle übereinstimmenden Aminosäuren gelb markiert. Die sieben Tyrosine, die in der ICD der Rezeptoren zu finden sind, sind lila dargestellt.

```

human  MNQVTIQWDAVIALYILFSWCHGGITNINCSGHIWVEPATIFKMGMNISICYQAAIKNCQ 60
murin  MSHLTQLQHLVIALYVLFRWCHGGITSINCSGDMWVEPGEIFQGMNVSICYQEAALKHCR 60
*.:*:*.*****:* *****.*****:****. **:****:***** *:*:
human  PRKLFYKNGIKERFQITRINKTTARLWYKNFLEPHASMYCTAECPKHFQETLICGKDIS 120
murin  PRNLIFYKNGFKEEFDITRINRTTARIWYKGFSEPHAYMHCTAECPGHFQETLICGKDIS 120
**:*:*****:*.*:*****:*****:***.* ***** *:***** *****
human  SGYPPIDEVTFCVIYEYSGNMTCTWNAGKLTIDTKYVVHVKSLETEEEQQYLTSSYIN 180
murin  SGHPPDAPSNLFCVIYEYSGNMTCTWNATGKPTYIDTKYIVHVKSLETEEEQQYLVASSYVK 180
**:*:*** *.:*****:*****:* *****:*****:*****:***:
human  ISTDSLQGGKYLWVVOAANALGMEESKQLQIHLDDIVIPSAAVISRAETINATVPKTI 240
murin  ISTDSLQSRKYLWVVOAVNSLGMENSQQLHVHLDDIVIPSAIISRAETINDTVPKTI 240
*****:*****.*:****:*:****:*****:***** * *****
human  YWDSQTTIEKVSCEMRYKATTNQTWNVKEFDNFTYVQQSEFYLEPNIKYVFQVRCQETG 300
murin  YWKSMTIEKVFCEMRYKTTNQTWSVKEFDANFTYVQQSEFYLEPDSKYVFQVRCQETG 300
**:*.* ***** *****:*****:*****:*****:*****:*****
human  -----KRYWQPWSSLFFHKTPETVPOVTSKAFQHDWTWNSGLTVAS 340
murin  KRNWQPWSSPFVHQTSQETGKRNWQPWSSPFVHQTSQTVSQVTAKS-SHEPQKMEMLSAT 359
** ***** *.:*:*:***:*. :.*:
human  ISTGHLTSDNRGDIGLLGLMIVFVAVMLSLISLIGIFNRSFRTGIKRRILLIPKWLVEDI 400
murin  IFRGHPASGNHQDIGLLSGMVFLAIMLPFISLIGIFNRSLSRIGIKRVLMLPKWLVEDI 419
* ** *.*: ***** *.:*:*:*****:* *****:*.*****
human  PNMKNSNVVKMLQENSELMNNSSEQVLYVDPMTIETKEIFIEPHKPTDYKKE-NTGPLE 459
murin  PNMENSNVAKLQEKSVFENDNASEQALYVDPVLTETSEISPLEHKPTDYKEERLTGLE 479
***:****.*:***.* :*:*:***.*****:*** ** *****:* ** **
human  TRDYEQNSLFDNTTVYIPDLNTGYKQVSNFLPEGSHLSNNEITSLTKPPVDSLDSG 519
murin  TRDCPLGLMSTSSVVYIPDLNTGYKQVSNVPPGGNLFINRDERDPTSLLETDDHF--- 536
*** * * :*****:*****:*.* * * :.*: * :
human  NNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELSLILNQGECSSPDIQNSVEEETMLLEND 579
murin  --ARLKTYPNFQFSASSMALLNKTLILDELCLVLNQGEFNSLDIKNSRQETSIVLQSD 594
*.:*:** **.*: *.:*:*:***.*****.* **:* * :*:*:***
human  PSETIPEQTLLPDEFVSLGIVNEELPSINTYFPQNI LESHFNRI SLEK 629
murin  PSETIPAQTLLSDEFVSLAIGNEDLPSINSYFPQNVLESHFSRISL FQR 644
***** *****.* **:*:***:*****:*****:*****:*****:

```

Abb. 4.3: Alignment der Aminosäuresequenz des murinen und humanen IL-23R

Identische Aminosäuren in der Sequenz des murinen und des humanen IL-23R sind gelb markiert und mit einem Sternchen (*) versehen, ähnliche Aminosäuren mit einem Doppelpunkt (:). Die Signalsequenz zu Beginn ist schwarz unterstrichen. Das WQPWS-Motiv ist in roter Schrift, die Transmembrandomäne blau, Arginin (R) 381/ 400 grün und die Tyrosine sind lila eingefärbt. Angrenzende Bindemotive sind unterstrichen.

Die Sequenz WQPWS, welche dem Zytokin-Bindemotiv WSXWS ähnelt, ist rot dargestellt. Im murinen Rezeptor kommt es zweimal vor (innerhalb einer 20 Aminosäuren Sequenz, die doppelt vorliegt [19]), im humanen IL-23R ist es einmal zu finden.

4.2.2 Vergleich der IL-23-abhängigen Signaltransduktion

Der chimäre IL-23R besteht aus der murinen ECD und TM, nur die ICD ist human. Diese Strategie führt zu einer guten Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen der Signaltransduktion über die humane ICD und der Signaltransduktion über die murine ICD des IL-23R. Abb. 4.4 gibt einen Überblick über die Versuchsergebnisse der relevanten Mutations- und Deletionsvarianten, die in gleicher Weise für den chimären IL-23R, wie auch für den murinen IL-23R (D. Floss) angefertigt wurden.

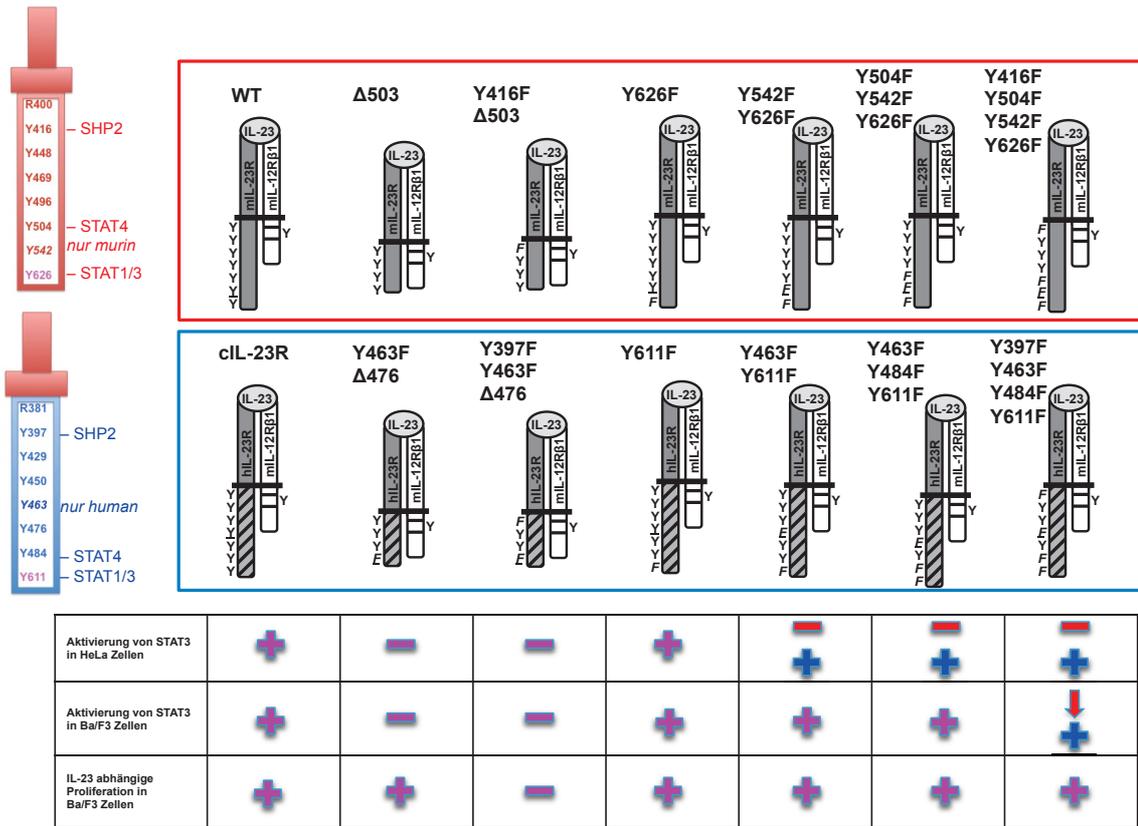


Abb. 4.4: Gegenüberstellung der Versuchsergebnisse zur Signaltransduktion über den cIL-23R und mIL-23R

Links sind in Rot die murinen und in Blau die humanen Anteile des IL-23R dargestellt. Zudem sind die postulierten Bindestellen für Signalmoleküle in der ICD eingezeichnet. Die Abbildung zeigt die Versuchsergebnisse zu ausgewählten Mutations- und Deletionsvarianten des murinen und chimären IL-23R. Ein lila + oder - bedeutet Übereinstimmung der Ergebnisse, bei Unterschieden ist murin durch rote und human durch blaue Farbe gekennzeichnet. Verglichen werden die STAT3 Aktivierung in HeLa und Ba/F3 Zellen in Western Blot Analysen, sowie die IL-23-abhängige Proliferation [134].

In großen Teilen stimmen die Versuchsergebnisse der Rezeptoren in den beiden Zellsystemen (transient transfizierten HeLa Zellen und der stabil transduzierten Ba/F3 Zellen) überein. Die Mutation der postulierten STAT3 Bindestelle (mY626, hY611) führt sowohl in der humanen, als auch in der murinen ICD nicht zu einer Verringerung der STAT3 Aktivierung in HeLa, sowie in Ba/F3 Zellen (siehe Abb. 4.4 (+)). Erst die Deletion des C-terminalen Rezeptorabschnitts (mΔ503, hΔ476) führt zu einer Abnahme der STAT3 Phosphorylierung (siehe Abb. 4.4 (-)). Ebenfalls übereinstimmend konnte nachgewiesen werden, dass die Proliferation der Ba/F3 Zellen erst durch Mutation des N-terminal gelegenen Tyrosinrestes (mY416, hY397) verhindert wird.

Unterschiede zeigten sich bei der Analyse der Mutationsvarianten, in denen mehrere Ty-

rosine mutiert worden waren. Im chimären IL-23R zeigte sich keine Abnahme der IL-23-abhängigen STAT3 Aktivierung durch Mutation der Tyrosine. Bei dem murinen IL-23R hingegen führte die Mutation von Y542 zu einer deutlichen Abnahme der STAT3 Aktivierung in den HeLa Zellen. Über das Tyrosin 542, welches im humanen Rezeptor nicht konserviert ist, konnte demnach eine STAT3 Aktivierung nachgewiesen werden [134]. Die Aminosäuresequenz Y⁵⁴²PNFQ weist zudem Ähnlichkeit mit dem STAT3-Bindemotiv Y-X-X-Q auf [156, 129]. In der humanen ICD ist dieses Motiv nicht vorhanden (HPNFA). Das Tyrosin Y463, welches ausschließlich im humanen Rezeptor zu finden ist, weist mit der Sequenz Y⁴⁶³PQ ebenfalls Ähnlichkeit zum STAT3-Motiv auf. Allerdings wurde im Rahmen dieser Dissertation nachgewiesen, dass Y463 nicht relevant für die STAT3 Phosphorylierung ist. Die Mutation Y463F führt zu keiner Verringerung des STAT3-Signals. Weiteren Aufschluss zu der Frage, ob Y463 an der STAT3-Aktivierung beteiligt ist, ergab die Analyse der Deletionsvarianten (siehe Kap. 3.5.3). Hier zeigte sich, dass der Tyrosinrest Y463 nicht an der Aktivierung von STAT3 beteiligt ist, da die Deletionsvariante $\Delta 476$ kein STAT3 Signal nach Stimulation mit IL-23 aufwies, obwohl in dieser Variante des cIL-23R sowohl Y463, als auch Y397 unverändert waren.

Wie in Abb. 4.4 gezeigt, konnte keine STAT3 Aktivierung in den co-transfizierten HeLa Zellen der mehrfach mutierten Rezeptorvarianten des mIL-23R, nach Stimulation mit IL-23, nachgewiesen werden. In den Ba/F3 Zellen, die mit den jeweiligen Mutationsvarianten transduziert worden waren, zeigte sich jedoch weiterhin eine IL-23-abhängige STAT3 Aktivierung. Am ehesten kann vermutet werden, dass in den HeLa Zellen nur ein sehr geringes P-STAT3 Signal vorhanden ist, welches auch nach wiederholten Versuchen nicht detektiert werden konnte (D. Floss). Diese Abschwächung des STAT3-Signals könnte auf der Mutation Y542F beruhen. Dieses Tyrosin ist nur im murinen IL-23R vorhanden und an der Aktivierung von STAT3 beteiligt (s.o.).

Die Ergebnisse der IL-23-abhängigen Proliferation in Ba/F3 Zellen der murinen und chimären Rezeptorvarianten stimmen überein. Nur die Deletionsvariante, bei der auch der N-terminal gelegene Tyrosinrest mutiert worden war, mY416F/ $\Delta 503$ und cY397F/Y463F/ $\Delta 476$, zeigte keine Proliferation der Ba/F3 Zellen nach Stimulation mit mHIL-23.

4.3 Ausblick

Diese Arbeit zeigt neue Aspekte der Signaltransduktion über die ICD des hIL-23R *in vitro*. Anhand von Experimenten in zwei verschiedenen Zellsystemen, HeLa und Ba/F3 Zellen, konnten neue Erkenntnisse gewonnen werden. Viele Fragen bleiben allerdings noch offen. Es gibt eine Tyrosin-unabhängige, nicht-kanonische Aktivierung von STAT3 über den IL-23R. Wie genau diese funktioniert, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Im murinen IL-23R wurde in der ICD ein Abschnitt von 17 Aminosäuren eingegrenzt, über den eine Phosphorylierung von STAT3 stattfindet. Bisher konnte noch kein Mechanismus identifiziert werden, der für diese untypische Aktivierung von STAT3 verantwortlich ist. Versuche zu möglichen Interaktionspartnern und Bindemolekülen mit dem IL-23R führten bisher zu keinem abschließenden Ergebnis. Auch die Frage, wie stark die Aktivierung von STAT3 über das nicht-kanonische Bindemotiv ist und ob dies für die zelluläre Wirkung von IL-23 von Bedeutung ist, kann durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche nicht beantwortet werden. Weitere Versuche zum murinen, wie auch zum humanen IL-23R sollen folgen, um die intrazellulären Vorgänge bei der Signalweiterleitung von IL-23 nachvollziehen zu können.

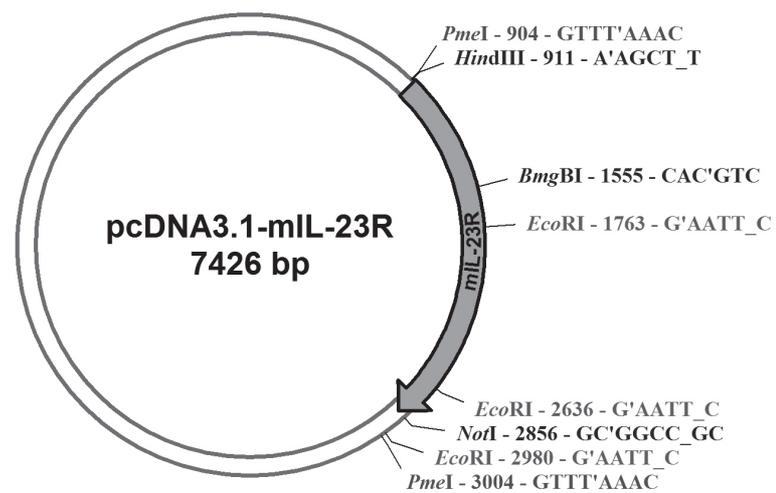
Mit Sicherheit konnte nachgewiesen werden, dass neben dem Jak-STAT Weg weitere Signalmoleküle durch IL-23 aktiviert werden. Obwohl dies in der Literatur bisher nicht beschrieben ist, konnte die Aktivierung des MAPK-Weges durch IL-23 über den cIL-23R nachgewiesen werden. Inwieweit diese neuen Erkenntnisse über die Signaltransduktion von IL-23 auch *in vivo* für die Differenzierung von TH17 Zellen relevant sind, ist bisher nicht bekannt. Tierversuche mit IL-23R-*knock-out* Mäusen sind in der AG Scheller geplant und sollen weiteren Aufschluss über die funktionelle Bedeutung von IL-23 im Immunsystem geben.

Monoklonale Antikörper gegen IL-23 werden schon jetzt bei der Behandlung von Psoriasis Patienten eingesetzt. Ob ihr Einsatz auch bei anderen Autoimmunerkrankungen möglich ist, ist derzeit noch Gegenstand der Forschung. Auch der IL-23R und die einzelnen Bestandteile der Signaltransduktion können Angriffsziele einer sehr spezifischen Immunsuppression werden, wofür das Verständnis zur Signaltransduktion über die intrazelluläre Domäne des IL-23R essentiell ist.

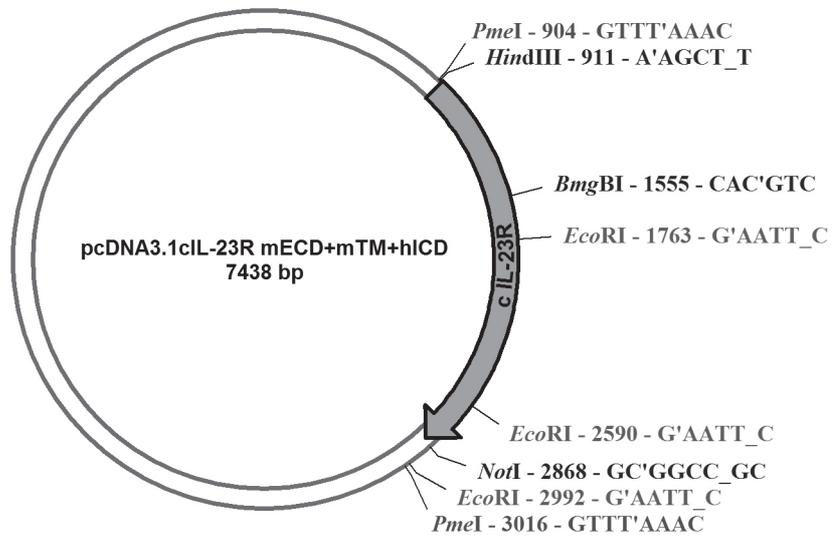
Anhang

5.1 Plasmidkarten

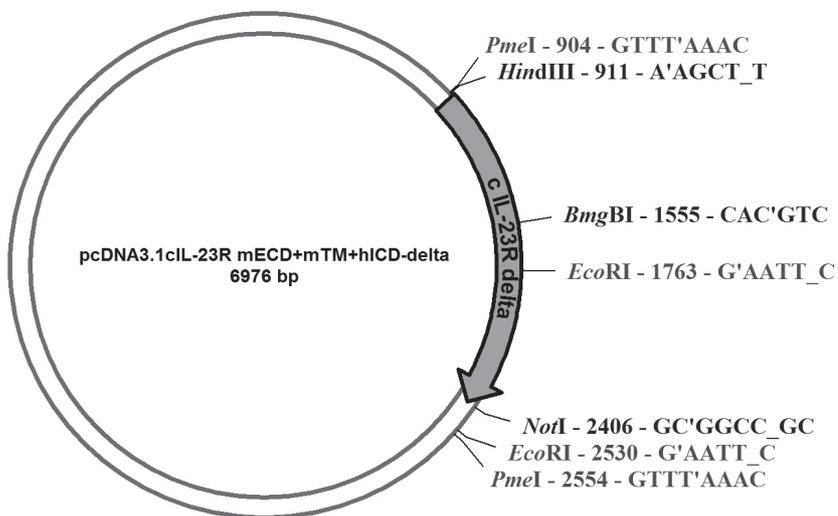
pcDNA3.1 mL-23R



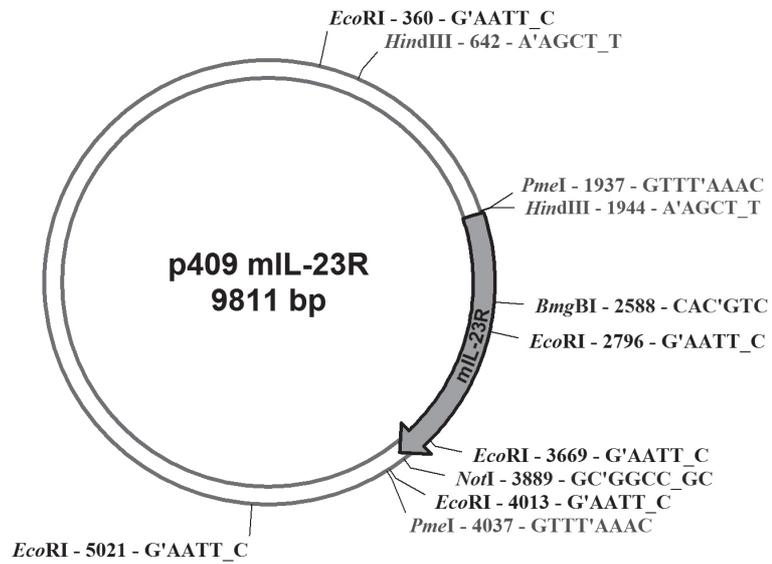
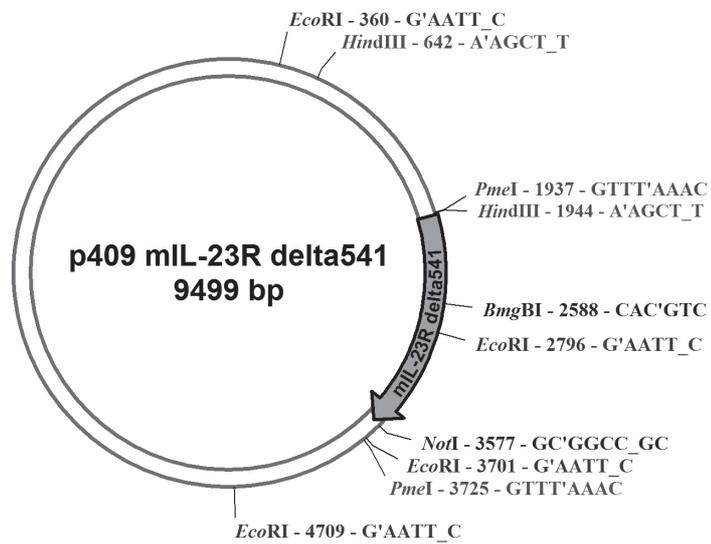
pcDNA3.1 cIL-23R, Mutationsvarianten

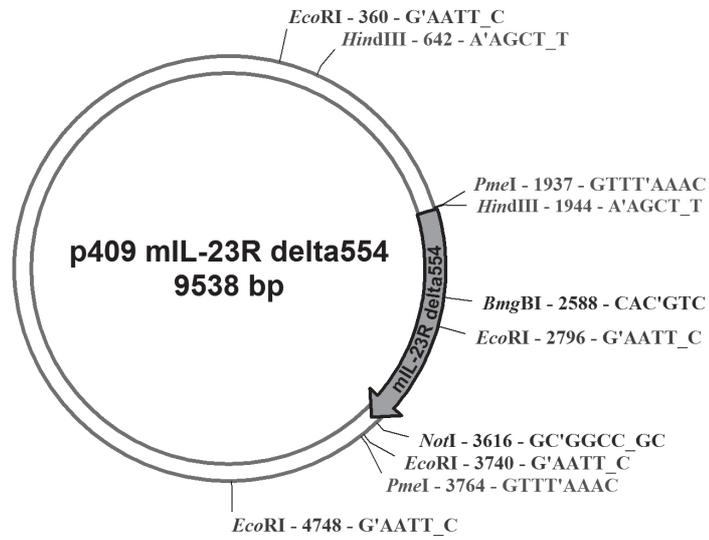
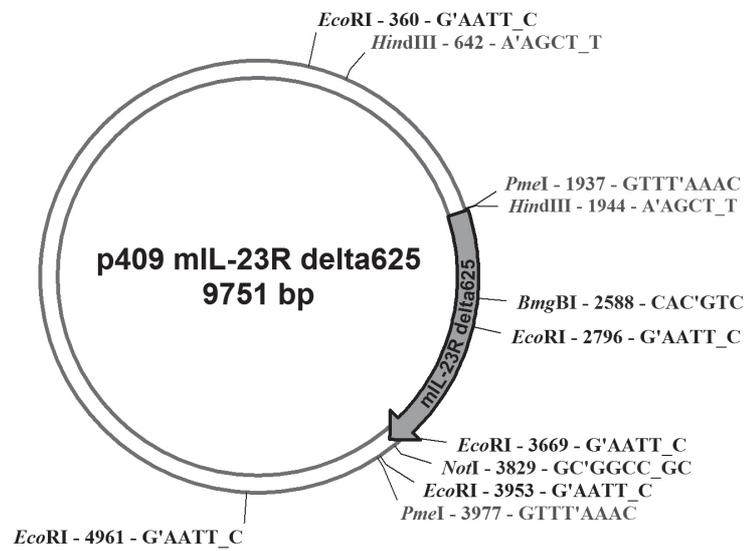


pcDNA3.1 cIL-23R, Deletionsvarianten



p409 mL-23R

p409 mL-23R Deletionsvariante Δ 541

p409 mIL-23R Deletionsvariante $\Delta 554$ p409 mIL-23R Deletionsvariante $\Delta 625$ 

5.2 Basen- und Aminosäuresequenz des chimären IL-23R

HindIII

PmeI AflIII

901 GTTTAAACTT AAGCTTGCCA CCATGAGTCA CCTCACACTT CAGCTGCATG
CAAATTTGAA TTCGAACGGT GGTACTCAGT GGAGTGTGAA GTCGACGTAC
F K L K L A T M S H L T L Q L H V

951 TGGTGATAGC CCTTTATGTG CTCTCAGAT GGTGTCACGG AGGAATCACA
ACCACTATCG GGAATACAC GAGAAGTCTA CCACAGTGCC TCCTTAGTGT
V I A L Y V L F R W C H G G I T

1001 AGTATAAACT GCTCTGGTGA CATGTGGGTT GAGCCTGGTG AAATTTTCA
TCATATTTGA CGAGACCACT GTACACCCAA CTCGGACCAC TTTAAAAAGT
S I N C S G D M W V E P G E I F Q
AflIII

1051 GATGGGCATG AATGTTTCTA TATATTGCCA AGAAGCCCTT AAGCACTGCC
CTACCCGTAC TTACAAAGAT ATATAACGGT TCTTCGGGAA TFCGTGACGG
M G M N V S I Y C Q E A L K H C R
EcoR

1101 GACCAAGGAA TCTTTACTTT TATAAAAATG GCTTCAAAGA AGAATTTGAT
CTGGTTCCTT AGAAATGAAA ATATTTTAC CGAAGTTTCT TCTTAAACTA
P R N L Y F Y K N G F K E E F D

1151 ATCACAAGGA TTAATAGAAC AACAGCTCGG ATTTGGTATA AAGCCTTTTC
TAGTGTTCCT AATTATCTTG TTGTCGAGCC TAAACCATAT TTCGAAAAG
I T R I N R T T A R I W Y K G F S

1201 GGAACCTCAT GCCTATATGC ATTGCACTGC TGAATGTCCT GGTCAATTTTC
CCTTGGAGTA CGGATATACG TAACGTGACG ACTTACAGGA CCAGTAAAAG
E P H A Y M H C T A E C P G H F Q

1251 AAGAGACACT GATTTGTGGG AAAGACATTT CCTCTGGACA TCCACCGGAT
TTCTCTGTGA CTAACACCCC TTTCTGTAAA GGAGACCTGT AGGTGGCCTA
E T L I C G K D I S S G H P P D

1301 GCCCCAGCA ATCTGACATG TGTCAATTTAT GAATACTCAG GCAACATGAC
CGGGGTCGT TAGACTGTAC ACAGTAAATA CTTATGAGTC CGTTGTACTG
A P S N L T C V I Y E Y S G N M T

1351 ATGCACCTGG AACACTGGGA AGCCTACCTA CATAGATACC AAGTATATTTG
TACGTGGACC TTGTGACCCT TCGGATGGAT GTATCTATGG TTCATATAAC
C T W N T G K P T Y I D T K Y I V

1401 TGCATGTGAA GAGTTTGGAG ACAGAAGAAG AACACAATA TCTTGCCTCA
ACGTACACTT CTCAAACCTC TGTCTTCTTC TTGTTGTTAT AGAACGGAGT
H V K S L E T E E E Q Q Y L A S

1451 AGCTATGTTA AGATCTCCAC TGACTCACTG CAAGGCAGCA GGAAGTATTT
TCGATACAAT TCTAGAGGTG ACTGAGTGAC GTTCCGTCGT CCTTCATAAA
S Y V K I S T D S L Q G S R K Y L

1501 GGTATGGGTC CAAGCTGTCA ATTCCCTAGG CATGGAGAAC TCACAACAAC
CCATACCCAG GTTCGACAGT TAAGGGATCC GTACCTCTTG AGTGTGTTG
V W V Q A V N S L G M E N S Q Q L

1551 TACACGTCCA TCTGGATGAT ATAGTGATAC CTTCTGCGTC CATCATTTCC
ATGTGCAGGT AGACCTACTA TATCACTATG GAAGACGACG GTAGTAAAGG
H V H L D D I V I P S A S I I S

1601 AGGGCTGAGA CTACAAACGA TACTGTACCC AAGACCATAG TTTACTGGAA
TCCCCTCT GATGTTTGCT ATGACATGGG TTCTGGTATC AAATGACCTT
R A E T T N D T V P K T I V Y W K

5.2 Basen- und Aminosäuresequenz des chimären IL-23R

```
1651 AAGCAAACCT ATGATTGAGA AAGTATTCTG TGAGATGAGA TACAAAACAA
TTCGTTTGA TACTAACTCT TTCATAAGAC ACTCTACTCT ATGTTTTGTT
S K T M I E K V F C E M R Y K T T

1701 CAACAAACCA AACGTGGAGT GTTAAAGAAT TTGACGCCAA TTTCACATAT
GTTGTTTGGT TTGCACCTCA CAATTCTTA AACTGCGGTT AAAGTGATATA
T N Q T W S V K E F D A N F T Y
EcoRI

1751 GTACAGCAGT CAGAATTCTA CCTGGAGCCA GACAGCAAGT ATGTATTCTA
CATGTCGTCA GTCTTAAGAT GGACCTCGGT CTGTCGTCA TACATAAAGT
V Q Q S E F Y L E P D S K Y V F Q

1801 AGTGCATGT CAAGAACTG GTAAAAGAAA CTGGCAGCCT TGGAGTTCCC
TCACGCTACA GTTCTTTGAC CATTTCCTTT GACCGTCGGA ACCTCAAGGG
V R C Q E T G K R N W Q P W S S P
BstXI

1851 CCTTTGTCCA CCAAACCTCC CAAGAACTG GTAAAAGAAA CTGGCAGCCT
GGAAACAGGT GGTTTGAAGG GTTCTTTGAC CATTTCCTTT GACCGTCGGA
F V H Q T S Q E T G K R N W Q P

1901 TGGAGTTCCC CCTTTGTCCA CCAAACCTCC CAGACAGTTT CCCAGGTTAC
ACCTCAAGGG GGAACAGGT GGTTTGAAGG GTCTGTCAA GGTCCAATG
W S S P F V H Q T S Q T V S Q V T

1951 AGCAAATCA TCCCACGAAC CTCAGAAGAT GGAGATGCTC AGTGCTACAA
TCGTTTATG AGGGTGCTTG GAGTCTCTA CCTCTACGAG TCACGATGTT
A K S S H E P Q K M E M L S A T I
EcoNI

2001 TCTTCAGAG ACATCCTGCT TCAGGTAATC ATCAAGACAT TGGACTTTG
AGAAGTCTCC TGTAGGACGA AGTCCATTAG TAGTTCTGTA ACCTGAAAAC
F R G H P A S G N H Q D I G L L

2051 TCGGGAATGG TCTTCTGGC CATCATGTTG CCGATTTTTT CTCTGATTGG
AGCCCTTACC AGAAGAACCG GTAGTACAAC GGCTAAAAAA GAGACTAACC
S G M V F L A I M L P I F S L I G

2101 GATATTTAAC AGATCATTCC GAACTGGGAT TAAAAGAAGG ATCTTATTGT
CTATAAATG TCTAGTAAG CTGACCCCTA ATTTTCTTCC TAGAATAACA
I F N R S F R T G I K R R I L L L

2151 TAATACCAA GTGGCTTTAT GAAGATATTC CTAATATGAA AAACAGCAAT
ATTATGGTTT CACCGAAATA CTCTATAAG GATTATACTT TTTGTCGTTA
I P K W L Y E D I P N M K N S N

2201 GTTGTGAAA TGCTACAGGA AAATAGTGAA CTTATGAATA ATAATCCAG
CAACACTTTT ACGATGTCCT TTTATCACTT GAATACTTAT TATTAAGGTC
V V K M L Q E N S E L M N N N S S

2251 TGAGCAGGTC CTATATGTTG ATCCCATGAT TACAGAGATA AAAGAAATCT
ACTCGTCCAG GATATACAAC TAGGGTACTA ATGTCCTCTAT TTTCTTTAGA
E Q V L Y V D P M I T E I K E I F

2301 TCATCCCAGA ACACAAGCCT ACAGACTACA AGAAGGAGAA TACAGGACCC
AGTAGGGTCT TGTGTTCCGA TGTCTGATGT TCTTCCTCTT ATGTCCTGGG
I P E H K P T D Y K K E N T G P

2351 CTGGAGACAA GAGACTACCC GCAAACTCG CTATTCGACA ATACTACAGT
GACCTCTGTT CTCTGATGG CGTTTGTGAG GATAAGCTGT TATGATGCA
L E T R D Y P Q N S L F D N T T V
```

5.2 Basen- und Aminosäuresequenz des chimären IL-23R

```

2401 TGTATATATT CCTGATCTCA ACACTGGATA TAAACCCCAA ATTTCAAATT
ACATAATATAA GGACTAGAGT TGTGACCTAT ATTTGGGGTT TAAAGTTTAA
V Y I P D L N T G Y K P Q I S N F

2451 TTCTGCCTGA GGAAGCCAT CTCAGCAATA ATAATGAAAT TACTTCCTTA
AAGACGGACT CCCTTCGGTA GAGTCGTAT TATTACTTTA ATGAAGGAAT
L P E G S H L S N N N E I T S L

2501 ACACTTAAAC CACCAGTTGA TTCCTTAGAC TCAGGAAATA ATCCCAGGT
TGTGAATTTG GTGGTCAACT AAGGAATCTG AGTCCTTTAT TAGGGTCCAA
T L K P P V D S L D S G N N P R L
EcoRI

2551 ACAAAGCAT CTAATTTTG CTTTTTCTGT TTCAGTGTG AATTCATAA
TGTTTTCGTA GGATTAAGAC GAAAAGACA AAGTTCACAC TTAAGTGATT
Q K H P N F A F S V S S V N S L S

2601 GCAACACAAT ATTTCTTGGG GAATTAAGCC TCATATTAAA TCAAGGAGAA
CGTTGTGTTA TAAAGAACCT CTTAATTCGG AGTATAATTT AGTTCCTCTT
N T I F L G E L S L I L N Q G E
BstXI

2651 TGCAGTTCTC CTGACATACA AAACCTAGTA GAGGAGGAAA CCACCATGCT
ACGTCAAGAG GACTGTATGT TTTGAGTCAT CTCTCCTTTT GGTGGTACGA
C S S P D I Q N S V E E E T T M L

2701 TTTGAAAAT GATTCACCCA GTGAACTAT TCCAGAACAG ACCCTGCTTC
AAACCTTTTA CTAAGTGGGT CACTTTGATA AGGTCTTGTC TGGGACGAAG
L E N D S P S E T I P E Q T L L P

2751 CTGATGAATT TGTCTCCTGT TTGGGGATCG TGAATGAGGA GTTGCCATCT
GACTACTTAA ACAGAGGACA AACCCCTAGC ACTTACTCCT CAACGGTAGA
D E F V S C L G I V N E E L P S

2801 ATTAATACTT ATTTTCCACA AAATATTTTG GAAAGCCACT TCAATAGGAT
TAATTATGAA TAAAAGGTGT TTTATAAAC CTTTCGGTGA AGTTATCCFA
I N T Y F P Q N I L E S H F N R I
NotI

2851 TTCACTCTTG GAAAAGGCGG CCGCAGAACA AAAACTCATC TCAGAAGAGG
AAGTGAGAAC CTTTCCGCC GGCCTCTGT TTTTGTAGTAG AGTCTTCTCC
S L L E K A A A E Q K L I S E E D

2901 ATCTGAATGG GGCCGTCGAG CACCACCACC ACCACCACTG AGATCCGGCT
TAGACTTACC CCGGCAGCTC GTGGTGGTGG TGGTGGTGAC TCTAGGCCGA
L N G A V E H H H H H H * D P A
BamHI BstXI EcoRI

2951 GCTAACAAAG CCCGAAAGGG ATCCACTAGT CCAGTGTGGT GGAATTCGAG
CGATTGTTTC GGGCTTTCCC TAGGTGATCA GGTACACCA CCTTAAGCTC
A N K A R K G S T S P V W W N S S

XbaI ApaI PmeI
3001 TCTAGAGGC CCGTTTAAAC CCGTGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG
AGATCTCCCG GGCAAATTTG GCGACTAGT CCGAGCTGAC ACGGAAGATC
L E G P F K P A D Q P R L C L L V

```

Abb. 5.1: Basen- und Aminosäuresequenz des chimären IL-23R

Der kodierende Bereich ist für die extrazelluläre Domäne grün, für die Transmembrandomäne rot und für die intrazelluläre Domäne blau eingefärbt. Die Tyrosinreste und das dazu gehörige Basetriplett ist orange markiert. Einige Restriktionsenzyme sind an ihren Schnittstellen ergänzt.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Strukturelle Ähnlichkeit der Zytokine der IL-12 Familie und IL-6, sowie ihrer Rezeptoren	3
1.2	Molekulare Struktur von IL-23	6
1.3	Differenzierung zu T-Helferzellen 17 durch IL-23	7
1.4	Wirkungen von IL-23	10
1.5	Schematische Darstellung des Rezeptorkomplexes von Interleukin-23	14
3.1	Schematischer Überblick der IL-23R Chimären	45
3.2	SOE-PCR zur Klonierung der chimären IL-23 Rezeptoren	46
3.3	Ligation der chimären IL-23R cDNA in den Vektor pcDNA3.1	47
3.4	Ligation des chimären IL-23R in den Vektor p409 und pMOWS-puro-GFP	47
3.5	Expressionskassette des murinen, humanen und chimären IL-23R	48
3.6	Funktionelle Analyse der IL-23R-Chimären im Western Blot	49
3.7	Übersicht der erzeugten Rezeptorvarianten des cIL-23R	50
3.8	Restriktionsanalyse der klonierten Expressionsvektoren für cIL-23R-Varianten	51
3.9	Nachweis der rekombinanten cIL-23R-Varianten in COS 7 Zellen	52
3.10	Zytokin-abhängige Proliferation von Ba/F3 Zellen	53
3.11	Analyse der Transkripte aus generierten Ba/F3 Zelllinien mit cIL-23R-Varianten	54
3.12	Nachweis der Rezeptoren auf der Zelloberfläche mittels FACS-Analysen	55
3.13	Kinetik der IL-23-induzierten STAT3 Aktivierung im Western Blot	56
3.14	Kinetik der IL-23-induzierten STAT3 Aktivierung in FACS-Analyse	57
3.15	Western Blot mit HeLa und Ba/F3 Zelllysaten mit cIL-23R R381Q	59
3.16	R381Q verhindert die IL-23-abhängige Proliferation von Ba/F3 Zellen nicht	60
3.17	Western Blot mit HeLa und Ba/F3 Zelllysaten der Mutationsvarianten des cIL-23R	62
3.18	Western Blot mit HeLa und Ba/F3 Zelllysaten der Deletionsvarianten	64
3.19	IL-23-abhängige Proliferation der Ba/F3-gp130 Zelllinien mit cIL-23R-Varianten	65
3.20	Zusammenfassung der Ergebnisse zu den cIL-23R-Varianten	66

3.21 Schematische Darstellung des cIL-23R, des mLIL-23R und der Muatationsvariante Y416F/Y504F/Y542F/Y626F des mLIL-23R	68
3.22 Restriktionsanalyse der klonierten Expressionsvektoren der Deletionsvarianten des mLIL-23R	69
3.23 Nachweis der Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Ba/F3 Zellen mittels FACS-Analysen	69
3.24 STAT3 Aktivierung durch IL-23 in den Deletionsvarianten des mLIL-23R	70
3.25 IL-23-abhängige Proliferation der mLIL-23R-Deletionsvarianten	71
3.26 Aktivierung von ERK durch IL-23	72
4.1 Nicht-kanonische STAT3 Aktivierung im C-terminalen Bereich des IL-23R	75
4.2 Mögliche Signalwege über den IL-23R	79
4.3 Alignment der Aminosäuresequenz des murinen und humanen IL-23R	81
4.4 Gegenüberstellung der Versuchsergebnisse zur Signaltransduktion über den cIL-23R und mLIL-23R	82
5.1 Aminosäuresequenz des chimären IL-23R	91

Tabellenverzeichnis

1.1	Intrazelluläre Domäne des IL-23R	17
2.1	Chemikalien	21
2.2	Antibiotika	22
2.3	Auflistung der verwendeten Oligonukleotide	23
2.4	Primärantikörper	26
2.5	Sekundärantikörper	27

Literaturverzeichnis

- [1] P C HEINRICH, I BEHRMANN, G MÜLLER-NEWEN, F SCHAPER und L GRAEVE: Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 (Pt 2) (1998), 297–314.
- [2] J SCHELLER, A CHALARIS, D SCHMIDT-ARRAS und S ROSE-JOHN: The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 1813, Nr. 5 (2011), 878–888.
- [3] J F BAZAN: Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, Nr. 18 (1990), 6934–6938.
- [4] W J LEONARD und J J O'SHEA: Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 16 (1998), 293–322.
- [5] Y FUJITANI, M HIBI, T FUKADA, M TAKAHASHI-TEZUKA, H YOSHIDA, T YAMAGUCHI, K SUGIYAMA, Y YAMANAKA, K NAKAJIMA und T HIRANO: An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene* 14, Nr. 7 (1997), 751–761.
- [6] C M HORVATH und J E DARNELL: The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr Opin Cell Biol* 9, Nr. 2 (1997), 233–239.
- [7] M F NOLD, C A NOLD-PETRY, J A ZEPP, B E PALMER, P BUFLER und C A DINARELLO: IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol* 11, Nr. 11 (2010), 1014–1022.
- [8] D A VIGNALI und V K KUCHROO: IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol* 13, Nr. 8 (2012), 722–728.
- [9] L L JONES und D A VIGNALI: Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunol Res* 51, Nr. 1 (2011), 5–14.

- [10] M MURAKAMI, M HIBI, N NAKAGAWA, T NAKAGAWA, K YASUKAWA, K YAMANISHI, T TAGA und T KISHIMOTO: IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 260, Nr. 5115 (1993), 1808–1810.
- [11] J MÜLLBERG, K ALTHOFF, T JOSTOCK und S ROSE-JOHN: The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *Eur Cytokine Netw* 11, Nr. 1 (2000), 27–38.
- [12] V MATTHEWS, B SCHUSTER, S SCHÜTZE, I BUSSMEYER, A LUDWIG, C HUNDHAUSEN, T SADOWSKI, P SAFTIG, D HARTMANN, KARL-JOSEF KALLEN und S ROSE-JOHN: Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem* 278, Nr. 40 (2003), 38829–38839.
- [13] S DIMITROV, T LANGE, C BENEDICT, M A NOWELL, S A JONES, J SCHELLER, S ROSE-JOHN und J BORN: Sleep enhances IL-6 trans-signaling in humans. *FASEB J* 20, Nr. 12 (2006), 2174–2176.
- [14] C GARBERS, N JÄNNER, A CHALARIS, M L MOSS, D M FLOSS, D MEYER, F KOCH-NOLTE, S ROSE-JOHN und J SCHELLER: Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. *J Biol Chem* 286, Nr. 17 (2011), 14804–14811.
- [15] A CHALARIS, C GARBERS, B RABE, S ROSE-JOHN und J SCHELLER: The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol* 90, Nr. 6-7 (2011), 484–494.
- [16] R A KASTELEIN, C A HUNTER und D J CUA: Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 25 (2007), 221–242.
- [17] M KOBAYASHI, L FITZ, M RYAN, R M HEWICK, S C CLARK, S CHAN, R LOUDON, F SHERMAN, B PERUSSIA und G TRINCHIERI: Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 170, Nr. 3 (1989), 827–845.
- [18] J ZOU, D H PRESKY, C Y WU und U GUBLER: Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases. *J Biol Chem* 272, Nr. 9 (1997), 6073–6077.
- [19] C PARHAM, M CHIRICA, J TIMANS, E VAISBERG, M TRAVIS, J CHEUNG, S PFLANZ, R ZHANG, K P SINGH, F VEGA, W TO, J WAGNER, A M O'FARRELL, T MCCLANAHAN,

- S ZURAWSKI, C HANNUM, D GORMAN, D M RENNICK, R A KASTELEIN, R de WAAL MALEFYT und K W MOORE: A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* 168, Nr. 11 (2002), 5699–5708.
- [20] S PFLANZ, J C TIMANS, J CHEUNG, R ROSALES, H KANZLER, J GILBERT, L HIBBERT, T CHURAKOVA, M TRAVIS, E VAISBERG, W M BLUMENSCHNEIN, J D MATTSON, J L WAGNER, W TO, S ZURAWSKI, T K MCCLANAHAN, D M GORMAN, J F BAZAN, R de WAAL MALEFYT, D RENNICK und R A KASTELEIN: IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 16, Nr. 6 (2002), 779–790.
- [21] S PFLANZ, L HIBBERT, J MATTSON, R ROSALES, E VAISBERG, J F BAZAN, J H PHILLIPS, T K MCCLANAHAN, R de WAAL MALEFYT und R A KASTELEIN: WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 172, Nr. 4 (2004), 2225–2231.
- [22] C A SPRECHER, F J GRANT, J W BAUMGARTNER, S R PRESNELL, S K SCHRADER, T YAMAGIWA, T E WHITMORE, P J O'HARA und D F FOSTER: Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 246, Nr. 1 (1998), 82–90.
- [23] L W COLLISON, C J WORKMAN, T T KUO, K BOYD, Y WANG, K M VIGNALI, R CROSS, D SEHY, R S BLUMBERG und D A VIGNALI: The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, Nr. 7169 (2007), 566–569.
- [24] R-X WANG, C-R YU, I M DAMBUZA, R M MAHDI, M B DOLINSKA, Y V SERGEEV, P T WINGFIELD, S-H KIM und C E EGWUAGU: Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med* 20, Nr. 6 (2014), 633–641.
- [25] C GARBERS, H M HERMANN, F SCHAPER, G MÜLLER-NEUEN, J GRÖTZINGER, S ROSE-JOHN und J SCHELLER: Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 23, Nr. 3 (2012), 85–97.
- [26] L W COLLISON und D A VIGNALI: Interleukin-35: odd one out or part of the family? : *Immunol Rev* 226 (2008), 248–262.
- [27] D A VIGNALI, L W COLLISON und C J WORKMAN: How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8, Nr. 7 (2008), 523–532.

- [28] S SAKAGUCHI, N SAKAGUCHI, J SHIMIZU, S YAMAZAKI, T SAKIHAMA, M ITOH, Y KUNIIYASU, T NOMURA, M TODA und T TAKAHASHI: Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182 (2001), 18–32.
- [29] E D WOJNO und C A HUNTER: New directions in the basic and translational biology of interleukin-27. *Trends Immunol* 33, Nr. 2 (2012), 91–97.
- [30] J S STUMHOFER und C A HUNTER: Advances in understanding the anti-inflammatory properties of IL-27. *Immunol Lett* 117, Nr. 2 (2008), 123–130.
- [31] C POT, L APETOH, A AWASTHI und V K KUCHROO: Induction of regulatory Tr1 cells and inhibition of T(H)17 cells by IL-27. *Semin Immunol* 23, Nr. 6 (2011), 438–445.
- [32] G MURUGAIYAN, A MITTAL und H L WEINER: Identification of an IL-27/osteopontin axis in dendritic cells and its modulation by IFN-gamma limits IL-17-mediated autoimmune inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, Nr. 25 (2010), 11495–11500.
- [33] C L LANGRISH, B S MCKENZIE, N J WILSON, R de WAAL MALEFYT, R A KASTELEIN und D J CUA: IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 202 (2004), 96–105.
- [34] G TRINCHIERI: Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 84, Nr. 12 (1994), 4008–4027.
- [35] S ROMAGNANI: The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 18, Nr. 6 (1997), 263–266.
- [36] S AGGARWAL, N GHILARDI, M-H XIE, F J de SAUVAGE und A L GURNEY: Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278, Nr. 3 (2003), 1910–1914.
- [37] C A MURPHY, C L LANGRISH, Y CHEN, W BLUMENSCHNEIN, T MCCLANAHAN, R A KASTELEIN, J D SEDGWICK und D J CUA: Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198, Nr. 12 (2003), 1951–1957.
- [38] B OPPMANN, R LESLEY, B BLOM, J C TIMANS, Y XU, B HUNTE, F VEGA, N YU, J WANG, K SINGH, F ZONIN, E VAISBERG, T CHURAKOVA, M LIU, D GORMAN, J WAGNER, S ZURAWSKI, Y LIU, J S ABRAMS, K W MOORE, D RENNICK, R de WAAL-MALEFYT, C

- HANNUM, J F BAZAN und R A KASTELEIN: 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, Nr. 5 (2000), 715–725.
- [39] P J LUPARDUS und K C GARCIA: The structure of interleukin-23 reveals the molecular basis of p40 subunit sharing with interleukin-12. *J Mol Biol* 382, Nr. 4 (2008), 931–941.
- [40] S R SPRANG und J F BAZAN: Cytokine structural taxonomy and mechanisms of receptor engagement: Current opinion in structural biology. *Curr Opin Struct Bio* 3, Nr. 6 (1993), 815–827.
- [41] C YOON, S C JOHNSTON, J TANG, M STAHL, J F TOBIN und W S SOMERS: Charged residues dominate a unique interlocking topography in the heterodimeric cytokine interleukin-12. *The EMBO J* 19, Nr. 14 (2000), 3530–3541.
- [42] B M BEYER, R INGRAM, L RAMANATHAN, P REICHERT, H V LE, V MADISON und P ORTH: Crystal structures of the pro-inflammatory cytokine interleukin-23 and its complex with a high-affinity neutralizing antibody. *J Mol Biol* 382, Nr. 4 (2008), 942–955.
- [43] J SCHRÖDER, J M MOLL, P BARAN, J GRÖTZINGER, J SCHELLER und D M FLOSS: 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. *J Biol Chem* 290, Nr. 1 (2015), 359–370.
- [44] T R MOSMANN, H CHERWINSKI, M W BOND, M A GIEDLIN und R L COFFMAN: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol* 175, Nr. 1 (2005), 5–14.
- [45] S ROMAGNANI: Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* 12, Nr. 8 (1991), 256–257.
- [46] F ANNUNZIATO, L COSMI und S ROMAGNANI: Human and murine Th17. *Curr Opin HIV AIDS* 5, Nr. 2 (2010), 114–119.
- [47] L E HARRINGTON, R D HATTON, P R MANGAN, H TURNER, T L MURPHY, K M MURPHY und C T WEAVER: Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6, Nr. 11 (2005), 1123–1132.

- [48] F ANNUNZIATO, L COSMI, V SANTARLASCI, L MAGGI, F LIOTTA, B MAZZINGHI, E PARENTE, L FILÌ, S FERRI, F FROSALI, F GIUDICI, P ROMAGNANI, P PARRONCHI, F TONELLI, E MAGGI und S ROMAGNANI: Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 204, Nr. 8 (2007), 1849–1861.
- [49] L COSMI, R DE PALMA, V SANTARLASCI, L MAGGI, M CAPONE, F FROSALI, G RODOLICO, V QUERCI, G ABBATE, R ANGELI, L BERRINO, M FAMBRINI, M CAPRONI, F TONELLI, E LAZZERI, P PARRONCHI, F LIOTTA, E MAGGI, S ROMAGNANI und F ANNUNZIATO: Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med* 205, Nr. 8 (2008), 1903–1916.
- [50] M VELDHOEN, R J HOCKING, C J ATKINS, R M LOCKSLEY und B STOCKINGER: TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, Nr. 2 (2006), 179–189.
- [51] E ESPLUGUES, S HUBER, N GAGLIANI, A E HAUSER, T TOWN, Y Y WAN, W O'CONNOR, A RONGVAUX, N VAN ROOIJEN, A M HABERMAN et al.: Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature* 475, Nr. 7357 (2011), 514–518.
- [52] M L CHO, J W KANG, Y M MOON, H J NAM, J Y JHUN, S B HEO, H T JIN, S Y MIN, J H JU, K S PARK, Y G CHO, C H YOON, S H PARK, Y C SUNG und H Y KIM: STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Immunol* 176, Nr. 9 (2006), 5652–5661.
- [53] E V ACOSTA-RODRIGUEZ, G NAPOLITANI, A LANZAVECCHIA und F SALLUSTO: Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8, Nr. 9 (2007), 942–949.
- [54] M J MCGEACHY, Y CHEN, C M TATO, A LAURENCE, B JOYCE-SHAIKH, W M BLUMENSCHIEIN, T K MCCLANAHAN, J J O'SHEA und D J CUA: The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol* 10, Nr. 3 (2009), 314–324.
- [55] F A VERRECK, T de BOER, D M LANGENBERG, M A HOEVE, M KRAMER, E VAISBERG, R KASTELEIN, A KOLK, R de WAAL-MALEFYT und T H OTTENHOFF: Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, Nr. 13 (2004), 4560–4565.

- [56] R J CARMODY, Q RUAN, H C LIOU und Y H CHEN: Essential roles of c-Rel in TLR-induced IL-23 p19 gene expression in dendritic cells. *J Immunol* 178, Nr. 1 (2007), 186–191.
- [57] F RE und J L STROMINGER: Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem* 276, Nr. 40 (2001), 37692–37699.
- [58] G NAPOLITANI, A RINALDI, F BERTONI, F SALLUSTO und A LANZAVECCHIA: Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 6, Nr. 8 (2005), 769–776.
- [59] A J van BEELEN, Z ZELINKOVA, E W TAANMAN-KUETER, F J MULLER, D W HOMMES, S A ZAAT, M L KAPSENBERG und E C de JONG: Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* 27, Nr. 4 (2007), 660–669.
- [60] D B STETSON und R MEDZHITOV: T helper 17 cells get the NOD. *Immunity* 27, Nr. 4 (2007), 546–548.
- [61] I I IVANOV, B S MCKENZIE, L ZHOU, C E TADOKORO, A LEPELLEY, J J LAFAILLE, D J CUA und D R LITTMAN: The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126, Nr. 6 (2006), 1121–1133.
- [62] X O YANG, A D PANOPOULOS, R NURIEVA, S H CHANG, D WANG, S S WATOWICH und C DONG: STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 282, Nr. 13 (2007), 9358–9363.
- [63] N F CHE MAT, X ZHANG, C GUZZO und K GEE: Interleukin-23-induced interleukin-23 receptor subunit expression is mediated by the Janus kinase/signal transducer and activation of transcription pathway in human CD4 T cells. *J Interferon Cytokine Res* 31, Nr. 4 (2011), 363–371.
- [64] B S MCKENZIE, R A KASTELEIN und D J CUA: Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 27, Nr. 1 (2006), 17–23.
- [65] A LAURENCE, C M TATO, T S DAVIDSON, Y KANNO, Z CHEN, Z YAO, R B BLANK, F MEYLAN, R SIEGEL, L HENNIGHAUSEN, E M SHEVACH und J J O'SHEA: Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26, Nr. 3 (2007), 371–381.

- [66] Z YAO, W C FANSLow, M F SELDIN, A M ROUSSEAU, S L PAINTER, M R COMEAU, J I COHEN und M K SPRIGGS: Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 3, Nr. 6 (1995), 811–821.
- [67] E DUVALLET, L SEMERANO, E ASSIER, G FALGARONE und M C BOISSIER: Interleukin-23: a key cytokine in inflammatory diseases. *Ann Med* 43, Nr. 7 (2011), 503–511.
- [68] L A ZÚÑIGA, R JAIN, C HAINES und D J CUA: Th17 cell development: from the cradle to the grave. *Immunol Rev* 252, Nr. 1 (2013), 78–88.
- [69] C ABRAHAM und J CHO: Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 15, Nr. 7 (2009), 1090–1100.
- [70] S LEIBUNDGUT-LANDMANN, O GROSS, M J ROBINSON, F OSORIO, E C SLACK, S V TSONI, E SCHWEIGHOFFER, V TYBULEWICZ, G D BROWN, J RULAND et al.: Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 8, Nr. 6 (2007), 630–638.
- [71] V GAFA, R LANDE, M C GAGLIARDI, M SEVERA, E GIACOMINI, M E REMOLI, R NISINI, C RAMONI, P DI FRANCESCO, D ALDEBERT et al.: Human dendritic cells following *Aspergillus fumigatus* infection express the CCR7 receptor and a differential pattern of interleukin-12 (IL-12), IL-23, and IL-27 cytokines, which lead to a Th1 response. *Infect Immun* 74, Nr. 3 (2006), 1480–1489.
- [72] J LEHMANN, S BELLMANN, C WERNER, R SCHRÖDER, N SCHÜTZE und G ALBER: IL-12p40-dependent agonistic effects on the development of protective innate and adaptive immunity against *Salmonella enteritidis*. *J Immunol* 167, Nr. 9 (2001), 5304–5315.
- [73] S C HIGGINS, A G JARNICKI, E C LAVELLE und K H G MILLS: TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol* 177, Nr. 11 (2006), 7980–7989.
- [74] Q WU, R J MARTIN, J G RINO, R BREED, R M TORRES und H W CHU: IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Microbes Infect* 9, Nr. 1 (2007), 78–86.
- [75] R MALLEY: Antibody and cell-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*: implications for vaccine development. *J Mol Med* 88, Nr. 2 (2010), 135–142.

- [76] T M WOZNIAK, A A RYAN und W J BRITTON: Interleukin-23 restores immunity to Mycobacterium tuberculosis infection in IL-12p40-deficient mice and is not required for the development of IL-17-secreting T cell responses. *J Immunol* 177, Nr. 12 (2006), 8684–8692.
- [77] L A ZENEWICZ, G D YANCOPOULOS, D M VALENZUELA, A J MURPHY, M KAROW und R A FLAVELL: Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 27, Nr. 4 (2007), 647–659.
- [78] K SUGIMOTO, A OGAWA, E MIZOGUCHI, Y SHIMOMURA, A ANDOH, A K BHAN, R S BLUMBERG, R J XAVIER und A MIZOGUCHI: IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 118, Nr. 2 (2008), 534.
- [79] C BECKER, H DORNHOFF, C NEUFERT, M C FANTINI, S WIRTZ, S HUEBNER, A NIKOLAEV, H-A LEHR, A J MURPHY, D M VALENZUELA et al.: Cutting edge: IL-23 cross-regulates IL-12 production in T cell-dependent experimental colitis. *J Immunol* 177, Nr. 5 (2006), 2760–2764.
- [80] D J CUA, J SHERLOCK, Y CHEN, C A MURPHY, B JOYCE, B SEYMOUR, L LUCIAN, W TO, S KWAN, T CHURAKOVA, S ZURAWSKI, M WIEKOWSKI, S A LIRA, D GORMAN, R A KASTELEIN und J D SEDGWICK: Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, Nr. 6924 (2003), 744–748.
- [81] K R BASTOS, C R MARINHO, R BARBOZA, M RUSSO, J M ALVAREZ und M R D'IMPÉRIO LIMA: What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells?. *Microbes Infect* 6, Nr. 6 (2004), 630–636.
- [82] C E SUTTON, S J LALOR, C M SWEENEY, C F BRERETON, E C LAVELLE und K H MILLS: Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 31, Nr. 2 (2009), 331–341.
- [83] K SHIBATA, H YAMADA, H HARA, K KISHIHARA und Y YOSHIKAI: Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after Escherichia coli infection via IL-17 production. *J Immunol* 178, Nr. 7 (2007), 4466–4472.
- [84] B STOCKINGER, M VELDHOEN und B MARTIN: Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 19, Nr. 6 (2007), 353–361.
- [85] F PETERMANN, V ROTHHAMMER, M C CLAUSSEN, J D HAAS, L R BLANCO, S HEINK, I PRINZ, B HEMMER, V K KUCHROO, M OUKKA und T KORN: gammadelta T cells

- enhance autoimmunity by restraining regulatory T cell responses via an interleukin-23-dependent mechanism. *Immunity* 33, Nr. 3 (2010), 351–363.
- [86] P P AHERN, C SCHIERING, S BUONOCORE, M J MCGEACHY, D J CUA, K J MALOY und F POWRIE: Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. *Immunity* 33, Nr. 2 (2010), 279–288.
- [87] A IZCUE, S HUE, S BUONOCORE, C V ARANCIBIA-CÁRCAMO, P P AHERN, Y IWAKURA, K J MALOY und F POWRIE: Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity* 28, Nr. 4 (2008), 559–570.
- [88] H WATARAI, E SEKINE-KONDO, T SHIGEURA, Y MOTOMURA, T YASUDA, R SATOH, H YOSHIDA, M KUBO, H KAWAMOTO, H KOSEKI et al.: Development and function of invariant natural killer T cells producing TH2- and TH17-cytokines. *PLoS biology* 10, Nr. 2 (2012), e1001255.
- [89] K SATO, A SUEMATSU, K OKAMOTO, A YAMAGUCHI, Y MORISHITA, Y KADONO, S TANAKA, T KODAMA, S AKIRA, Y IWAKURA, D J CUA und H TAKAYANAGI: Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 203, Nr. 12 (2006), 2673–2682.
- [90] C L LANGRISH, Y CHEN, W M BLUMENSCHNEIN, J MATTSON, B BASHAM, J D SEDGWICK, T MCCLANAHAN, R A KASTELEIN und D J CUA: IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201, Nr. 2 (2005), 233–240.
- [91] G MURUGAIYAN, A MITTAL und H L WEINER: Increased osteopontin expression in dendritic cells amplifies IL-17 production by CD4⁺ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and in multiple sclerosis. *J Immunol* 181, Nr. 11 (2008), 7480–7488.
- [92] A PARADOWSKA-GORYCKA, A GRZYBOWSKA-KOWALCZYK, E WOJTECKA-LUKASIK und S MASLINSKI: IL-23 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 71, Nr. 3 (2010), 134–145.
- [93] E TOUSSIROT: The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* (2012).
- [94] S NAKAE, A NAMBU, K SUDO und Y IWAKURA: Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171, Nr. 11 (2003), 6173–6177.

- [95] Y MEI, F PAN, J GAO, R GE, Z DUAN, Z ZENG, F LIAO, G XIA, S WANG, S XU, J XU, L ZHANG und D YE: Increased serum IL-17 and IL-23 in the patient with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* 30, Nr. 2 (2011), 269–273.
- [96] K NAKAJIMA: Critical role of the interleukin-23//T-helper 17 cell axis in the pathogenesis of psoriasis. *J Dermatol* 39, Nr. 3 (2012), 219–224.
- [97] A DI CESARE, P DI MEGLIO und F O NESTLE: The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 129, Nr. 6 (2009), 1339–1350.
- [98] U HÜFFMEIER, J LASCORZ, B BÖHM, J LOHMANN, J WENDLER, R MÖSSNER, K REICH, H TRAUPE, W KURRAT, H BURKHARDT und A REIS: Genetic variants of the IL-23R pathway: association with psoriatic arthritis and psoriasis vulgaris, but no specific risk factor for arthritis. *J Invest Dermatol* 129, Nr. 2 (2009), 355–358.
- [99] C BECKER, S WIRTZ, M BLESSING, J PIRHONEN, D STRAND, O BECHTHOLD, J FRICK, P R GALLE, I AUTENRIETH, M F NEURATH et al.: Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest* 112, Nr. 5 (2003), 693–706.
- [100] H H UHLIG, B S MCKENZIE, S HUE, C THOMPSON, B JOYCE-SHAIKH, R STEPANKOVA, N ROBINSON, S BUONOCORE, H TLASKALOVA-HOGENOVA, D J CUA und F POWRIE: Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity* 25, Nr. 2 (2006), 309–318.
- [101] R H DUERR, K D TAYLOR, S R BRANT, J D RIOUX, M S SILVERBERG, M J DALY, A H STEINHART, C ABRAHAM, M REGUEIRO, A GRIFFITHS, T DASSOPOULOS, A BITTON, H YANG, S TARGAN, L W DATTA, E O KISTNER, L P SCHUMM, A T LEE, P K GREGERSEN, M M BARMADA, J I ROTTER, D L NICOLAE und J H CHO: A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314, Nr. 5804 (2006), 1461–1463.
- [102] C ABRAHAM und J H CHO: IL-23 and autoimmunity: new insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 60 (2009), 97–110.
- [103] J L LANGOWSKI, X ZHANG, L WU, J D MATTSON, T CHEN, K SMITH, B BASHAM, T MCCLANAHAN, R A KASTELEIN und M OFT: IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 442, Nr. 7101 (2006), 461–465.
- [104] B LJUJIC, G RADOSAVLJEVIC, I JOVANOVIC, S PAVLOVIC, N ZDRAVKOVIC, M MILOVANOVIC, L ACIMOVIC, M KNEZEVIC, D BANKOVIC, D ZDRAVKOVIC und N ARSENIJEVIC:

- Elevated serum level of IL-23 correlates with expression of VEGF in human colorectal carcinoma. *Arch Med Res* 41, Nr. 3 (2010), 182–189.
- [105] C COCCO, S CANALE, C FRASSON, E DI CARLO, E OGNIO, D RIBATTI, I PRIGIONE, G BASSO und I AIROLDI: Interleukin-23 acts as antitumor agent on childhood B-acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 116, Nr. 19 (2010), 3887–3898.
- [106] D K PODOLSKY: The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16, Nr. 6 (2002), 933–943.
- [107] O CINGOZ: Ustekinumab. *MAbs* 1, Nr. 3 (2009), 216–221.
- [108] J M BENSON, C W SACHS, G TREACY, H ZHOU, C E PENDLEY, C M BRODMERKEL, G SHANKAR und M A MASCELLI: Therapeutic targeting of the IL-12/23 pathways: generation and characterization of ustekinumab. *Nat Biotechnol* 29, Nr. 7 (2011), 615–624.
- [109] C L LEONARDI, A B KIMBALL, K A PAPP, N YEILDING, C GUZZO, Y WANG, S LI, L T DOOLEY, K B GORDON und PHOENIX 1 STUDY INVESTIGATORS: Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1). *Lancet* 371, Nr. 9625 (2008), 1665–1674.
- [110] K A PAPP, R G LANGLEY, M LEBWOHL, G G KRUEGER, P SZAPARY, N YEILDING, C GUZZO, M C HSU, Y WANG, S LI, L T DOOLEY, K REICH und PHOENIX 2 STUDY INVESTIGATORS: Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2). *Lancet* 371, Nr. 9625 (2008), 1675–1684.
- [111] Ustekinumab (Stelara) for psoriasis. *Med Lett Drugs Ther* 52, Nr. 1330 (2010), 7–8.
- [112] J D CROXTALL: Ustekinumab: a review of its use in the management of moderate to severe plaque psoriasis. *Drugs* 71, Nr. 13 (2011), 1733–1753.
- [113] M KURZEJA, L RUDNICKA und M OLSZEWSKA: New interleukin-23 pathway inhibitors in dermatology: ustekinumab, briakinumab, and secukinumab. *Am J Clin Dermatol* 12, Nr. 2 (2011), 113–125.
- [114] K B GORDON, R G LANGLEY, A B GOTTLIEB, K A PAPP, G G KRUEGER, B E STROBER, D A WILLIAMS, Y GU und J M VALDES: A phase III, randomized, controlled trial of the

- fully human IL-12/23 mAb briakinumab in moderate-to-severe psoriasis. *J Invest Dermatol* 132, Nr. 2 (2012), 304–314.
- [115] A K MARWAHA, S TAN und J P DUTZ: Targeting the IL-17/IFN- γ axis as a potential new clinical therapy for type 1 diabetes. *Clin Immunol* 154, Nr. 1 (2014), 84–89.
- [116] W HUEBER, B E SANDS, S LEWITZKY, M VANDEMEULENBROECKE, W REINISCH, P HIGGINS, J WEHKAMP, B G FEAGAN, M D YAO, M KARCZEWSKI et al.: Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* 61, Nr. 12 (2012), 1693–1700.
- [117] W HUEBER, D D PATEL, T DRYJA, A M WRIGHT, I KOROLEVA, G BRUIN, C ANTONI, Z DRAELOS, M H GOLD, P DUREZ et al.: Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci Transl Med* 2, Nr. 52 (2010), 52ra72–52ra72.
- [118] M C GENOVESE: One Year Efficacy and Safety Results of a Phase II Trial of Secukinumab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol* 41, Nr. 3 (2011), 414–21.
- [119] P J MEASE: Inhibition of interleukin-17, interleukin-23 and the TH17 cell pathway in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis. *Curr Opin Rheumatol* 27, Nr. 2 (2015), 127–133.
- [120] C O ELSON, Y CONG, C T WEAVER, T R SCHOEB, T K MCCLANAHAN, R B FICK und R A KASTELEIN: Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* 132, Nr. 7 (2007), 2359–2370.
- [121] H SOFEN, S SMITH, R T MATHESON, C L LEONARDI, C CALDERON, C BRODMERKEL, K LI, K CAMPBELL, S J MARCINIAK, Y WASFI, Y WANG, P SZAPARY und J G KRUEGER: Guselkumab (an IL-23-specific mAb) demonstrates clinical and molecular response in patients with moderate-to-severe psoriasis. *J Allergy Clin Immunol* 133, Nr. 4 (2014), 1032–1040.
- [122] W TAUSEND, C DOWNING und S TYRING: Systematic review of interleukin-12, interleukin-17, and interleukin-23 pathway inhibitors for the treatment of moderate-to-severe chronic plaque psoriasis: ustekinumab, briakinumab, tildrakizumab, guselkumab, secukinumab, ixekizumab, and brodalumab. *J Cutan Med Surg* 18, Nr. 3 (2014), 156–169.

- [123] D H PRESKY, H YANG, L J MINETTI, A O CHUA, N NABAVI, C-Y WU, M K GATELY und U GUBLER: A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two β -type cytokine receptor subunits. *PNAS* 93, Nr. 24 (1996), 14002–14007.
- [124] A O CHUA, V L WILKINSON, D H PRESKY und U GUBLER: Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component. *J Immunol* 155, Nr. 9 (1995), 4286–4294.
- [125] P F CHEUNG, C K WONG und C W LAM: Molecular mechanisms of cytokine and chemokine release from eosinophils activated by IL-17A, IL-17F, and IL-23: implication for Th17 lymphocytes-mediated allergic inflammation. *J Immunol* 180, Nr. 8 (2008), 5625–5635.
- [126] N KANDA und S WATANABE: IL-12, IL-23, and IL-27 enhance human beta-defensin-2 production in human keratinocytes. *Eur J Immunol* 38, Nr. 5 (2008), 1287–1296.
- [127] S PIDASHEVA, S TRIFARI, A PHILLIPS, J A HACKNEY, Y MA, A SMITH, S J SOHN, H SPITS, R D LITTLE, T W BEHRENS, L HONIGBERG, N GHILARDI und H F CLARK: Functional studies on the IBD susceptibility gene IL23R implicate reduced receptor function in the protective genetic variant R381Q. *PLoS One* 6, Nr. 10 (2011).
- [128] R D CASE, E PICCIONE, G WOLF, A M BENETT, R J LECHLEIDER, B G NEEL und S E SHOELSON: SH-PTP2/Syp SH2 domain binding specificity is defined by direct interactions with platelet-derived growth factor beta-receptor, epidermal growth factor receptor, and insulin receptor substrate-1-derived phosphopeptides. *J Biol Chem* 269, Nr. 14 (1994), 10467–10474.
- [129] M WIEDERKEHR-ADAM, P ERNST, K MÜLLER, E BIECK, F O GOMBERT, J OTTL, P GRAFF, F GROSSMÜLLER und M H HEIM: Characterization of phosphopeptide motifs specific for the Src homology 2 domains of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and STAT3. *J Biol Chem* 278, Nr. 18 (2003), 16117–16128.
- [130] L K NAEGER, J MCKINNEY, A SALVEKAR und T HOEY: Identification of a STAT4 binding site in the interleukin-12 receptor required for signaling. *J Biol Chem* 274, Nr. 4 (1999), 1875–1878.
- [131] B B YAO, P NIU, C S SUROWY und C R FALTYNEK: Direct interaction of STAT4 with the IL-12 receptor. *Arch Biochem Biophys* 368, Nr. 1 (1999), 147–155.
- [132] W E THIERFELDER, J M van DEURSEN, K YAMAMOTO, R A TRIPP, S R SARAWAR, R T CARSON, M Y SANGSTER, D A VIGNALI, P C DOHERTY, G C GROSVELD et al.:

- Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 382, Nr. 6587 (1996), 171–4.
- [133] W T WATFORD, B D HISSONG, J H BREM, Y KANNO, L MUUL und J J O'SHEA: Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol Rev* 202, Nr. 1 (2004), 139–156.
- [134] D M FLOSS, S MROTZEK, T KLÖCKER, J SCHRÖDER, J GRÖTZINGER, S ROSE-JOHN und J SCHELLER: Identification of Canonical Tyrosine-dependent and Non-canonical Tyrosine-independent STAT3 Activation Sites in the Intracellular Domain of the Interleukin 23 Receptor. *J Biol Chem* 288, Nr. 27 (2013), 19386–19400.
- [135] R EULENFELD, A DITTRICH, C KHOURI, P J MÜLLER, B MÜTZE, A WOLF und F SCHAPER: Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs. *Eur J Cell Biol* 91, Nr. 6-7 (2012), 486–495.
- [136] A OGATA, D CHAUHAN, G TEOH, S P TREON, M URASHIMA, R L SCHLOSSMAN und K C ANDERSON: IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol* 159, Nr. 5 (1997), 2212–2221.
- [137] Z CHEN, A LAURENCE, Y KANNO, M PACHER-ZAVISIN, B M ZHU, C TATO, A YOSHIMURA, L HENNIGHAUSEN und J J O'SHEA: Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, Nr. 21 (2006), 8137–8142.
- [138] R A de PAUS, D van de WETERING, J T van DISSEL und E van de VOSSE: IL-23 and IL-12 responses in activated human T cells retrovirally transduced with IL-23 receptor variants. *Mol Immunol* 45, Nr. 15 (2008), 3889–3895.
- [139] A K HUBER, E M JACOBSON, K JAZDZEWSKI, E S CONCEPCION und Y TOMER: Interleukin (IL)-23 receptor is a major susceptibility gene for Graves' ophthalmopathy: the IL-23/T-helper 17 axis extends to thyroid autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab* 93, Nr. 3 (2008), 1077–1081.
- [140] R SARIN, X WU und C ABRAHAM: Inflammatory disease protective R381Q IL23 receptor polymorphism results in decreased primary CD4+ and CD8+ human T-cell functional responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, Nr. 23 (2011), 9560–9565.
- [141] P DI MEGLIO, A DI CESARE, U LAGGNER, C C CHU, L NAPOLITANO, F VILLANOVA, I TOSI, F CAPON, R C TREMBATH, K PERIS und F O NESTLE: The IL23R R381Q gene

- variant protects against immune-mediated diseases by impairing IL-23-induced Th17 effector response in humans. *PLoS One* 6, Nr. 2 (2011).
- [142] H CHU, W CAO, W CHEN, S PAN, Y XIAO, Y LIU, H GU, W GUO, L XU, Z HU und H SHEN: Potentially functional polymorphisms in IL-23 receptor and risk of esophageal cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* 130, Nr. 5 (2012), 1093–1097.
- [143] D M FLOSS, J SCHRÖDER, M FRANKE und J SCHELLER: Insights into IL-23 biology: From structure to function. *Cytokine Growth Factor Rev* (2015).
- [144] G BERTANI: A Method for Detection of Mutations, Using Streptomycin Dependence in Escherichia Coli. *Genetics* 36, Nr. 6 (1951), 598–611.
- [145] K ALTHOFF, J MÜLLBERG, D AASLAND, N VOLTZ, K KALLEN, J GRÖTZINGER und S ROSE-JOHN: Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins. *Biochem J* 353, Nr. Pt 3 (2001), 663–672.
- [146] R KETTELER, S GLASER, O SANDRA, U M MARTENS und U KLINGMÜLLER: Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther* 9, Nr. 8 (2002), 477–487.
- [147] J SUTHAUS, A TILLMANN, I LORENZEN, E BULANOVA, S ROSE-JOHN und J SCHELLER: Forced homo- and heterodimerization of all gp130-type receptor complexes leads to constitutive ligand-independent signaling and cytokine-independent growth. *Mol Biol Cell* 21, Nr. 15 (2010), 2797–2807.
- [148] R PALACIOS und M STEINMETZ: Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell* 41, Nr. 3 (1985), 727–734.
- [149] M FISCHER, J GOLDSCHMITT, C PESCHEL, J P BRAKENHOFF, K J KALLEN, A WOLLMER, J GRÖTZINGER und S ROSE-JOHN: I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol* 15, Nr. 2 (1997), 142–145.
- [150] D P GEARING, S F ZIEGLER, M R COMEAU, D FRIEND, B THOMA, D COSMAN, L PARK und B MOSLEY: Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, Nr. 3 (1994), 1119–1123.

- [151] A SCHROERS, O HECHT, K J KALLEN, M PACHTA, S ROSE-JOHN und J GRÖTZINGER: Dynamics of the gp130 cytokine complex: a model for assembly on the cellular membrane. *Protein Sci* 14, Nr. 3 (2005), 783–790.
- [152] T C LORENZ: Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*, Nr. 63 (2012).
- [153] J SAMBROOK und D W RUSSELL: Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor New York* 3 (2001).
- [154] P HEINRICH, I BEHRMANN, S HAAN, H HERMANN, G MULLER-NEUEN und F SCHAPER: Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374 (2003), 1–20.
- [155] Z YAO und R SEGER: The ERK signaling cascade—views from different subcellular compartments. *BioFactors* 35, Nr. 5 (2009), 407–416.
- [156] N STAHL, T J FARRUGGELLA, T G BOULTON, Z ZHONG, J E DARNELL und G D YANCOPOULOS: Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267, Nr. 5202 (1995), 1349–1353.
- [157] A C WARD, M H A HERMANS, L SMITH, Y M van AESCH, A M SCHELEN, C ANTONISSEN und I P TOUW: Tyrosine-Dependent and -Independent Mechanisms of STAT3 Activation by the Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) Receptor Are Differentially Utilized Depending on G-CSF Concentration. *Blood* (1999).
- [158] L DUMOUTIER, C de MEESTER, J TAVERNIER und J-C RENAULD: New activation modus of STAT3: a tyrosine-less region of the interleukin-22 receptor recruits STAT3 by interacting with its coiled-coil domain. *J Biol Chem* 284, Nr. 39 (2009), 26377–26384.
- [159] X LI, S LEUNG, I M KERR und G R STARK: Functional subdomains of STAT2 required for preassociation with the alpha interferon receptor and for signaling. *Mol Cell Biol* 17, Nr. 4 (1997), 2048–2056.
- [160] Y ZHENG, H QIN, S J FRANK, L DENG, D W LITCHFIELD, A TEFFERI, A PARDANANI, F-T LIN, J LI, B SHA und E N BENVENISTE: A CK2-dependent mechanism for activation of the JAK-STAT signaling pathway. *Blood* 118, Nr. 1 (2011), 156–166.

- [161] J ZHANG, F CHEN, W LI, Q XIONG, M YANG, P ZHENG, C LI, J PEI und F GE: 14-3-3 interacts with stat3 and regulates its constitutive activation in multiple myeloma cells. *PLoS One* 7, Nr. 1 (2012).
- [162] T A ENDO, M MASUHARA, M YOKOUCHI, R SUZUKI, H SAKAMOTO, K MITSUI, A MATSUMOTO, S TANIMURA, M OHTSUBO, H MISAWA, T MIYAZAKI, N LEONOR, T TANIGUCHI, T FUJITA, Y KANAKURA, S KOMIYA und A YOSHIMURA: A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387, Nr. 6636 (1997), 921–924.
- [163] D C PALMER und N P RESTIFO: Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends Immunol* 30, Nr. 12 (2009), 592–602.
- [164] C F LAI, J RIPPERGER, Y WANG, H KIM, R B HAWLEY und H BAUMANN: The STAT3-independent signaling pathway by glycoprotein 130 in hepatic cells. *J Biol Chem* 274, Nr. 12 (1999), 7793–7802.

Danksagung

Von Herzen möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während des Medizinstudiums und der Dissertation unterstützt haben.

Besonders bei **Dr. Doreen M. Floss** für Ihre sehr gute Betreuung während der Arbeit im Labor und danach. Vielen Dank für die vielen Ratschläge und Korrekturen, aber auch für die Gespräche neben der Arbeit.

Vielen Dank an meinen Doktorvater **Prof. Jürgen Scheller und den Mitgliedern der Arbeitsgruppe** für die Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Der **Forschungskommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität** danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Danken möchte ich meiner **Familie**, insbesondere meinen **Eltern, Maria und Rüdiger**, die mich immer unterstützen und für mich da sind und waren. Meinen Brüdern **Christian und Alexander** danke für den Zusammenhalt. Besonderer Dank auch an meine Liebsten, **Andreas Margraf** und meine **Zwillingschwester Silvia**, für die Hilfe bei den Korrekturen der Arbeit und in allen Lebenslagen.

Vielen Dank **Michael Brodski** für die Hilfe bei der Formatierung mit Latex.

Zu guter Letzt danke an **Rebecca Nitz**, die mich während Studium und Laborzeit begleitet und unterstützt hat.

Eidesstattliche Versicherung

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

Essen, den 11.09.2015

Simone Maria Mrotzek