Design synthetischer Zytokinrezeptoren für Interleukin-6- und Interleukin-23-artige Zytokine und Analyse der Rolle von Interleukin-23 in kardialer Ischämie

HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Erika Engelowski
aus Borowski

Düsseldorf, Dezember 2018

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

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

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Flögel

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Mai 2019

„Ich habe keine besondere Begabung,

sondern bin nur leidenschaftlich neugierig.“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... **I**

Abbildungsverzeichnis ..... **III**

Abkürzungsverzeichnis ..... **IV**

1 Einleitung **1**

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen, deren Ursachen und Therapieansätze 1

1.1.1. Myokardinfarkt und die Folgen der Reperfusion 2

1.1.2. Merkmale der Zytokine 4

1.2 Die IL-12-Familie 5

1.2.1 Zusammensetzung der IL-12-Familie, ihrer Rezeptoren und Signalkomponenten 5

1.2.2 Das Zytokin IL-23 und seine spezifischen Rezeptoren 8

1.2.3 IL-23-induzierte Signalwege 10

1.2.4 Transphosphorylierung der Januskinasen innerhalb der Zytokinrezeptoren 13

1.2.5 Die Rolle von IL-23 in immunologischen Prozessen und bei der Entwicklung diverser Erkrankungen 13

1.2.6 Die Rolle von Interleukin-23 in der myokardialen Ischämie 16

1.3 Gp130 und seine vermittelte Signaltransduktion 19

1.3.1 Die konstitutive Aktivierung des gp130/JAK/STAT3 Signalweges 21

1.4 Synthetische, biologisch aktive Rezeptoren 22

1.4.1 Nanobodies und ihre Anwendbarkeit in der Forschung und Diagnostik 24

2. Zielsetzung **27**

3. Publikation 1 ..... **28**

4. Publikation 2 ..... **29**

5. Publikation 3 ..... **30**

6. Patentantrag 1 ..... **31**

7. Diskussion **32**

7.1. Die IL-23 Signaltransduktion spielt eine untergeordnete Rolle im Umbau des ischämischen Herzgewebes nach I/R 33

7.1.1. Neuartige IL-23-*signaling*-defiziente Mäuse stellen ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung der Wirkungsweise von IL-23 in kardiovaskulären Erkrankungen dar 33

7.1.2. Das Fehlen der IL-23-induzierten Signalwege zeigte eine geringe Auswirkung auf das Remodeling des Herzens nach Myokardinfarkt 35

7.1.3. Die Behandlung mit IL-23 hat nahezu keine therapeutische Wirkung auf den Heilungsprozess des ischämischen Herzgewebes nach I/R 39

Inhaltsverzeichnis

7.2. Neuartiges synthetisches Zytokinrezeptorsystem phänokopiert natürliche Zytokinrezeptorsignale *in vitro* und *in vivo* 42
7.2.1. Das synthetische Zytokinrezeptorsystem phänokopiert die IL-23 Signalgebung und ist leicht ein- und ausschaltbar 42
7.2.2. Der synthetische IL-23R, jedoch nicht IL-12Rβ1, ist als homodimerer Komplex biologisch aktiv 46
7.2.3. SyCyRs phänokopieren die IL-6/IL-11 Signalweiterleitung *in vitro* und *in vivo* 50
7.2.4. Das SyCyR-System kann zur STAT3-Transphosphorylierung genutzt werden 54
7.2.5. Perspektive der SyCyR-Technologie in der Tumorimmungentherapie 58
7.3. Die synthetische Biologie ermöglicht eine detaillierte Aussage über Rezeptorzusammensetzungen 59
7.3.1. Die IL-35-induzierte Signaltransduktion erfolgt über unterschiedliche Rezeptorzusammensetzungen 59
7.3.2. Der Rezeptorkomplex aus IL-23R und gp130 ist biologisch aktiv und könnte über IL-39 signalisieren 62
7.3.3. Entdeckung zwei zusätzlicher Rezeptorkomplexe der IL-12-Familie 64
8. Zusammenfassung 66
9. Summary 68
10. Literatur 70
11. Lebenslauf 96
12. Danksagung 98
13. Eidesstattliche Versicherung 100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Todesursachen im Rahmen der Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland im Jahr 2015. 1
Abbildung 2: Zytokine der IL-12-Familie. 8
Abbildung 3: Strukturelle Eigenschaften des IL-23 Rezeptorkomplexes. 10
Abbildung 4: Schematische Darstellung der IL-23-induzierten Signalwege. 12
Abbildung 5: Die Zytokine der IL-6- und IL-12-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des T_H17-Phänotyps. 14
Abbildung 6: Schematische Darstellung der IL-6/IL-11-induzierten Signalwege. 20
Abbildung 7: CAR T-Zellrezeptor Technologie. 23
Abbildung 8: Struktureller Aufbau des Nanobodies aus HcAbs. 25
Abbildung 9: Interaktion zwischen GFP-Nanobody (G_{VHH}) und GFP und der Aufbau von SyCyRs. 26
Abbildung 10: Zusammenfassende Ergebnisse zur myokardialen Analyse von IL-23-*signaling*-defizienten Mäusen, die in einem *closed*- oder *open-chest* I/R Modell herausgefordert wurden. 39
Abbildung 11: Zusammenfassende Ergebnisse zum therapeutischen Effekt von HIL-23Fc auf das ischämische Herz von C57/BL6J Mäusen, die in einem *closed-chest* I/R Modell herausgefordert wurden. 42
Abbildung 12: Die SyCyR-Technologie phänokopiert die Zytokin-induzierte Signaltransduktion und ermöglicht die definierte Zusammensetzung von Rezeptoren. 50
Abbildung 13: Gp130-SyCyRs sind *in vivo* biologisch aktiv. 54
Abbildung 14: STAT3-Transphosphorylierung mittels Zytokinrezeptoren. 57
Abbildung 15: Chimäre Rezeptoren simulieren die IL-35 Signaltransduktion. 62
Abbildung 16: Untersuchung zur Rezeptorzusammensetzung und Signaltransduktion von IL-39. 64
Abbildung 17: Zusätzliche biologisch aktive Rezeptorkomplexe der IL-12-Familie. 65

Abkürzungsverzeichnis

α-SMA	*α-smooth muscle actin*
Ba/F3	murine prä-B-Zelllinie
Ca^{2+}	Calciumion
CAR	*chimeric antigen receptor*
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (*complementary desoxyribonucleic acid*)
CDR	*complementarity determining region*
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CHO	*chinese hamster ovary*
CLC	*cardiotrophin-like cytokine*
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis (*collagen-induced arthritis*)
CNTF	*ciliary neurotrophic factor*
C-Region	konstante (*constant*)-Region eines Antikörpers
CRP	C-reaktives Protein
CRS	*cytokine release syndrome*
CT-1	*cardiotrophin* 1
C_{VHH}	mCherry-Nanobody
DCs	dendritische Zellen (*dendritic cells*)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*)
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBI3	*Epstein-Barr virus-induced gene 3*
ECD	extrazelluläre Domäne (*extracellular domain*)
EGF	*epidermal growth factor*
EGFR	*epidermal growth factor receptor*
EKG	Elektrokardiographie
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
Epo	Erythropoetin
EpoR	Erythropoetinrezeptor
EZM	extrazelluläre Matrix

Abkürzungsverzeichnis

FCRγ	Fc Rezeptor γ
FDA	*food and drug administration*
FNIII	Fibronektin Typ III
FOXP3	*forkhead box P3*
gp130	Glykoprotein 130
GFP	*green fluorescent protein*
G_{VHH}	*green fluorescent protein*-Nanobody
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure (*hyaluronic acid*)
HBV	Hepatitis B Virus
HcAb	schwere-Ketten-Antikörper (*heavy-chain-only antibody*)
HIL-23Fc	Fc-getaggtes humanes Interleukin-23
H-Region	schwere (*heavy*)-Region eines Antikörpers
ICD	intrazelluläre Domäne (*intracellular domain*)
IL	Interleukin
IL-6Rα	Interleukin-6 Rezeptor α
IL-11R	Interleukin-11 Rezeptor α
IL-12Rβ1	Interleukin-12 Rezeptor β1
IL-12Rβ2	Interleukin-12 Rezeptor β2
IL-23R	Interleukin-23 Rezeptor
I/R	Ischämie/Reperfusion
JAK	Januskinasen
LDL-C	*low-density lipoprotein cholesterol*
LAD	*left anterior descending artery*
LIF	Leukämie-inhibitorischer Faktor
L-Region	leichte-Kette eines Antikörpers
LV	linker Ventrikel
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*
MRI	*magnetic resonance imaging*
MS	multiple Sklerose
NF-κB	*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*
NPC1L1	*Niemann-Pick C1-like 1 protein*

OSM	*oncostatin M*
PCSK9	*proprotein convertase subtilisin-kexin type 9*
PDGF	*platelet-derived growth factor*
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PTCA	perkutante transluminale Koronaranglioplastie (*percutaneous transluminal coronary* angioplasty)
RA	rheumatoide Arthritis
ROR	*retinoic acid receptor-related orphan receptor*
SAA	Serum-Amyloid A
scFv	*single chain variable fragment*
SHP2	*src-homology 2-containing phosphotyrosine phosphatase*
sIL-23R	löslicher (*soluble*) Interleukin-23 Rezeptor
SNP	*single nucleotide polymorphisms*
SOCS	*suppressor of cytokine signaling*
STAT	*signal transducer and activator of transcription*
SyCyR	*synthetic cytokine receptor*
T-bet	*T-box expressed in T cells*
TGF-β	*transforming growth factor-β*
T_H	T-Helfer
TNF	Tumornekrosefaktor
T_{reg}	regulatorische T-Zellen
TYK	Tyrosinkinase
VHH	Nanobody
V-Region	variable-Region eines Antikörpers
ZNS	zentrales Nervensystem

Die Abkürzungen der Aminosäuren erfolgten nach dem internationalen Einbuchstabencode. Die Position der Aminosäure wurde durch eine Zahl hinter dem Einbuchstabencode kenntlich gemacht.

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen, deren Ursachen und Therapieansätze

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den häufigsten Krankheiten und Todesursachen. Diese Erkrankungen führen in der westlichen Welt immer weiter zu steigenden Kosten in der Gesundheitsvorsorgung [1]. Auch in Deutschland sind 44% der Todesfälle im Jahr 2015 auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen [2]. Die chronisch ischämische Herzkrankheit ist die meist verbreitete Todesursache innerhalb der Herz-Kreislauf-Erkrankungen, gefolgt vom akuten Myokardinfarkt (s. Abbildung 1) [3].

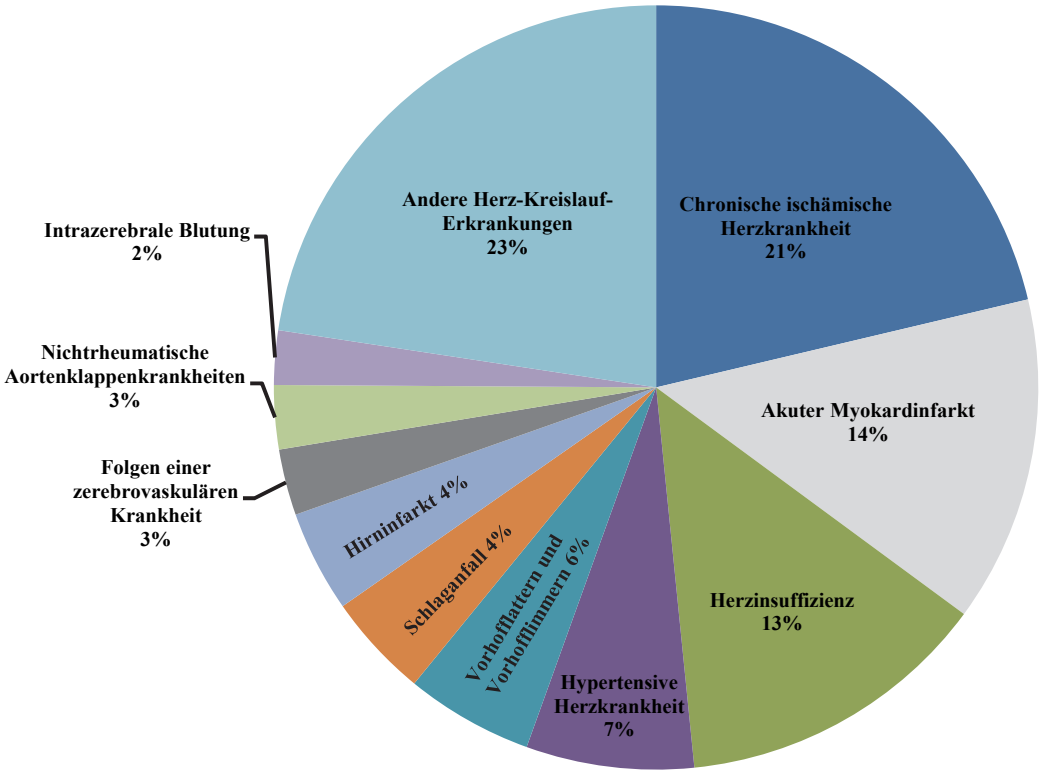


Abbildung 1: Übersicht der Todesursachen im Rahmen der Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland im Jahr 2015. Prozentuelle Angaben der Todesfälle, die durch eine Herz-Kreislauf-Erkrankung in Deutschland im Jahr 2015 bedingt waren. Die Daten wurden dem statistischen Bundesamt, Wiesbaden, entnommen [3].

Viele Ursachen für kardiovaskuläre Erkrankungen konnten bislang nicht aufgeklärt werden. Studien zeigten, dass vor allem erhöhter Blutdruck, Übergewicht, übermäßiger Alkoholkonsum,

Rauchen und hohes Alter ein Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellen [4-6]. Aber auch Vorerkrankungen, wie Diabetes mellitus [7], Dyslipidämie [8], Atherosklerose [9] und chronische Nierenkrankheiten [10] fördern die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen. Des Weiteren wurden kürzlich neuartige Risikofaktoren entdeckt, wie überschüssiges Homocystein im Blut, Entzündung und abnorme Blutgerinnung, die zur Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen beitragen [11]. Um verbesserte Behandlungsergebnisse in Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu erzielen, wurden neue pharmakologische Therapien entwickelt. Viele Therapieansätze zielen vor allem auf atherogene Lipoproteine. Bereits zwei Antikörper wurden zur Behandlung zugelassen, die das *low-density lipoprotein cholesterol* (LDL-C) beim Menschen reduzieren [12]. Evolocumab und Alirocumab sind monoklonale Antikörper, die sich gegen *proprotein convertase subtilisin-kexin type 9* (PCSK9) richten und das zirkulierende LDL-C um mehr als die Hälfte senken und somit kardiovaskuläre Folgeschäden reduzieren [13]. Ezetimib ist ein oral verfügbarer Inhibitor, der sich gegen das Darmcholesterin-Transportprotein *Niemann-Pick C1-like 1 protein* (NPC1L1) richtet, sich jedoch zur Reduktion des LDL-C als weniger effektiv erwiesen hat im Vergleich zu den monoklonalen Antikörpern Evolocumab und Alirocumab [14]. Neben vielen weiteren Medikamenten zur Behandlung der Folgen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, scheinen Interleukin (IL)-1 Blocker einen vielversprechenden Therapieansatz darzustellen. IL-1 ist als Vermittler von Entzündungsreaktionen bekannt, die zur Entstehung eines akuten Myokardinfarkts beitragen [15]. Canakinumab ist ein humaner, monoklonaler Antikörper, der sich direkt gegen die β-Isoform von IL-1 richtet. Patientenstudien ergaben, dass durch die Behandlung mit Canakinumab der primäre Endpunkt des nicht-tödlichen Myokardinfarkts um 15% reduziert war [16]. All die genannten Therapieansätze fokussieren sich darauf, das Fortschreiten der kardiovaskulären Erkrankungen zu verzögern und nicht die Ursache zu beheben. Neue Therapieansätze sollten vor allem auf die Regeneration des Herzmuskelgewebes nach kardiovaskulären Ereignissen zielen. Um das zu erreichen, sind weitere biochemische Untersuchungen notwendig.

1.1.1. Myokardinfarkt und die Folgen der Reperfusion

Weltweit ist der Myokardinfarkt einer der Hauptursachen für Tod und Behinderungen. Um die metabolischen Anforderungen des Herzmuskels zu gewährleisten, wird das Herz mit Sauerstoff versorgt. Kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen der myokardialen Sauerstoffversorgung und dem Sauerstoffbedarf, können die Herzmuskelzellen nicht mehr mit ausreichend

sauerstoffreichem Blut perfundiert werden und es kommt zu einem Myokardinfarkt [17]. Der häufigste Grund für das Versagen der myokardialen Sauerstoffversorgung ist die Okklusion einer arteriosklerotischen Koronararterie [17, 18]. In Folge dessen entsteht eine Myokardischämie distal der Stenose. Persistiert die Ischämie für längere Zeit, kommt es zur Koagulationsnekrose. In Tiermodellen geschieht dies bereits nach weniger als 20 Minuten [19]. Abschließend erfolgt der Umbau des zerstörten Myokards in eine bindegewebshaltige Narbe, welche keine kontraktilen Funktionen mehr aufweist und somit die ventrikuläre Herzfunktion stark beeinträchtigt. Je nach Größe der Narbe kann der Myokardinfarkt letale Folgen auf Grund eines progressiven chronischen Herzversagens haben [20]. Der Myokardinfarkt kann klinisch unter anderem mittels Elektrokardiographie (EKG), laborchemischen Parametern, Echokardiographie, *magnetic resonance imaging* (MRI) und Koronarangiographie diagnostiziert werden. Das EKG kann bei einem akuten Myokardinfarkt zu Veränderungen der Q-Zacke, des QRS-Komplexes, der ST-Strecke oder der T-Welle führen. Speziell eine ST-Hebung ist ein frühes Kennzeichen für eine transmurale Myokardischämie [21]. Laborchemisch kann unter anderem das kardiale Troponin ein Indikator für einen akuten Myokardinfarkt sein. Es wird beim Untergang von Myokardzellen freigesetzt und ist herzmuskelspezifisch. Troponin ist ein wichtiges Protein im kontraktilen Apparat von Muskelzellen [22]. Die Echokardiographie ist eine Ultraschalluntersuchung, bei der Wandbewegungsstörungen, die linksventrikuläre Funktion und Komplikationen schnell und ohne Strahlenbelastung erkannt werden können [23]. Um nach der Öffnung der Okklusion den Rückfluss des sauerstoffreichen Blutes zu beurteilen, wird das MRI verwendet. Das MRI ist vergleichbar mit der Echokardiographie, hat jedoch eine höhere räumliche und zeitliche Auflösung. Mit Hilfe von Kontrastmitteln kann die Größe des interstitiellen Raumes gemessen und somit das Ausmaß vom Myokardinfarkt beurteilt werden [24-27]. Des Weiteren dient die Koronarangiographie als gleichzeitig interventionelles bildgebendes Verfahren. Die Koronarangiographie ist eine kontrastmittelgestützte Röntgenuntersuchung, bei der mit Hilfe eines Herzkatheters Okklusionen der Koronararterien dargestellt und mittels perkutaner transluminaler Koronaranglioplastie (PTCA) therapiert wird [28]. Bei der PTCA werden die Koronargefäße durch eine Ballondilatation wieder erweitert und mittels Stent-Einlage längerfristig offen gehalten [29]. Durch die wiederhergestellte Koronarperfusion wird die Expansion der Infarktgröße begrenzt und somit die Myokardfunktion langfristig aufrecht erhalten [30].

Durch die wiederhergestellte Koronarperfusion kann das ischämische Myokard erneut mit Blut versorgt werden. Diese Reperfusion ist die effektivste Methode, um die Expansion der Infarktgröße zu begrenzen, die Myokardfunktion langfristig aufrecht zu erhalten, den kardialen Umbau (Remodeling) zu verändern und die Mortalitätsrate zu reduzieren [20, 31]. Die Reperfusion bleibt jedoch nicht ohne Folgen, denn sie induziert einen zusätzlichen Schaden am Myokardgewebe, welcher anschließend zur Nekrose führt [32, 33]. Die Ursachen hierfür sind meist vielfältig. Experimentelle Studien zeigten, dass eine erneute Durchblutung des ischämischen Gewebes zu oxidativem Stress führt und dabei einen Reperfusionsschaden vermittelt [34]. Bei der Reoxygenierung des ischämischen Myokards werden freie Sauerstoffradikale gebildet, die in hohem Maße Zellschädigung hervorrufen [34]. Außerdem hemmt oxidativer Stress während der myokardialen Reperfusion die Verfügbarkeit von Stickoxiden, welche eine kardioprotektive Rolle besitzen, indem sie unter anderem die gebildeten Superoxidradikale inaktivieren [35]. Des Weiteren kommt es während der myokardialen Reperfusion zu einem starken Anstieg an Ca^{2+}. Aufgrund des dadurch entstehenden intrazellulären und mitochondrialen Ca^{2+} Überschusses, wird die Apoptose von Kardiomyozyten induziert [36]. Eine weitere Folge der Reperfusion ist die rapide Wiederherstellung des physiologischen pH-Wertes, welche ebenfalls zu einem verstärkten Reperfusionsschaden beiträgt [37]. Nicht zuletzt werden bei einer Myokardreperfusion Zytokine freigesetzt, die eine intensive Entzündungsreaktion triggern. Interleukinkaskaden führen zur Aktivierung von Immunzellen, die zunächst in die Infarktzone und anschließend in das nicht ischämische Myokardgewebe einwandern. Neutrophile Granulozyten vermitteln einen starken Gewebsschaden, da sie vaskuläre Verstopfungen verursachen und reaktive Sauerstoffspezies freisetzen [31, 38]. Da Zytokine und deren Rezeptoren die Fähigkeit haben Entzündungsprozesse zu steuern, könnten neben IL-1, weitere Zytokine neue Ziele für therapeutische Interventionen darstellen [39].

1.1.2. Merkmale der Zytokine

Zytokine sind eine vielfältige Gruppe kleiner Proteine, die von Zellen zum Zweck der interzellulären Signalgebung und Kommunikation sezerniert werden. Als interzelluläre Mediatoren wirken sie auf viele verschiedene Zielzellen bereits im Piko- bis Nanogramm-Bereich. Zytokine haben eine autokrine, parakrine oder endokrine Aktivität und rufen eine Vielzahl von Reaktionen durch Rezeptorbindungen hervor, abhängig vom Zytokin und der Zielzelle. Zytokine übernehmen viele Funktionen innerhalb der Zelle, zu denen unter anderem

die Kontrolle der Zellproliferation und -differenzierung, die Regulation der Angiogenese, sowie Immun- und Entzündungsreaktionen zählen. Des Weiteren besitzen sie einen gewissen Grad an Redundanz, denn verschiedene Zytokine können eine ähnliche biologische Reaktion herbeirufen [40-42]. Sie werden auf der Grundlage ihrer biologischen Reaktionen, in pro- und anti-entzündliche Zytokine, entsprechend ihrer verwendeten Rezeptoren oder ihrer dreidimensionalen Strukturen, klassifiziert [43].

1.2 Die IL-12-Familie

Die IL-12-Familie, zu der IL-12, IL-23, IL-27, IL-35 und IL-39 gehören, zeichnet sich dadurch aus, dass sie nur heterodimere Zytokine umfasst [44]. Trotz vieler struktureller Ähnlichkeiten zwischen den Zytokinen der IL-12-Familie, ihren Rezeptoren und nachgeschalteten Signalkomponenten, besitzen sie sehr unterschiedliche biologische Aktivitäten [45]. IL-12 und IL-23 haben hauptsächlich pro-entzündliche und -stimulatorische Funktionen und sind an der Differenzierung von Subpopulationen der T-Helferzellen (T_H1 und T_H17) beteiligt [46, 47]. IL-27 wird häufig als ein pro-entzündliches Zytokin beschrieben, [48, 49], jedoch stützen immer mehr Beobachtungen die Ansicht, dass IL-27 eher ein immunregulatorisches Zytokin ist [50-52]. Es ist bekannt, dass IL-27 eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von T_H1-Zellen spielt, indem es die IL-12 Reaktionsbereitschaft in einer parakrinen Weise steuert [53]. Die neuesten Mitglieder der IL-12-Familie sind die Zytokine IL-35 und IL-39 (auch bekannt als IL-X). IL-35 ist ein entzündungshemmendes und inhibitorisches Zytokin, welches von B-Zellen und dendritischen Zellen (DCs) produziert wird [54, 55]. Ohne die Induktion von Apoptose unterdrückt IL-35 die Proliferation von T-Zellen, indem es in der G1 Phase den Zellzyklusstillstand induziert [55-57]. Eine Reduktion der IL-35 Expression scheint z.B. die Entwicklung von rheumatoider Arthritis (RA) zu fördern [58]. IL-39 zeigt dagegen eher pro-entzündliche Eigenschaften und wird ebenfalls wie IL-35 von aktivierten B-Zellen und DCs sezerniert [59]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass IL-39 eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie vom systemischen Lupus erythematodes spielt [59].

1.2.1 Zusammensetzung der IL-12-Familie, ihrer Rezeptoren und Signalkomponenten

Die IL-12-Familie repräsentiert Vertreter der Klasse 1 hämatopoetischer Zytokine. Jedes Mitglied dieser Familie besteht aus einer α- und einer β-Untereinheit, die strukturelle Ähnlichkeiten zur IL-6-Familie aufweisen [60, 61]. Die bekannten α-Untereinheiten sind IL-12p35, IL-23p19 und

IL-27p28 und die ß-Untereinheiten p40 und *Epstein-Barr virus-induced gene 3* (EBI3) [44]. Die Koexpression beider Ketten ist für die Sekretion des bioaktiven Zytokins erforderlich [62]. IL-12 besteht aus der α-Untereinheit p35 und der β-Untereinheit p40, wohingegen IL-23 einen Komplex aus der α-Untereinheit p19 und der β-Untereinheit p40 bildet [62, 63]. Die Untereinheiten dieser Interleukine sind durch je eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. IL-27 interagiert mit der α-Untereinheit p28 und der β-Untereinheit EBI3, die hingegen keine Disulfidbindung aufweist [64, 65]. Obwohl der Komplex aus der α-Untereinheit p35 und der β-Untereinheit EBI3 bereits 1997 beschreiben wurde [66], erfolgte die Namensgebung zu IL-35 erst nach einer funktionellen Wiederentdeckung [56]. Eine Disulfidbindung zwischen den Untereinheiten konnte auch hier nicht beobachtet werden [67]. IL-39, das neueste Mitglied der IL-12-Familie, ist aus der α-Untereinheit p19 und der β-Untereinheit EBI3 zusammengesetzt, die womöglich durch Disulfidbindung miteinander verbunden sind [59, 68].

Die Liganden-induzierte Signalweiterleitung erfolgt über Rezeptoruntereinheiten, die von mehreren Zytokinen genutzt werden [69]. Der IL-12 Rezeptorsignalkomplex wird durch die Bindung von IL-12 an den IL-12 Rezeptor β1 (IL-12Rβ1) und IL-12 Rezeptor β2 (IL-12Rβ2) aktiviert [70, 71], wohingegen die IL-23 Signalweiterleitung durch die Bindung von IL-23 an IL-12Rβ1 und IL-23 Rezeptor (IL-23R) vermittelt wird [63, 72]. Im Gegensatz dazu interagiert IL-27 mit dem Glykoprotein 130 (gp130) und dem Rezeptorprotein WSX-1 [73]. IL-35 unterscheidet sich von den anderen Zytokinen dadurch, dass es über mehrere Signalkomplexe signalisieren kann [74, 75]. Bereits vier Rezeptorkomplexe konnten für IL-35 beschrieben werden: IL-12Rβ2:gp130, IL-12Rβ2: IL-12Rβ2, gp130:gp130 und IL-12Rβ2:WSX-1 [75, 76]. Bei IL-39 wird hingegen angenommen, dass die Signalweiterleitung durch die Bindung des Zytokins an IL-23R und gp130 erfolgt [68, 77]. Gp130 ist nicht nur für die Signalgebung einiger Zytokinmitglieder der IL-12-Familie notwendig, sondern ist außerdem der Hauptrezeptor der IL-6-Familie [78].

In Publikation 3 (s. Kapitel 5) wurde durch Generierung chimerer Rezeptoren die biologische Aktivität aller beschriebenen IL-35- und postulierter IL-39-Rezeptorkmplexe in der murinen prä-B-Zelllinie Ba/F3 untersucht [68]. Außerdem gelang die Entdeckung weiterer bioaktiver IL-6/IL-12-artiger Rezeptorkomplexe, zusammengesetzt aus gp130:IL-12Rβ1 und IL-23R:IL-12Rβ2, die eine Signalweiterleitung induzierten [68].

Ein wichtiges Merkmal von Zytokinrezeptoren ist deren Assoziation mit Familienmitgliedern der Januskinasen (JAKs), die essentiell für die Signalweiterleitung sind [60].

JAK1, JAK2 und Tyrosinkinase (TYK)2 induzieren die Rekrutierung und die darauffolgende Aktivierung spezifischer Mitglieder der *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-Familie von Transkriptionsfaktoren. Dies zeigt wiederum die einzigartigen sowie überlappenden Muster der Gentranskription, die durch verschiedene Mitglieder der IL-12-Familie induziert werden [60, 79, 80]. Die Rezeptoren des IL-12 sind assoziiert mit JAK2 und TYK2 [81], welche hauptsächlich STAT4 aktivieren [82, 83], zu einem geringen Anteil jedoch auch STAT1, STAT3 und STAT5 [84, 85]. Die biologische Aktivität von IL-23 auf seine Zielzellen wird, wie bei IL-12, durch die Aktivierung von JAK2 und TYK2 vermittelt, die überwiegend die Phosphorylierung von STAT3, aber auch STAT1, STAT4 und STAT5 initiieren [72, 86]. IL-27 aktiviert JAK1, JAK2 und TYK2, die anschließend die Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT2, STAT3 und STAT5 phosphorylieren [87]. Da die Zusammensetzung der signalgebenden IL-35 Rezeptoren sehr variabel ist [75], werden sehr wahrscheinlich je nach Komplexbildung unterschiedliche Mitglieder der JAKs aktiviert, die noch ungeklärt sind [88]. Interessanterweise wurde bislang in T-Zellen gezeigt, dass nach Bindung des IL-35 an gp130:IL12Rβ2 Heterodimer lediglich STAT1 und STAT4 phosphoryliert wurden. Auch über gp130- bzw. IL-12Rβ2 Homodimer erfolgte eine STAT1 und STAT4 Aktivierung [75]. Die IL-35 Signalweiterleitung über IL-12Rβ2:WSX-1 induzierte hingegen die Phosphorylierung von STAT1, STAT3, STAT4 und STAT5 in T-Zellen und STAT1, STAT3 und STAT5 in B-Zellen [89]. Die Regulation und die Ausführung der unterschiedlichen IL-35-induzierten STAT Aktivierungsmuster auf der Rezeptor-/Zellebene sind bis heute unbekannt [68]. IL-39 kann dagegen hauptsächlich STAT1 und STAT3 induzieren [59]. Mit welchen JAKs die spezifischen Rezeptoren des IL-39 assoziiert sind, wurde ebenfalls noch nicht beschrieben.

In Publikation 3 (s. Kapitel 5) wurde die synthetische IL-35- und IL-39-Aktivierung in Hinsicht auf die STAT Signalgebung untersucht [68]. Im Gegensatz zu den bereits dargestellten Ergebnissen in wissenschaftlichen Publikationen [75], die in diesem Kapitel beschrieben wurden, zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit, dass alle vier IL-35 Rezeptorkomplexe konventionelle STAT Signale, wie unter anderem STAT1 und STAT3, aktivierten. Dagegen konnte die Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 bei der IL-39-induzierten Signaltransduktion in Publikation 3 bestätigt werden [68].

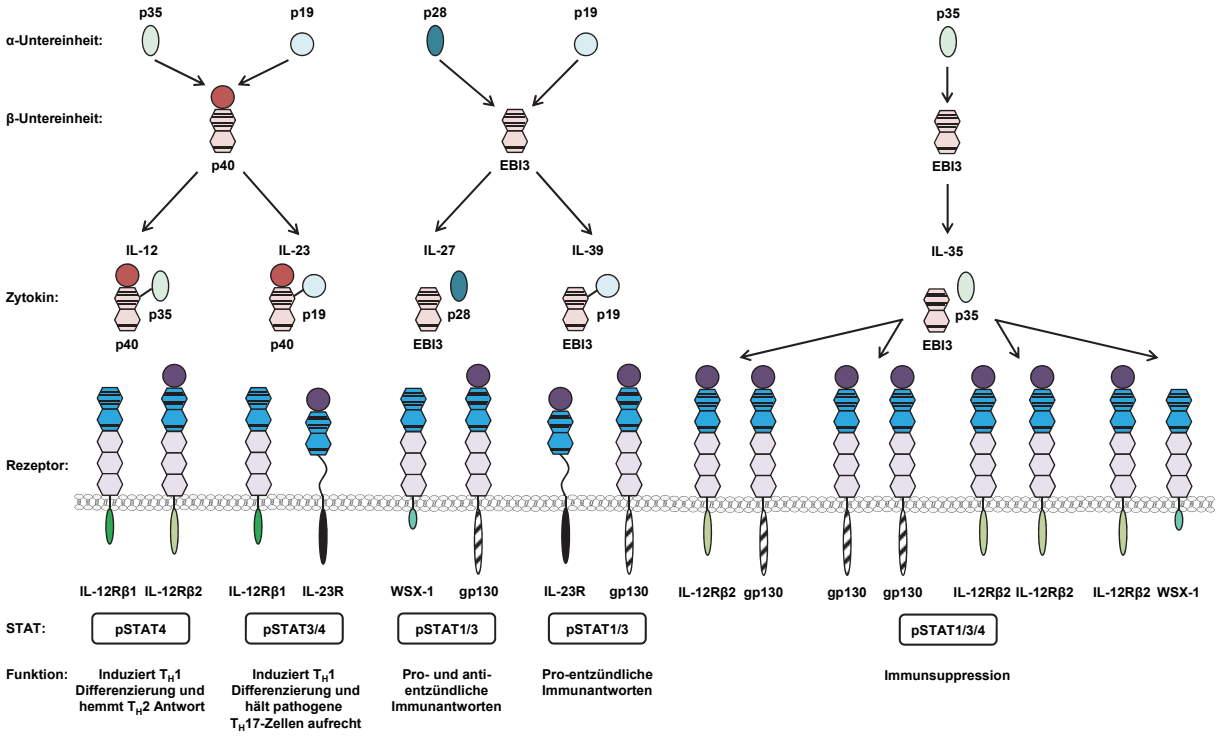


Abbildung 2: Zytokine der IL-12-Familie. Die Zytokine der IL-12-Familie weisen pleiotrope Funktionen auf und spielen eine wichtige Rolle innerhalb des Immunsystems. Sie bestehen aus einer α- und β-Untereinheit, die für eine biologische Aktivität miteinander interagieren und teilen sich neben den Zytokinuntereinheiten auch einzelne Rezeptorketten. Zur Aktivierung der Rezeptoren bindet das Zytokin IL-12 an IL-12Rβ1 und IL-12Rβ2, während IL-23 mit IL-12Rβ1 und IL-23R interagiert. Die IL-27 Signalweiterleitung erfolgt über ein WSX-1:gp130 Heterodimer. Das Zytokin IL-35 signalisiert über unterschiedliche Rezeptorkomplexe, wie IL-12Rβ2:gp130 Heterodimer, IL-12Rβ2:WSX-1 Heterodimer, IL-ββ2 Homodimer und gp130 Homodimer. IL-39, das neueste Mitglied der IL-12-Familie, wirkt sehr wahrscheinlich auf seine Zielzellen über IL-23R und gp130. Die biologisch aktiven Rezeptorkomplexe initiieren die Phosphorylierung konventioneller STAT Moleküle, die auf Ebene der Gentranskription das Immunsystem kontrollieren. Jedes einzelne Zytokin weist unterschiedliche Funktionen innerhalb des Immunsystems auf. Während IL-12 an der Differenzierung von T_H1-Zellen beteiligt ist, hält IL-23 den pathogenen Phänotyp von T_H17-Zellen aufrecht. IL-27 fördert sowohl eine pro-, als auch eine anti-entzündliche Immunantwort, wohingegen IL-35 ausschließlich immunsuppressive Effekte aufweist. Von dem Zytokin IL-39 ist bislang bekannt, dass es an pro-entzündlichen Immunantworten beteiligt ist. Die Darstellung ist modifiziert nach Vignali *et al.* 2012 [45], Langrish *et al.* 2005 [90] und Hasegawa *et al.* 2016 [77].

1.2.2 Das Zytokin IL-23 und seine spezifischen Rezeptoren

Humanes und murines IL-23 weisen ähnliche biologische Aktivitäten wie IL-12 auf. Beide Zytokine werden von entzündlichen, myeloiden Zellen produziert und induzieren die Proliferation und IFN-γ-Produktion [63, 91]. Im Vergleich zu IL-12 fördert IL-23 jedoch nicht die T_H1-, sondern vorzugsweise die T_H17-Immunität sowohl im humanen, als auch im murinen System [46, 47]. Die Regulation von T_H17-Zellen durch IL-23 ist entscheidend für die antimikrobielle und antimykotische Reaktion [92].

Der IL-23R wird auf T-Zellen, natürlichen Killerzellen, Monozyten und DCs exprimiert, sodass diese Zellen die Fähigkeit haben, auf IL-23 zu reagieren [41, 72]. Er besteht aus einem extrazellulären Teil, der für den Transport zur Zellmembran benötigt wird und aus einer N-terminalen Immunoglobulin (Ig)-ähnlichen Domäne 1 (D1) und zwei Zytokinbindedomänen (D2, D3) [93]. Die extrazelluläre Domäne (ECD) ist durch eine Gelenkregion mit der Transmembrandomäne (TMD) verbunden, gefolgt von einer intrazellulären Domäne (ICD), die sieben Tyrosinreste aufweist, welche für die Signaltransduktion von großer Bedeutung sind [72]. Der IL-23R ist assoziiert mit JAK2 [72]. Im Vergleich zum IL-23R weist der IL-12Rβ1 keine N-terminale Ig-ähnliche Domäne auf und besitzt fünf Tandem Fibronektin Typ III (FNIII) Domänen, von denen zwei Zytokinbindedomänen sind [94]. Der intrazelluläre Teil des IL-12Rβ1 beinhaltet das Box1- und Box2-Motiv, sowie ein Tyrosinrest im murinen, jedoch nicht im humanen Rezeptor [94-96]. IL-12Rβ1 wird für die Bindung und Aktivierung von Kinasen benötigt und ist assoziiert mit TYK2 [72]. Für die IL-23 Signalgebung scheint jedoch TYK2 entbehrlich zu sein, die Assoziation von JAK2 mit dem IL-23R ist jedoch obligatorisch [86]. Außerdem zeigten Studien, dass unabhängig vom IL-12Rβ1 die IL-23R Homodimerisierung eine biologische Aktivität aufweist [93, 97].

In Publikation 2 (s. Kapitel 4) wurden neuartige *Synthetic Cytokine Receptors* (SyCyRs) generiert und mittels ihrer hochaffinen Liganden gezeigt, dass IL-23R Homodimere biologisch aktiv sind und eine IL-23-ähnliche Signaltransduktion vermitteln [98]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die IL-12Rβ1 Homodimerisierung zu keiner Signaltransduktion führt [98].

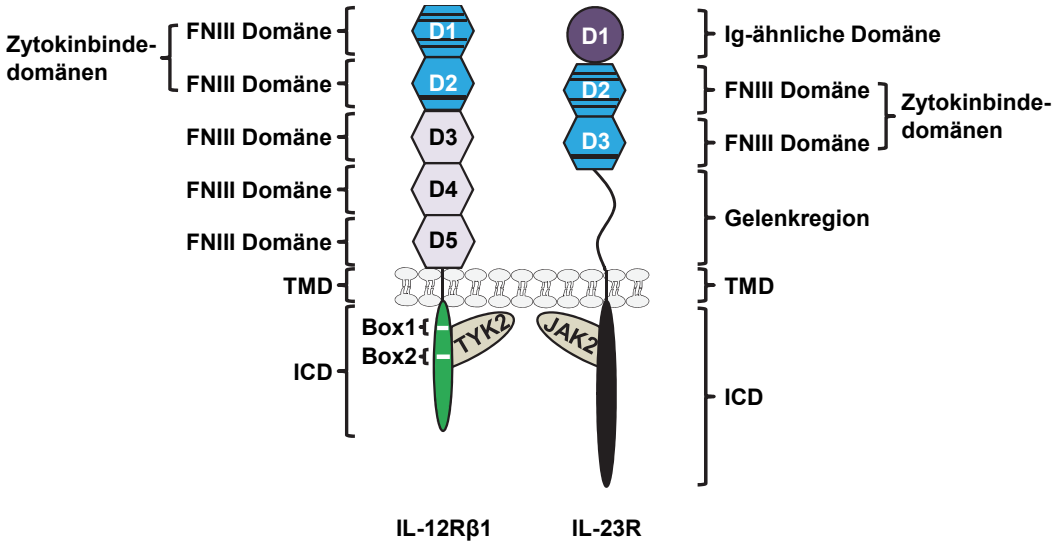


Abbildung 3: Strukturelle Eigenschaften des IL-23 Rezeptorkomplexes. Die IL-23 Signaltransduktion wird über den heterodimeren Rezeptorkomplex aus IL-12Rβ1 und IL-23R vermittelt. IL-12Rβ1 ist extrazellulär aus fünf FNIII Domänen (als Sechsecke dargestellt) aufgebaut, von denen die ersten zwei IL-23 binden. Die TMD verknüpft die ECD mit der ICD. Die ICD des IL-12Rβ1 beinhaltet das Box1- und Box2-Motiv und ist konstitutiv mit TYK2 assoziiert. Der IL-23R besteht N-terminal aus einer Ig-ähnlichen Domäne (als Kreis dargestellt) und aus zwei FNIII Zytokinbindedomänen, die durch eine Gelenkregion mit der TMD verbunden sind. Die ICD des IL-23R ist mit JAK2 assoziiert und spielt eine essentielle Rolle bei der IL-23 Signalweiterleitung. Die schematische Darstellung ist modifiziert nach Chua *et al.* 1995, Parham *et al.* 2002 [72] und Langrish *et al.* 2005 [90].

1.2.3 IL-23-induzierte Signalwege

Die IL-23-induzierte Signalweiterleitung erfolgt durch die Bindung des IL-23 an seine spezifischen Rezeptoren (s. Kapitel 1.2.1). IL-23 bewirkt eine Heterodimerisierung und Konformationsänderung der extrazellulären Rezeptordomänen [93, 99]. Die mit dem IL-23R assoziierte JAK2 und mit dem IL-12Rβ1 assoziierte TYK2 werden in unmittelbare Nähe gebracht und somit transphosphoryliert [100-102]. Die dadurch induzierte Kinaseaktivität führt zur Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste vom IL-23R, um somit unter anderem Adapterstellen für STAT3 Proteine zu schaffen [45, 103]. Die Aktivierung von STAT3 führt zur Homodimerisierung dieser Moleküle, die anschließend in den Zellkern translozieren, wo sie an spezifische Erkennungssequenzen der DNA binden [103-105]. IL-23 reguliert auf diese Weise die Produktion weiterer Zytokine, wie IL-17, IL-21 und IL-22 [106-108]. Die IL-23 Signaltransduktion weist eine langanhaltende Phosphorylierung von STAT3 auf. Dies deutet darauf hin, dass der IL-23R, im Gegensatz zu gp130, keine negative Rückkopplung durch *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) erfährt [109, 110]. Des Weiteren löst die IL-23 induzierte JAK2 Aktivierung den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-, den *nuclear factor of kappa*

light polypeptide gene enhancer in B-cells (NF-κB)- und den *extracellular signal-regulated kinase* 1/2 (ERK1/2) Signalweg aus [109, 111]. Die PI3K-Familie reguliert Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung, Überleben und intrazellulären Transport [112]. Die Aktivierung von PI3K führt zur Phosphorylierung von AKT [113, 114]. Neueste Erkenntnisse zeigen, dass der IL-23 induzierte PI3K/AKT Signalweg die Produktion von IL-17 und IL-22 steigert [115]. NF-κB ist entscheidend für die Immunantwort [116]. Es ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der die Genexpression von Zytokinen und weiterer kostimulatorische Moleküle in Zellen induziert [117]. Der Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Sezernierung von IL-23p19 und IL-12p40. NF-κB bindet dabei an den p19 und p40 Promotor und steuert so die Expression von IL-23 in murinen Makrophagen und DCs [118-121]. ERK gehört zur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Familie [122] und ist ein Aktivator von Transkriptionsfaktoren, die zur Genexpression führen [123]. Die Kaskade von ERK spielt eine wichtige Rolle beim Zellwachstum, Differenzierung, Zellüberleben, Genexpression, Mitose, Zellmotilität, Stoffwechsel, Apoptose und Embryogenese [124, 125]. Eine Fehlregulation dieser Kaskade wird mit verschiedenen Krankheiten, wie Niereninfarkt und Krebs, in Verbindung gebracht [126, 127]. Wissenschaftliche Studien zeigen, dass ERK die Produktion von IL-23 durch DCs steuert [128, 129].

Für die IL-23-induzierten Signalwege wurde beschrieben, dass diese durch drei von sieben Tyrosinresten des IL-23R (Y416, Y504 und Y626 im murinen System) vermittelt werden [72]. Unter Verwendung ortsspezifischer Mutagenese- und Deletionsvarianten innerhalb der ICD des murinen IL-23R, konnten Floss *et al*. 2013 die genauen Aminosäuren identifizieren, die als Aktivierungsstellen für die signalvermittelnden Moleküle dienten [109]. Für die Aktivierung der Signalwege STAT und MAPK wurde zu den vorhergesagten C-terminalen Aminosäuren Y504 und Y626 zusätzlich die Bindestelle Y542 innerhalb des IL-23R identifiziert [72, 109]. Die Phosphorylierung von ERK1/2 erfolgte dagegen in Kombination mit Y416 und den C-terminalen Aminosäuren Y504/Y542/Y626. Der PI3K/AKT Signalweg wurde durch ein einziges phosphoryliertes Y416 induziert. Auf Grundlage dieser identifizierten Aminosäuren, wurden IL-23-*signaling*-defiziente Mäuse (IL-23R-Y416FΔICD) generiert, welche in Publikation 1 (s. Kapitel 3) beschrieben sind, um den Einfluss der IL-23-induzierten Signalwege nach Myokardinfarkt zu untersuchen [130].

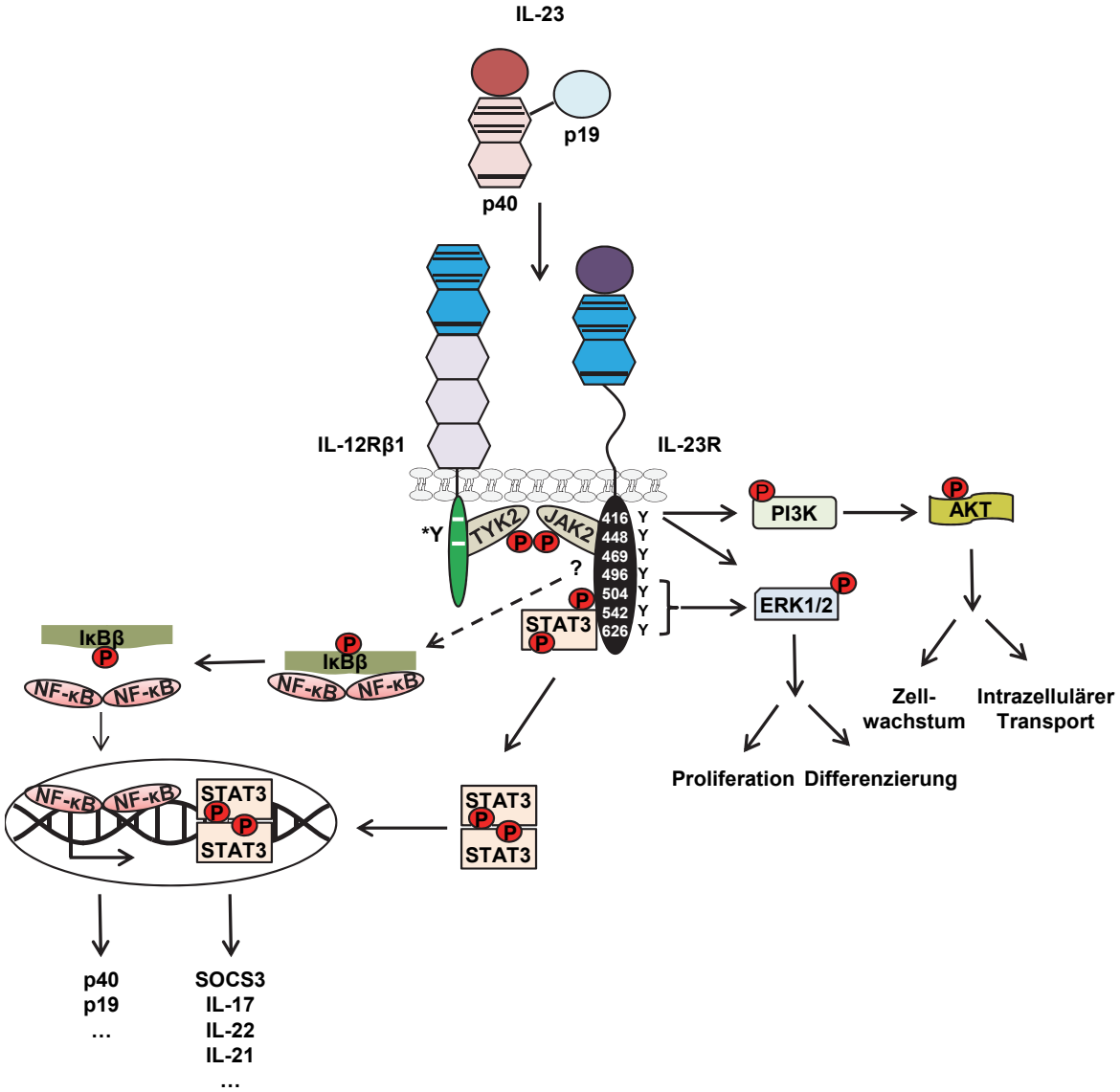


Abbildung 4: Schematische Darstellung der IL-23-induzierten Signalwege.Die Aktivierung des IL-23 Rezeptorkomplexes ermöglicht die Transphosphorylierung der Januskinasen. Die dadurch induzierte Kinaseaktivität vermittelt die Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste innerhalb des IL-23R, die als Adapterstellen für die nachgeschalteten Signalmoleküle dienen. Die Phosphorylierung von STAT3-Molekülen erfolgt über die Tyrosinreste Y504/Y542/Y626. Die aktivierten STAT3-Moleküle homodimerisieren, binden im Nukleus an die DNA und initiieren unter anderem die Gentranskription von *SOCS3*, *IL-17*, *IL-22* und *IL-21*. Durch die IL-23 Signaltransduktion erfolgt außerdem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB, der ebenfalls als Homodimer in den Nukleus transloziert und die Genexpression von Zytokinuntereinheiten reguliert. Die Aminosäuren, die zur Aktivierung des NF-κB Signalwegs führen, wurden bislang nicht identifiziert. Das phosphorylierte Y416 vermittelt in Kombination mit Y504/Y542/Y626 die Aktivierung von ERK1/2, welches die zelluläre Proliferation und Differenzierung reguliert. Die Phosphorylierung von AKT erfolgt über die PI3K, dessen Aktivität über phosphoryliertes Y416 induziert wird. AKT ist an zellulären Prozessen, wie z.B. an Wachstum und am Proteintransportmechanismus, beteiligt. Die Darstellung wurde modifiziert nach Di Cesare *et al.* 2009 [131], Langrish *et al.* 2005 [90] und Floss *et al*. 2013 [109]. * Ausschließlich die intrazelluläre Domäne des murinen IL-12Rβ1 beinhaltet einen Tyrosinrest, der nicht an der Signaltransduktion beteiligt ist.

1.2.4 Transphosphorylierung der Januskinasen innerhalb der Zytokinrezeptoren

Die Transphosphorylierung ist ein wichtiger Prozess innerhalb der Zytokin-induzierten Signaltransduktion. Zytokinrezeptoren weisen eine fehlende intrinsische katalytische Aktivität auf und benötigen für die Signalweiterleitung Rezeptor-assoziierte zytoplasmatische JAKs [132-134]. JAKs sind konstitutiv assoziiert mit prolinreichen Box1- und Box2-Erkennungsmotiven, welche sich innerhalb der Zytokinrezeptoren befinden [135, 136]. Floss und Mitarbeiter fanden heraus, dass JAKs mit den Peptidmotiven innerhalb des IL-23R, die zwischen Aminosäure 403-479 liegen, interagieren [109]. Eine vollständige oder partielle Deletion dieser Aminosäuren resultiert in einer fehlenden JAK Aktivierung und somit auch in einem Ausbleiben der Transphosphorylierung [86, 109]. Auf Grundlage dieser Ergebnisse konnte in Publikation 2 (s. Kapitel 4) mittels eines gebildeten trimeren SyCyR-Komplexes, bestehend aus zwei JAK-aktiven, aber STAT-defizienten SyCyRs und einem JAK-inaktiven, jedoch STAT-bindendem SyCyR, erstmals eine STAT3-Transphosphorylierung für Januskinase-assoziierte Zytokinrezeptoren dargelegt werden [98].

1.2.5 Die Rolle von IL-23 in immunologischen Prozessen und bei der Entwicklung diverser Erkrankungen

IL-23, welches von antigenpräsentierenden Zellen, wie Makrophagen, gebildet wird [137], ist ein Schlüsselzytokin bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen [138, 139]. Die Erkenntnis, dass der IL-23R unter anderem auf T_H17-Zellen und γδ-T-Zellen exprimiert wird [41, 72, 140] führte zu der Annahme, dass IL-23 für die Autoimmunität unerlässlich ist [72, 90, 141]. Diese These wurde durch wissenschaftliche Untersuchungen gestützt, die zeigten, dass IL-23 für die Differenzierung und Regulation von T_H17-Zellen essentiell ist [142]. Unreife T-Zellen entstehen im Knochenmark und wandern über das Blut in den Thymus, wo sie zur naiven T-Zelle reifen [143]. Die weitere Differenzierung in die Subpopulation der IL-17 produzierenden $CD4^+$ T_H17-Zellen wird durch die Zytokine IL-6 und *transforming growth factor-β* (TGF-β) vorangetrieben [144-146]. IL-6 aktiviert dabei STAT3 [147], welches die Transkription von spezifischen Genen steigert, die für den T_H17-Zellstatus wichtig sind. Hierzu zählen unter anderem *retinoic acid receptor-related orphan receptor c* (*Rorc*), *IL-17* und *IL-23R* [144, 148]. TGF-β spielt in der T_H17-Zelldifferenzierung eine konzentrationsabhängige Rolle [149]. Hohe Mengen an TGF-β inhibieren den IL-23R und induzieren IL-10 und *forkhead box P3* (FOXP3) und verhindern damit die Reifung der T-Zellen [150]. Aktiviertes STAT3 kann jedoch diesem Prozess entgegensteuern

und die TGF-β induzierte FOXP3 Expression hemmen und somit die Differenzierung regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) unterdrücken [144]. Werden niedrige Mengen an TGF-β freigesetzt, so fördert dies die Differenzierung von T_H17-Zellen, indem der Transkriptionsfaktor *T-box expressed in T cells (*T-bet) gehemmt wird [46]. Während IL-6 und TGF-β den essentiellen Schritt zur Differenzierung der naiven T-Zellen zu T_H17-Zellen einleiten, fördert IL-23 die terminale Ausbildung der T_H17-Zellen [90, 131, 151]. IL-23 besitzt die Fähigkeit, die Expression unter anderem von IL-17 und IL-22 zu induzieren [152-154]. Dieses Phänomen wurde ebenfalls in Publikation 1 (s. Kapitel 3) beobachtet. Die Analyse der Milzzellen von IL-23R-Y416FΔICD Mäusen ergab, dass die IL-17 Produktion signifikant reduziert war im Vergleich zu Zellen aus IL-23R Wildtypmäusen [130]. IL-23 übernimmt ebenfalls die Aufgabe zur Aufrechterhaltung des Potenzials von T_H17-Zellen zur Sezernierung von IL-17 [155]. Es kann seine Signalgebung verstärken, indem es *retinoic acid receptor-related orphan receptor* (ROR) γt induziert und in Kombination mit aktivem STAT3 die IL-23R Expression fördert [149, 156]. Außerdem wurde gezeigt, dass IL-23 den pathogenen T_H17-Phänotypen aufrechterhält [154]. Studien konnten zeigen, dass IL-23-aktivierte T_H17-Zellen während einer Infektion, Granulombildung und Autoimmunität die chronische Gewebeentzündung fördern [113, 157-159].

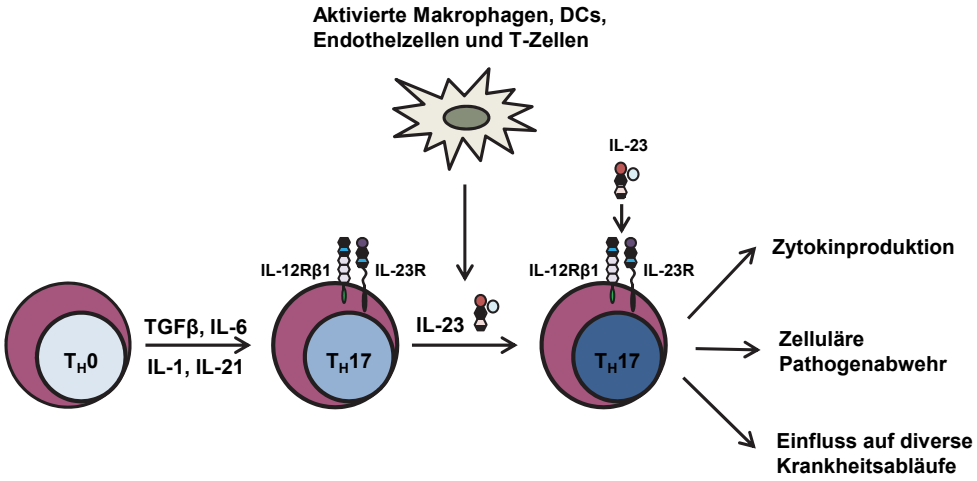


Abbildung 5: Die Zytokine der IL-6- und IL-12-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des T_H17-Phänotyps. Zytokine wie IL-6 und TGF-β im murinen System, als auch IL-1 und IL-21 im humanen System fördern die Differenzierung naiver T-Zellen in die Subpopulation der IL-17 produzierende $CD4^+$ T_H17-Zellen. Die terminale Ausbildung des T_H17-Phänotyps wird durch IL-23 eingeleitet, welches unter anderem von Makrophagen produziert wird. Hierbei signalisiert das Zytokin IL-23 über die Rezeptoren IL-12Rβ1 und IL-23R, die auf unreifen T_H17-Zellen exprimiert werden. Reife T_H17-Zellen sind an der Produktion weiterer Zytokine beteiligt und spielen eine essentielle Rolle innerhalb der zellulären Pathogenabwehr und bei der Entstehung diverser Erkrankungen. Die Darstellung ist modifiziert nach Ivanov *et al.* 2007 [151], Murugaiyan *et al.* 2009 [160] und Di Cesare *et al.* 2009 [131].

Das Zytokin IL-23 wird seit seiner Entdeckung mit Autoimmunerkrankungen, chronischen Entzündungen und Krebs in Verbindung gebracht [131, 161]. Sowohl in Tiermodellen als auch in Patientenproben konnte die pro-entzündliche Rolle von IL-23 in der Entstehung von diversen Krankheiten bestätigt werden [139, 162, 163]. Es wurde beobachtet, dass IL-23p19-defiziente Mäuse gegenüber der chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED), experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) und Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) geschützt sind, was vor allem in Verbindung mit einer verminderten IL-17-Produktion steht [141, 164, 165]. Im Gegensatz dazu zeigen transgene Mäuse mit der Überexpression der IL-23p19 Untereinheit chronische Entzündungen in vielen Organen, welche folglich zu einer erhöhten Letalität der Mäuse führt [166]. Weiterhin zeigen Mäuse bei Virusinfektionen eine starke Expression des IL-23p19 in sensorischen Ganglien und im zentralen Nervensystem (ZNS) [167]. Auch in humanen Studien konnte ein Zusammenhang von IL-23 auf die Entwicklung verschiedener Erkrankungen hergestellt werden. So wurde im Serum von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [168], RA [169] und multipler Sklerose (MS) [170] erhöhte Mengen an IL-23p19 gemessen. Ferner spielt IL-23 eine wichtige Rolle bei chronischer Hepatitis B. Die durch IL-23 expandierten T_H17-Zellen erhöhten den Schweregrad der Leberschädigung bei Patienten mit Hepatitis B Virus (HBV) [171-173]. In der Tumorforschung erweist sich der Wirkmechanismus von IL-23 als sehr komplex. Auf der einen Seite zeigen Studien, dass IL-12p40-defizient Mäuse, die mit einem chemischen Karzinogen behandelt wurden, häufiger Tumore entwickelten im Vergleich zu Kontrolltieren [174]. Auf der anderen Seite beobachteten Teng und Mitarbeiter 2010 bei IL-23p19-defizienten Mäusen, die ebenfalls mit einem chemischen Karzinogen behandelt wurden, dass diese nahezu keine Fibrosarkome ausbildeten, im Vergleich zu Wildtyptieren [175]. In Patienten mit kolorektalem Karzinom wurde ebenfalls festgestellt, dass IL-23 den Krankheitsverlauf beeinflusst, da bei diesen Patienten erhöhte Mengen an IL-23 im Serum detektiert wurden [176].

Ferner wurden mehrere *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) im *IL-23R* identifiziert, die zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber unterschiedlichen Erkrankungen führen [99]. SNPs sind die am häufigsten auftretende Art von Sequenzvariationen im Genom, die sowohl mit dem Risiko zur Entwicklung von unterschiedlichen Krebsarten, wie Magenkrebs oder Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre assoziiert sind [177-179], aber auch mit RA [180], CED und koronarer Herzkrankheit [181].

IL-23 ist ein wesentlicher Faktor in der Pathogenese vieler Erkrankungen und die Entwicklung molekularer Strategien zur Blockierung des IL-23 Signalweges ist somit von hoher Wichtigkeit. Derzeit wird bereits mehreren Strategien nachgegangen, indem die Zytokinuntereinheit p40 und dessen Dimer p80, der lösliche IL-23R (sIL-23R) und die neutralisierende Antikörper anti-p40 und anti-p19 zur Blockierung des IL-23R Komplexes untersucht werden [99]. Das gezielte Angreifen von p40 und p80, welche an IL-12Rβ1 binden [182, 183], resultiert demnach nicht nur in einer Inhibierung der IL-23 Signaltransduktion, sondern auch in einer Blockierung des IL-12 Rezeptorkomplexes [184, 185]. Ustekinomab, der bereits zur Behandlung von Psoriasis eingesetzt wird und Briakinumab, der sich noch in der klinischen Testphase befindet, sind Antikörper, die gegen die p40 Untereinheit gerichtet sind [186-188]. Für eine spezifische Inhibierung des IL-23 Signalweges wurde Guselkumab, ein monoklonaler Antikörper, der an die IL-23p19-Untereinheit bindet, ebenfalls zur Behandlung von Psoriasis in Europa und den USA zugelassen [189]. Ein weiterer Antikörper gegen IL-23p19 namens MP-196 befindet sich zurzeit in der klinischen Testphase [162].
Um weitere Therapieansätze für verschiedene Krankheiten zu entwickeln, ist die Etablierung neuer Methoden zur Untersuchungen der IL-23 Signalwege notwendig.

1.2.6 Die Rolle von Interleukin-23 in der myokardialen Ischämie

Im Verlauf einer myokardialen Ischämie entstehen Entzündungsreaktionen, die von Zytokinen gesteuert werden und den kardialen Umbau beeinflussen. Der ventrikuläre Umbau des ischämischen Gewebes in eine bindegewebshaltige Narbe kann in drei Phasen unterteilt werden: die entzündliche Phase, gefolgt von der proliferativen/adaptiven Phase und der Reifungsphase [190]. Etwa 3-72 Stunden nach der myokardialen Ischämie wird die frühe Entzündungsphase eingeleitet, in der es zu einer vermehrten Expression von pro-entzündlichen Chemokinen und Zytokinen kommt, die wiederum Immunzellen aktivieren und steuern. Anschließend folgt die adaptive/proliferative Phase (72 h bis 7 Tage nach Ischämie), in der Entzündungsreaktionen durch Sekretion anti-entzündlicher Zytokine und Chemokine unterdrückt werden. Der Aufbau der extrazellulären Matrix (EZM) erfolgt durch die Aktivierung der Myofibroblasten. Die synthetisierten Matrixmoleküle, wie Kollagene, Proteoglykane und Glykoproteine sorgen für ein mikrovaskuläres Netzwerk, welches die Expansion des Myokardschadens nach Ischämie und Reperfusion verhindert [190]. In der Reifungsphase (Tag 7-14 nach Ischämie) werden Matrixmoleküle, wie Kollagene und Hyaluronsäuren (HA), verstärkt exprimiert, um eine

gewebshaltige Narbe auszubilden [191]. Dieser Prozess soll die ventrikuläre Integrität aufrechterhalten und abgestorbene Herzmyozyten ersetzen [192].

Das Immunsystem und seine Zytokine leisten einen großen Beitrag zum ventrikulären Umbau des ischämischen Gewebes nach einem Myokardinfarkt [193]. Jedoch ist in den meisten Fällen nicht eindeutig geklärt, in welchem Ausmaß verschiedene Zytokine eine destruktive oder protektive Wirkung auf das Remodeling des Herzens nach Myokardinfarkt haben. Im Falle von IL-6 konnten abhängig vom zeitlichen Verlauf nach Myokardinfarkt beide Wirkungsweisen beobachtet werden. Die Produktion von IL-6 in der frühen Entzündungsphase zeigte eine protektive Wirkung auf das Remodeling. Eine destruktive Wirkung wurde dagegen beobachtet, wenn eine starke Expression von IL-6 auch in den späteren Phasen erfolgte [194]. IL-23 gehört ebenfalls zu den Zytokinen, bei dem die Rolle nach Myokardinfarkt nicht eindeutig geklärt werden konnte. Aufgrund der engen Verwandtschaft zu IL-6 ist auch dessen Beteiligung am myokardialen Remodeling naheliegend, da es auch Immunreaktionen und Regenerationen beeinflusst [195]. Mehrere experimentelle Untersuchungen konnten bereits die Wirkung der Signalwege von IL-23 auf den Myokardinfarkt feststellen. Der aktivierte JAK/STAT3 Signalweg zeigte in einem Ischämie/Reperfusions-Modell kardioprotektive Wirkungen. Phosphoryliertes STAT3 schützte unter anderem nach Einleitung der Reperfusion vor oxidativem Stress, indem es die Funktion von der Superoxiddismutase herunterregulierte [196]. Des Weiteren beeinflusste die Aktivierung von STAT3 die Herzfunktion nach Myokardinfarkt positiv, indem die myokardiale Kapillarisierung aufrechterhalten, der interstitielle Kollagenmetabolismus kontrolliert und das Überleben von Kardiomyozyten gefördert wurde [197]. Das Fehlen von STAT3 führte in Mäusen zu einer verstärkten Entzündungsreaktion und einer größeren bindegewebshaltigen Narbe [198]. Außerdem konnte auch die protektive Wirkung von ERK1/2 in der Myokardischämie gezeigt werden. ERK1/2 scheint die Phosphorylierung von STAT3 induzieren zu können und somit teilweise an der positiven Wirkung von STAT3 in der myokardialen Ischämie beteiligt zu sein [199]. Des Weiteren kann ERK1/2 den Übergang von Fibroblasten zu Myofibroblasten kontrollieren und die Synthese von Matrixmolekülen beeinflussen [200]. Der PI3K/AKT Signalweg ist für seine Funktionen in der Zellproliferation, Überleben und Apoptose bekannt. Auch durch seine Aktivierung wird der Reperfusionsschaden reduziert, da er die kardiale Kontraktilität verbessert und die Apoptose von Kardiomyozyten verringert [201]. Auch die Rolle von T_H17-Zellen, die von IL-23 stabilisiert und reguliert werden, konnte bei kardiovaskulären Erkrankungen gezeigt werden. Ein intaktes Gleichgewicht zwischen T_H1-, T_H2- und T_H17-Zellen

ist ein grundlegender Mechanismus, um Entzündungsreaktionen beim kardialen Remodeling zu vermitteln [202]. Beobachtungen zeigen, dass ein solches Gleichgewicht bei Patienten mit Koronarsyndrom beeinträchtigt ist [203, 204]. Darüber hinaus sind Th17-Zellen und ihr charakteristisches Zytokin IL-17 in der Lage die Apoptose von Kardiomyozyten und die Aktivierung von Herzfibroblasten zu induzieren [205, 206]. Außerdem konnte ihre Beteiligung in der Pathogenese von Arteriosklerose [207] und Virusmyokarditis [208] belegt werden. Nur einige wenige Veröffentlichungen berichten über den direkten Effekt von IL-23 auf den Myokardinfarkt, jedoch mit widersprüchlichen Ergebnissen. Savvatis *et al.* 2013 zeigten in einem murinen Modell der permanenten Okklusion der *left anterior descending artery* (LAD), dass das Fehlen von IL-23p19 destruktive Auswirkung auf den Myokardinfarkt hatte. IL-23p19-defiziente Mäuse zeigten eine verminderte Herzfunktion und eine höhere Mortalität im Vergleich zu den Wildtyptieren. Außerdem war bei diesen Tieren die Expression an entzündlichen Zytokinen erhöht und eine übermäßige Infiltration von Immunzellen erkennbar. Folglich führte die Fehlregulation der IL-23 Signaltransduktion zu einer beeinträchtigten Wundheilung nach Myokardinfarkt [209]. Im Gegensatz dazu demonstrierten Yan *et al*. 2012, dass die Abwesenheit der IL-23 Signalgebung nach einer permanenten Okklusion der LAD eine protektive Wirkung auf den Myokardinfarkt aufwies. Sie zeigten, dass IL-23p19-defiziente Mäuse nach einem starken Myokardinfarkt, aufgrund einer verbesserten Herzfunktion länger überlebten als Wildtyptiere. Des Weiteren war die Expansion des Infarktes reduziert und die linksventrikuläre Dilatation bei IL-23p19-defizienten Mäusen gelindert [210]. Der Grund für die unterschiedlichen Beobachtungen zu den Phänotypen ist unklar. In Publikation 1 (s. Kapitel 3) konnte mittels zweier unterschiedlicher Ischämie/Reperfusionsmodelle weder der positive noch der negative Effekt der IL-23 Signaltransduktion auf das Herz nach Myokardinfarkt reproduziert werden [130]. In einer weiteren Studie zeigten Ratten, denen nach einer Ischämie gefolgt von einer Reperfusion (I/R) rekombinantes IL-23 injiziert wurde, eine signifikant erhöhte Entzündungsreaktion und Infarktgröße. Die starke Entzündung wurde durch die übermäßige Produktion an pro-entzündlichen Zytokinen, wie IL-6 und IL-17, vermittelt. Die Blockierung des IL-23 Signalweges durch neutralisierenden IL-23 Antikörper konnte dagegen die Infarktexpansion, pro-entzündliche und pro-apoptotische Effekte verringern [211].

In Publikaion 1 (s. Kapitel 3) wurden Wildtypmäuse nach I/R mit gereinigtem rekombinantem HIL-23Fc behandelt und der Effekt auf das myokardiale Remodeling untersucht. Hierbei wurde

gezeigt, dass die Behandlung mit HIL-23Fc keine Wirkung auf das ischämische Mausherz hatte [130].

Da die Biologie der IL-12-Familie sehr komplex ist, sind weitere Untersuchungen zu der Rolle von IL-23 notwendig. Um einen gezielten therapeutischen Ansatz zu entwickeln, muss die IL-23 induzierte Signaltransduktion im Detail studiert werden. Zur Untersuchung der biologischen Prozesse besteht großes Interesse an der Entwicklung von Strategien, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Signaltransduktionen spezifisch steuern können.

1.3 Gp130 und seine vermittelte Signaltransduktion

Gp130 ist ein ubiquitär exprimierter Rezeptor, der von vielen Zytokinen aus der IL-6/IL-12-Familie, einschließlich IL-6, IL-11, IL-27, Leukämie-inhibitorischer Faktor (LIF), *oncostatin M* (OSM), *ciliary neutrophic factor* (CNTF), *cardiotrophin* 1 (CT-1) *carditrophin-like cytokine* (CLC), IL-35 und wahrscheinlich IL-39 für die Signaltransduktion verwendet wird [68, 75, 212, 213]. Gp130 besteht aus einem extrazellulärem Teil, gefolgt von einer TMD und einer ICD. Der extrazelluläre Teil besteht aus fünf FNIII Domänen, von denen zwei das Zytokinbindemodul bilden und einer Ig-ähnlichen Domäne [214, 215]. Die ICD des gp130 weist sechs Tyrosinreste auf, die für die Signalweiterleitung essentiell sind [216-218]. Interessanterweise kann gp130 mit einer der drei Januskinasen JAK1, JAK2 und TYK2 konstitutiv assoziiert sein [219, 220]. In der gp130 vermittelten Signaltransduktion kann der JAK/STAT-, MAPK und PI3K-Signalweg induziert werden.

IL-6 und IL-11 sind die einzigen Zytokine der IL-6-Familie, die ausschließlich gp130 Homodimere für die Signalweiterleitung verwenden. Für die Signaltransduktion binden IL-6 und IL-11 an ihre spezifischen α-Rezeptoruntereinheiten (IL-6Rα und IL-11Rα) und assoziieren anschließend als Komplex mit den gp130 Homodimeren. Es entsteht ein hexamerer Komplex aus zwei Zytokinliganden, zwei α-Rezeptoruntereinheiten und zwei gp130 Molekülen [221-223]. Durch die Entstehung dieses Komplexes werden die gp130 Moleküle in unmittelbare Nähe gebracht, um mit den JAKs zu interagieren. Nach der Transphosphorylierung der JAKs können diese die intrazellulären Tyrosinreste des gp130 Rezeptors aktivieren [219, 220]. Die vier distalen Tyrosine (Y767, Y814, Y905 und Y915 im Menschen) dienen nach ihrer Phosphorylierung als Andockstellen für STAT Moleküle (hauptsächlich STAT3, aber auch STAT1 und STAT5). Aktiviertes STAT transloziert anschließend als Dimer in den Nukleus, wo es die Gentranskription initiiert [216, 217, 224, 225]. Das phosphorylierte Y759 des gp130 Rezeptors (im humanen

System) dient als Aktivierungsstelle für *src-homology 2-containing phosphotyrosine phosphatase* (SHP2), das wiederum den MAPK- und PI3K Signalweg induziert [216, 223, 226-228].

Die drei gp130 vermittelten Hauptsignalwege (JAK/STAT, MAPK und PI3K) werden durch mehrere negative Rückkopplungsmechanismen gegenreguliert [229]. Zu den wichtigsten Gegenregulatoren zählen die SOCS Proteine. SOCS3, der die IL-6/IL-11 Signaltransduktion gegenreguliert, bindet direkt an den phosphorylierten Tyrosinrest 759 des humanen gp130 Rezeptors und hemmt damit nicht nur die JAK Aktivität, sondern auch die IL-6/IL-11-induzierten Signalkaskaden [227, 229].

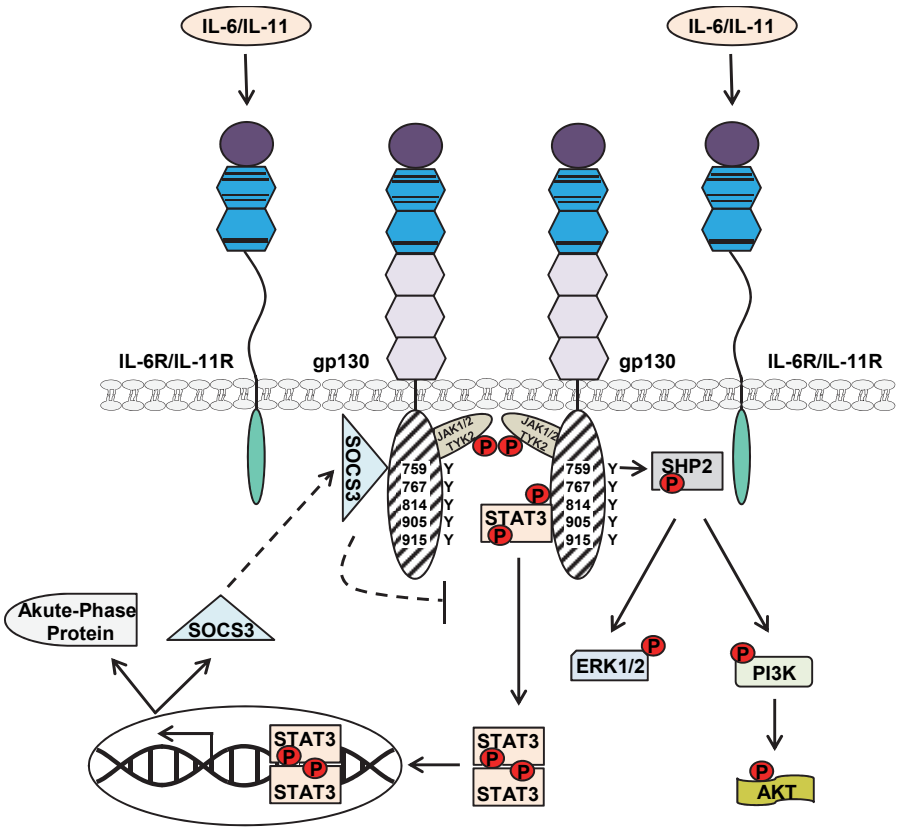


Abbildung 6: Schematische Darstellung der IL-6/IL-11-induzierten Signalwege. Die Bildung eines aktiven hexameren Komplexes aus zwei IL-6 oder IL-11-Liganden, zwei IL-6- bzw. IL-11-Rezeptoruntereinheiten und zwei gp130 Molekülen führt zur Transphosphorylierung der gp130-assoziierten Januskinasen. Die aktiven Kinasen vermitteln die Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste von gp130 Rezeptoren, die eine Aktivierung der STAT/MAPK/PI3K Signalwege ermöglichen. Der MAPK- und PI3K Signalweg wird hierbei von SHP2 reguliert. Phosphoryliertes STAT3 Homodimer initiiert im Nukleus die Transkription bestimmter Zielgene, unter anderem von *SOCS3* und *SAA1,* einem Akute-Phase Protein (s. Kapitel 1.3.1). SOCS3 ist ein Gegenregulator bei langanhaltender Signaltransduktion, der an die Aktivierungsstelle von Januskinasen bindet und somit sowohl die Kinaseaktivität, als auch die induzierten Signalkaskaden hemmt. Die schematische Darstellung wurde modifiziert nach Eulenfeld *et al.* 2012 [230] und Negahdaripour *et al*. 2016 [231].

1.3.1 Die konstitutive Aktivierung des gp130/JAK/STAT3 Signalweges

STAT3 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch die induzierte gp130 Signalweiterleitung aktiviert wird [232]. Der gp130/JAK/STAT3 Signalweg ist in der Leberregeneration und in der Akute-Phase-Reaktion von großer Bedeutung [233, 234]. Vor allem die Signalgebung durch den Liganden IL-6 induziert die Expression von Akute-Phase Proteinen in der Leber [235]. Mutationen im gp130/JAK/STAT3 Signalweg können zu einer konstitutiven Aktivierung von STAT Molekülen führen, die in Verbindung mit der Entstehung zahlreicher Tumore stehen [236]. Eine solche konstitutive Aktivierung von STAT3 wurde in entzündlich hepatozellulären Adenomen identifiziert [237]. Entzündliche hepatozelluläre Adenome sind gutartige Lebertumore, die mit einem entzündlichen Phänotypen und einer Überexpression von STAT Zielgenen einhergehen [236-238]. Sie lösen eine vermehrte zytoplasmatische Expression an Akute-Phase Proteinen, wie Serum-Amyloid A (SAA) und C-reaktives Protein (CRP), aus [239]. Beobachtungen zeigten, dass 60% der entzündlich hepatozellulären Adenome Mutationen im gp130 Rezeptor aufwiesen, die zu einer dauerhaften Aktivierung von STAT3 führten [237, 240]. Außerdem konnten auch Mutationen innerhalb des STAT3 Moleküls in Leukämie- und Lymphompatienten nachgewiesen werden, die eine konstitutive Aktivierung dieses Moleküls verursachten [241, 242]. Des Weiteren bewirkten auch Mutationen in den JAKs, welche STAT3 Moleküle direkt phosphorylieren, eine dauerhafte STAT3 Aktivierung [236]. In unterschiedlichen Tumoren, einschließlich hepatozellulärem Karzinom, Brustkrebs und Lungenkrebs wurden Mutationen in den JAKs identifiziert [243-245].

Um die konstitutive Aktivierung von gp130 *in vitro* zu untersuchen, wurden Strategien entwickelt, die eine ligandenunabhängige Homodimerisierung der gp130 Rezeptoren erzwingen [246-248]. Durch ein Leucin-Zipperpeptid, welches durch 15 Aminosäuren der extrazellulären gp130 Domäne ausgetauscht wurde, kommt es zu einer Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste am synthetischen gp130 Rezeptor und folglich zu einer dauerhaften ligandenunabhängigen Signaltransduktion. Durch Zugabe eines kurzen Peptids mit der Fos-Leucin-Zippersequenz [249] konnte die Aktivierung des synthetischen gp130 Rezeptors wieder aufgehoben werden [246]. Des Weiteren wurde ein IL-15/IL-15Rα-Sushi System beschrieben, das eine konstitutive und ligandenunabhängige Signaltransduktion unterschiedlicher homo- und heterodimerer Rezeptorkomplexe der IL-6-Familie imitierte [247]. Auch die Deletion von allen FNIII Domänen mit einer zusätzlichen Verkürzung der Gelenkregion innerhalb des gp130 Rezeptors führte zu einer ligandenunabhängigen, konstitutiven Rezeptoraktivierung [248].

1.4 Synthetische, biologisch aktive Rezeptoren

Um biologisch funktionelle Auslöser, Sensoren oder Schalter herzustellen, wird die synthetische Biologie herangezogen, die sich mit der De- und Rekonstruktion biologischer Einheiten beschäftigt [250]. Natürliche, biologische Schalter spielen im Körper eine sehr große Rolle. Sie kontrollieren unter anderem Zytokin-induzierte Prozesse, wie die Immunantwort [139]. Durch die Bindung der Liganden an ihre spezifische Rezeptoren wird die Signalweiterleitung aktiviert und bei einer übermäßig langen Signalgebung durch verschiedene negative Rückkopplungsmechansimen gegenreguliert, indem die Zytokinrezeptoren wieder deaktiviert werden [227, 229]. Jedoch können Mutationen in den Rezeptoren oder nachgeschalteten Molekülen zu einer unkontrollierten Signalweiterleitung führen [236]. Mit Hilfe der synthetischen Biologie können biologische Prozesse detaillierter untersucht und neue bioaktive Systeme mit definierten Eigenschaften entwickelt werden [251]. Es wurde bereits gezeigt, dass synthetische Biologie zur Veränderung von Zytokinrezeptoren verwendet werden kann, um konstitutiv aktive Signalwege zu imitieren [68, 97, 246, 247, 252, 253]. Schaltbare, synthetische Zytokinrezeptoren wurden 1996 von Hemmann und Mitarbeitern hergestellt, um den gp130-spezifischen Signalweg zu untersuchen [224]. Die chimären Rezeptoren bestanden aus der Erythropoetinrezeptor (EpoR)-bindenden ECD, gefolgt von einer gp130 Rezeptor TMD und ICD. Die Stimulation mit Erythropoetin führte zu einer Homodimerisierung und Aktivierung der gp130 Rezeptoren [224]. Der Arbeitsgruppe ist es somit gelungen, ein System zu entwickeln, welches den gp130 Signalweg künstlich imitierte. [224]. Aufgrund der Kreuzreaktivität des Liganden mit natürlichen Zytokinrezeptoren ist das System jedoch nicht *in vivo* anwendbar. Eine direkte intrazelluläre Aktivierung der Signaltransduktion wurde mit dem zellpermeablen, synthetischen Liganden FK506 und dessen bindendem Protein FKBP12 erreicht [254]. Hierbei wurde die zytoplasmatische Domäne des T-Zell Antigenrezeptors mit FKBP12 fusioniert und nach Zugabe des FK506 die intrazelluläre Signaltransduktion nachgeahmt [254]. Des Weiteren wurden auch kürzlich synthetische Liganden hergestellt, die eine natürliche Rezeptoraktivierung ermöglichten [255, 256].

Synthetische Rezeptoren wurden bereits 2017 von der *food and drug administration* (FDA) für eine Tumorimmungentherapie zur Bekämpfung der pädiatrischen akuten lymphatischen Leukämie, sowie großzelligem B-Zell Lymphom zugelassen [257, 258]. Bei dieser Technologie werden *chimeric antigen receptors* (CARs), die auf CD19 zielen, über einen

retroviral vermittelten Gentransfer in primäre T-Zellen eingebracht [257, 259]. Die CARs enthalten eine Antigen-Erkennungseinheit, die aus einem *single chain variable fragment* (scFv) des monoklonalen Antikörpers besteht, gefolgt von einer Gelenkregion, zur Erhöhung der Flexibilität für die Antigenbindung, einer TMD und einer intrazellulären T-Zell Signaldomäne. Das intrazelluläre Tyrosin basierte Aktivierungsmotiv besteht entweder aus der Region eines CD3 T-Zell Rezeptorkomplexes, der CD3ζ Kette oder einem Fc Rezeptor γ (FcR γ) [258, 260-262]. Mit dieser Strategie werden körpereigene T-Zellen gentechnisch so verändert, dass sie Tumorzellen erkennen und eliminieren. Zur Optimierung der CAR T-Zell Strategie wurden bereits weitere synthetische Rezeptorvarianten entwickelt, die unter anderem kostimulatorische Rezeptoren [263-265], Notch Rezeptoren [266] und antigenspezifische, inhibitorische Rezeptoren [267] besitzen. Eine graphische Darstellung zum strukturellen Aufbau von CAR ist in Abbildung **7** gezeigt.

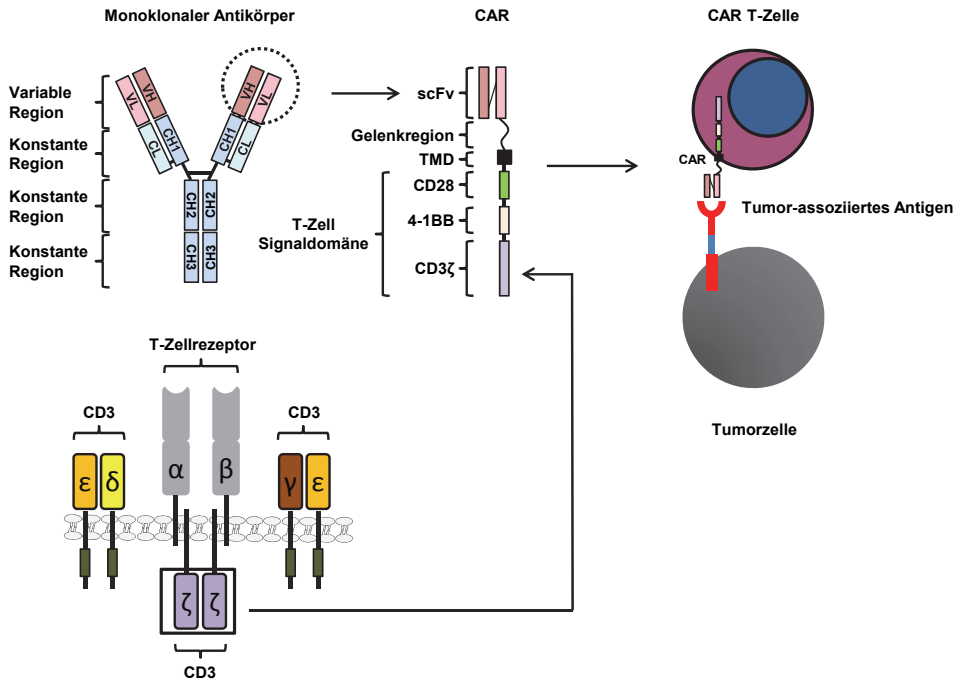


Abbildung 7: CAR T-Zellrezeptor Technologie. Ein fundamentaler Grundstein in der Herstellung von CARs ist der monoklonale Antikörper. Dieser besteht aus zwei schweren (H-) und zwei leichten (L-) Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind. Jede Polypeptidkette zeichnet sich durch eine variable (V-) und eine konstante (C-) Region aus. Zur Herstellung von CARs wird ausschließlich eine einzelne varibale Region, bestehend aus VH und VL, verwendet. Das N-teminale scFv dient dem CAR zur Erkennung des Antigens und ist über eine Gelenkregion mit der TMD verbunden. Der intrazelluläre Teil des CAR besteht beispielsweise aus einer CD28, 4-1BB und der CD3ζ T-Zell Signaldomäne. Das Einbringen der CARs in primäre T-Zellen erfolgt über den retroviral vermittelten Gentransfer. CAR T-Zellen helfen Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren. Die dargestellte Darstellung wurde modifiziert nach Magee *et al.* 2014, Han *et al.* 2017 und Jang *et al.* 2015 [268-270].

1.4.1 Nanobodies und ihre Anwendbarkeit in der Forschung und Diagnostik

Zur Identifizierung und Eliminierung von Antigenen werden Antikörper von B-Zellen sezerniert. Antikörper sind Glykoproteine, die der Ig-Superfamilie angehören. Die hohe Spezifität des Antikörpers an sein Antigen zu binden, kommt durch je drei Peptidschleifen an der Spitze jeder V-Domäne, die als *complementarity determining region* (CDR) bezeichnet werden, zustande [271, 272]. Antikörper werden in der Wissenschaft für biochemische Analysen, wie Western Blots und *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) verwendet [273]. Sie haben aber auch in den letzten Jahrzehnten eine große Wende vom wissenschaftlichem Forschungswerkzeug zu unentbehrlichen Humantherapeutika vollzogen [272]. Antikörper werden unter anderem zur Behandlung von RA [274], chronisch lymphatischer Leukämie [275] und Asthma [276] verwendet. Einer der größten Erfolge in der Medikamentenentwicklung wurde mit dem Tumornekrosefaktor (TNF) Antikörper erzielt [277]. Trotz dessen sind Antikörper nicht ganz unproblematisch. Zum einen sind sie teuer und schwierig in der Herstellung und zum anderen aufgrund ihrer Struktureigenschaften für viele Anwendungen ungeeignet. Mit einer Größe von ~150 kDa ist ihre Gewebepenetration und Bioverteilung limitiert. Außerdem können sie unterschiedliche Immunreaktionen hervorrufen und haben eine sehr lange Halbwertszeit, sodass aufgrund des starken Hintergrundsignals ihre Anwendung in der molekularen Bildgebung sehr schwierig ist [278-280]. Aufgrund der starken Limitierung in der Anwendbarkeit von Antikörpern, wurde nach neuen Strategien gesucht, um deren Eigenschaften zu verbessern. Hamers-Casterman und Mitglieder entdeckten 1993 im Serum von Camelidae eine neue Art von Antikörpern, die als schwere-Ketten-Antikörper (HcAbs) bezeichnet werden. Die ~ 90 kDa HCAbs enthalten keine leichten Ketten, sondern sind aus zwei konstanten Domänen, einer Gelenkregion und je einer Antigen-bindenden Domäne, der *variable heavy chain domain* (VHH), aufgebaut. Die VHH aus Camelidae kann auch einzeln isoliert werden, ohne Beeinträchtigung der Antigen-Bindungskapazität [281]. Dieser Einzeldomänenantikörper oder auch Nanobody genannt, ist mit ~15 kDa sehr klein und kann viele Limitierungen eines monoklonalen Antikörpers umgehen [282]. Nanobodies weisen neben ihrer hohen Stabilität, auch eine hohe Löslichkeit und eine ausgezeichnete Gewebepenetration auf und sind damit für viele Anwendungsbereiche ideal geeignet [283-286]. Außerdem können sie unter anderem kovalent mit unterschiedlichen Molekülen verknüpft werden [287, 288]. Des Weiteren können Nanobodies in verschiedenen Organismen, wie Bakterien und Hefe, sehr leicht exprimiert werden und sind günstig in ihrer Herstellung [289]. Ein Nanobody besteht aus neun β-Faltblättern und drei CDR

Schleifen mit der Fähigkeit, lange fingerartige Erweiterungen zu bilden, um somit einen leichteren Zugang zu schwer zugänglichen Epitopen zu erhalten [282]. Nanobodies werden in vielen Bereichen eingesetzt, wie Hämatologie, Onkologie, *in vivo* Bildgebung und in infektiösen, neurologischen und entzündlichen Krankheiten [280]. Für die Röntgenkristallographie werden zur Bestimmung von komplexen Proteinstrukturen Kristallisations-Chaparone in Form von Nanobodies entwickelt. Diese stabilisieren eine bestimmte Proteinkonformation und erleichtern auf diese Weise die Kristallbildung [290]. Außerdem werden Nanobodies aufgrund ihrer Stabilität als Proteinreinigungsliganden verwendet [291]. Auch in ELISAs und zu Immunpräzipitationszwecken werden Nanobodies eingesetzt [292, 293]. Eine weitere Anwendung der Nanobodies findet sich zu diagnostischen Zwecke. Ihre gute Tumorpenetration und schnelle Extravasation ermöglichen eine sensitive Bildgebung des Zielgewebes [294, 295]. Außerdem war auch der Einsatz von anti-TNF Nanobodies im Mausmodell zur chronischen Colitis erfolgreich [296].

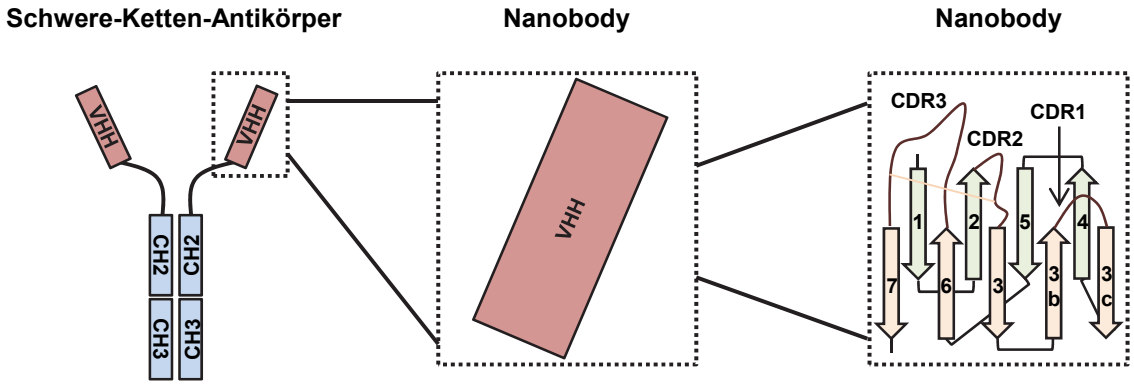


Abbildung 8: Struktureller Aufbau des Nanobodies aus HcAbs. HcAbs aus Camelidae umfassen zwei homodimere schwere Ketten, die aus VHH-, CH2- und CH3-Domänen aufgebaut sind. Die VHH-Domäne aus HcAbs kann ohne Verlust der Antigen-Bindungskapazität isoliert werden. Jede VHH-Domäne, auch als Nanobody bezeichnet, besteht aus neun β-Faltblättern (grün und orange) und drei CDR Schleifen (braun), die an Epitope von Antigenen binden. Zwei von drei CDR Schleifen sind über eine Disulfidbrücke (gelb) kovalent miteinander verknüpft. Die Darstellung wurde nach Wang *et al.* 2016 modifiziert [297].

Es wurden Nanobodies beschrieben, die mit hoher Affinität an Fluoreszenzproteine, wie *green fluorescent protein* (GFP) oder mCherry, binden [298, 299]. Sie werden unter anderem bei der Bildgebung, zur Untersuchung von Proteinexpression, subzellulären Lokalisation, sowie Translokationsereignissen verwendet [298, 300]. Viele wichtige Beobachtungen zur Protein-Protein Interaktion gelangen mit Hilfe von GFP-Nanobodies [301, 302]. Auch ist deren Anwendung in der hochauflösenden Mikroskopie von wichtiger Bedeutung [303]. Außerdem

sind Nanobodies, die gegen Fluoreszenzproteine gerichtet sind, zu einem wichtigen Werkzeug in der synthetischen Biologie geworden [304]. Insbesondere bei der Untersuchung des Notch Signalwegs kommen GFP-Nanobodies zum Einsatz. Durch den Austausch der Ligandenbindedomäne von Notch durch einen GFP-Nanobody und durch den Ersatz der ICD von Notch durch den QF-Transkriptionsaktivator ist es gelungen, unter Verwendung eines membrangebundenen, künstlichen GFP-Liganden, den synthetischen Notch Rezeptor zu aktivieren [305-307].

In Publikation 2 (s. Kapitel 4) wurden erstmals SyCyRs generiert, die eine zellspezifische und hintergrundfreie Aktivierung/Deaktivierung einer Zytokin-ähnlichen Signaltransduktion erlauben und sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* anwendbar sind [98]. Dieses neuartige System ermöglicht vielseitige Anwendungen, um eine zelltypspezifische Rezeptoraktivierung mittels synthetischer Liganden zu untersuchen. SyCyRs bestehen extrazellulär aus einem Nanobody, gefolgt von der TMD und ICD des Zielrezeptors [98]. Der Aufbau der SyCyRs und ihre Anwendungen wurden als Patent angemeldet [308].

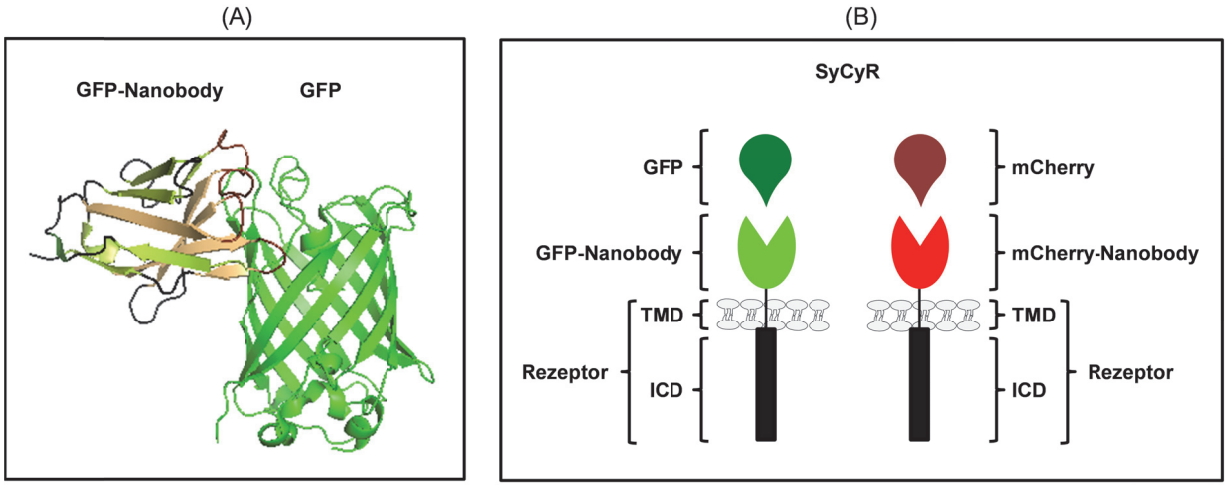


Abbildung 9: Interaktion zwischen GFP-Nanobody (G_{VHH}) und GFP und der Aufbau von SyCyRs.(A) Strukturelle Darstellung des heterodimeren Komplexes aus G_{VHH} (neongrün und orange) und GFP (hellgrün). Im Komplex interagieren alle drei CDR Schleifen (braun) und die β-Faltbäter 8-11 des G_{VHH} mit GFP. Die Erstellung der Proteinstruktur erfolgte mittels PyMOL und der PDB ID 3OGO [309]. (B) SyCyRs sind modular aufgebaut und bestehen N-terminal aus einem GFP- (hellgrün) oder mCherry-Nanobody (hellrot), der mit hoher Affinität an seinen spezifischen Liganden (GFP: dunkelgrün; mCherry: dunkelrot) bindet. Es folgt die TMD (schwarzer Strich) und die ICD (schwarzes Viereck) des zu untersuchenden Rezeptors [98, 308].

2. Zielsetzung

Die erste Fragestellung dieser Dissertation betrachtet die Rolle von IL-23 und seiner Signalkomponenten im murinen Ischämie/Reperfusions (I/R)-Modell. Für die Untersuchung wurden neuartige IL-23-*signaling*-defiziente Mäuse generiert. In einer akuten und einer chronischen I/R soll der Phänotyp der generierten Tiere charakterisiert werden. Außerdem soll das mögliche Potenzial von IL-23 als therapeutischer Ansatzpunkt nach I/R herausgearbeitet werden. Die Herzfunktion und der Heilungsprozess nach I/R sollen mittels bildgebender Techniken und biochemischer Untersuchungen erfasst werden.

Das zweite Ziel dieser Dissertation ist die Entwicklung eines neuartigen an- und ausschaltbaren Systems zur gezielten Kontrolle und detaillierten Analyse der Zytokinsignalweiterleitung. Das zu entwickelnde System soll die Zytokinsignaltransduktion ohne weitere Hintergrundaktivierung simulieren. Hierfür werden synthetische Rezeptoren hergestellt, indem der extrazelluläre Teil des natürlichen IL-23R und IL-12Rβ1 durch Nanobodies ersetzt wird. Des Weiteren wird eine definierte Anzahl an Fluoreszenzproteinen miteinander fusioniert, die spezifisch an die Nanobodies binden und Rezeptorketten rekrutieren. Zur Hemmung der Signalaktivierung werden lösliche Nanobody-Fusionsproteine verwendet, die gegen ihre spezifischen Fluoreszenzproteine gerichtet sind. Mit diesem System soll zunächst die biologische Aktivität der synthetischen Rezeptoren als hetero- und homodimerer Komplex untersucht werden. Anschließend soll das System auf weitere Rezeptoren einer anderen Zytokinfamilie ausgeweitet und dessen *in vivo* Anwendbarkeit gezeigt werden. Abschließend soll mit Hilfe des neuartigen *Synthetic Cytokine Receptor* (SyCyR)-Systems eine mögliche STAT3-Transphosphorylierung untersucht werden.

Die dritte Fragestellung betrachtet die neu entdeckten Zytokine IL-35 und IL-39 aus der IL-12-Familie in Bezug auf ihren Rezeptorkomplex und nachgeschaltete Signalkomponenten. Durch die Entwicklung von chimären Zytokinrezeptoren sollen IL-35- und IL-39-Signalwege simuliert werden. Hierzu werden die extra- oder intrazellulären-Domänen der natürlichen IL-6/IL-12-Typ Rezeptoren ausgetauscht und auf deren biologische Aktivität hin untersucht.

3. Publikation 1

IL-23R signaling plays no role in myocardial infarction

Publiziert in:	Scientific Reports
Impact-Faktor:	4,609
Eigener Anteil an dieser Arbeit:	75%
	Genotypisierungen
	Operative Eingriffe
	Durchflusszytometrie
	ELISA
	Splenozytenkultur
	Histologie
	Quantifizierung der histologischen Bilder
	Genexpressionsanalysen
	Reinigung und Quantifizierung von HIL-23Fc
	Behandlung der Mäuse mit HIL-23Fc
	Coomassie Brilliant Blue Färbung
	Zellviabilitätstests
	Stimulationstests
	Western Blots
	Datenanalyse
	Schreiben des Manuskripts

Engelowski, E, Fazel Modares, N, Gorressen, S, Bouvain, P, Semmler, D, Alter, C, Ding, Z, Flögel, U, Schrader, J, Xu, H, Lang, PA, Fischer, J, Floss, DM, Scheller, J, IL-23R signaling plays no role in myocardial infarction, 2018, *Scientific Reports*, 8, 17078.

4. Publikation 2

Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands

Publiziert in:	Nature Communications
Impact-Faktor:	13,691
Eigener Anteil an dieser Arbeit:	65%
	Klonierung synthetischer Rezeptoren und Liganden
	Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen
	Transfektion von U4C Zellen
	Transfektion und Selektion von CHO-K1 Zellen
	Proteinexpression und Quantifizierung
	Zellviabilitätstests
	Inhibitionstests
	Stimulationstests
	Western Blots
	Quantifizierung der Western Blots
	Durchflusszytometrie
	Datenanalyse
	Schreiben des Manuskripts

Engelowski, E, Schneider, A, Franke, M, Xu, H, Clemen, R, Lang, A, Baran, P, Binsch, C, Knebel, B, Al-Hasani, H, Moll, JM, Floß, DM, Lang, PA, Scheller, J, Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands, 2018, *Nature Communications*, 9, 2034.

5. Publikation 3

IL-6/IL-12 cytokine receptor shuffling of extra- and intracellular domains reveals canonical STAT activation via synthetic IL-35 and IL-39 signaling

Publiziert in:	Scientific Reports
Impact-Faktor:	4,609
Eigener Anteil an dieser Arbeit:	10%
	Stimulationstests
	Reinigung der RNA und Umschreibung in cDNA
	Transkriptionsanalysen
	Gelelektrophorese

Floss, DM, Schönberg, M, Franke, M, Horstmeier, FC, Engelowski, E, Schneider, A, Rosenfeldt, EM, Scheller, J, IL-6/IL-12 cytokine receptor shuffling of extra- and intracellular domains reveals canonical STAT activation via synthetic IL-35 and IL-39 signaling, 2017, *Scientific Reports*, 7, 15172.

6. Patentantrag 1

Synthetic signaling constructs and its use

Anmeldenummer:	EP18166111.7 (ausstehend)
Empfangsdatum:	06 April 2018
Antragssteller:	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Erfinder:	Jürgen Scheller, Doreen M. Floss, Philipp A. Lang, Erika Engelowski, Haifeng Xu, Manuel Franke, Artur Schneider
Anteil an der Erfindung:	10% Design und Konstruktion von SyCyRs Erstmaliger Nachweis der biologischen Aktivität von SyCyRs

Scheller, J, Floss, DM, Lang, PA, Engelowski, E, Xu, H, Franke, M, Schneider, A, Synthetic signalling constructs and its use, 06.04.2018, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, EP18166111.7 (*pending*).

7. Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation erfolgten funktionelle Untersuchungen zur Zytokin-induzierten Signaltransduktion der IL-6/IL-12-Familie. Die Zytokin-induzierte Signaltransduktion basiert auf natürlichen biologischen Schaltern und ist essentiell zur Regulation von immunologischen Prozessen [139]. Sie wird durch die Bindung des jeweiligen Zytokins an seine Rezeptoren vermittelt, indem anschließend der Rezeptorkomplex durch seine Konformationsänderung eine Transphosphorylierung der Januskinasen ermöglicht [93, 99-102, 220, 221]. Die induzierte Kinaseaktivität führt folglich zur Aktivierung unterschiedlicher Signalwege, wie unter anderem JAK/STAT, PI3K/AKT und MAPK [109, 310]. Aufgrund ihres Einflusses auf unterschiedliche Prozesse innerhalb diverser Erkrankungen, wie z.B. auf den Verlauf von Psoriasis [311, 312] und das Remodeling des Herzens nach Myokardinfarkt [209, 313], steht die Untersuchung der Zytokin-induzierten Signaltransduktionen im Fokus dieser Arbeit.

In Publikation 1 (s. Kapitel 3) wurde die Auswirkung des fehlenden IL-23 Signalweges auf den Heilungsprozess des Herzens und der therapeutische Effekt von HIL-23Fc nach I/R *in vivo* analysiert [130]. Hierfür wurden neuartige IL-23-*signaling*-defiziente Mäuse hergestellt, die durch eine Punktmutation (Y416F) oder in Kombination mit einer Verkürzung der intrazellulären IL-23R Domäne (ΔICD), eine PI3K- bzw. STAT/MAPK/PI3K-Defizienz aufwiesen. Bei den generierten Tieren wurde im *closed*- oder *open-chest* Modell eine Ischämie und bis zu 4-wöchige Reperfusion induziert. Die Experimente zeigten, dass die Herzfunktion von IL-23R-Y416FΔICD-defizienten Mäusen, im Vergleich zu IL-23R Kontrolltieren, nicht verändert war. Außerdem wurden die ischämischen Herzen von IL-23R-Y416FΔICD-defizienten Tieren auf Infarktgröße, Genregulation und Expression von *α-smooth muscle actin* (α-SMA) und HA untersucht und dabei gezeigt, dass diese nur minimale Veränderungen aufwiesen. Außerdem waren für alle untersuchten Parameter keine Unterschiede zwischen IL-23R-Y416F Tieren und IL-23R Kontrolltieren erkennbar. Darüber hinaus wurde in einem *closed-chest* Modell demonstriert, dass nach I/R die Behandlung von Wildtypmäusen mit HIL-23Fc ebenfalls keinen Effekt auf den Heilungsprozess des Herzen hatte. Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass der IL-23-induzierte Signalweg keine Rolle in der myokardialen I/R spielt [130].

Zur besseren Charakterisierung und Kontrolle der Zytokin-induzierten Signaltransduktion, wurde im Rahmen der Publikation 2 (s. Kapitel 4) eine neue Methode entwickelt, die es mit Hilfe neuartiger SyCyRs und synthetischer Liganden ermöglicht, eine

gezielte Zytokinsignalübertragung an- und auszuschalten [98, 308]. Zur Generierung der SyCyRs wurden GFP- und mCherry-Nanobodies verwendet, die mit der TMD und ICD von gp130 und IL-12Rβ1/IL-23R fusioniert wurden [308]. Als Zytokin-ähnliche Liganden wurden homo- und heterodimere GFP:mCherry Fusionsproteine hergestellt, die mit hoher Affinität an die SyCyRs binden konnten und dadurch *in vitro* und *in vivo* die IL-6-/IL-11- bzw. IL-23 Signaltransduktion phänokopierten. Unter Verwendung der SyCyRs konnte außerdem bestätigt werden, dass IL-23R Homodimere biologisch aktiv sind und eine IL-23-ähnliche Signaltransduktion induzieren. Des Weiteren wurde mittels einer trimeren SyCyR-Anordnung demonstriert, dass Zytokine zu einer STAT3-Transphosphorylierung fähig sind [98, 308].

Ebenfalls mittels künstlich hergestellter Rezeptoren, wurden in Publikation 3 (s. Kapitel 5) die Rezeptorzusammensetzungen und Signalwege der kürzlich entdeckten Zytokine IL-35 und IL-39 analysiert [68]. Da bioaktive rekombinante IL-35- und IL-39-Proteine bislang nicht erhältlich sind, wurde ihre Signaltransduktion durch das Mischen der ECD und ICD von Zytokinrezeptoren der IL-6/IL-12-Familie imitiert. Hierbei wurde gezeigt, dass alle vier beschriebenen IL-35 Rezeptorkomplexe, nämlich IL-12Rβ2:gp130, IL-12Rβ2:IL-12Rβ2, gp130:gp130 und IL-12Rβ2:WSX-1 [75], bioaktiv sind und eine Signalweiterleitung induzierten [68]. Im Gegensatz zu den gezeigten Daten in wissenschaftlichen Veröffentlichungen [75], wurde mittels chimerer Rezeptoren demonstriert, dass alle vier Rezeptorkomplexe kanonische STAT Signalwege vermittelten [68]. Darüber hinaus wurde auch die biologische Aktivität des postulierten IL-39 Rezeptorkomplexes, bestehend aus einem gp130:IL-23R Heterodimer, bestätigt [59, 68]. Dabei wurde ebenfalls bewiesen, dass die IL-39 Signaltransduktion zur Phosphorylierung konventioneller STAT Moleküle führte [59, 68]. Zuletzt wurden zwei weitere bioaktive synthetische Rezeptorkomplexe vom IL-6/IL-12-Typ, zusammengesetzt aus dem gp130:IL-12Rβ1-und IL-23R:12Rβ2 Heterodimer, entdeckt [68].

7.1. Die IL-23 Signaltransduktion spielt eine untergeordnete Rolle im Umbau des ischämischen Herzgewebes nach I/R

7.1.1. Neuartige IL-23-*signaling*-defiziente Mäuse stellen ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung der Wirkungsweise von IL-23 in kardiovaskulären Erkrankungen dar

IL-23 ist ein essentieller Bestandteil für die Entwicklung eines intakten Immunsystems [138]. Es fördert die T-Zell Differenzierung [142] und induziert die Expression weiterer Zytokine [152-154]. Zudem ist es an der Entstehung verschiedener Autoimmunerkrankungen, wie CED [168],

RA [169] und MS [170] beteiligt. Außerdem zeigen einige Veröffentlichungen, dass IL-23 eine wichtige Rolle im Remodeling des ischämischen Herzgewebes nach Myokardinfarkt einnimmt [209-211].

Das pro-entzündliche Zytokin IL-23 besteht aus der α-Untereinheit p19 und der β-Untereinheit p40 [63]. Es bindet mit hoher Affinität an den IL-23R und IL-12Rβ1 [72, 86]. Dadurch wird eine Signaltransduktion initiiert, die durch die Induktion der JAK/STAT, PI3K/AKT, MAPK und NF-κB Wege gekennzeichnet ist [72, 109, 129].

Zur Untersuchung der Wirkungsweise von IL-23 auf den Myokardinfarkt wurden bislang IL-23p19-zytokindefiziente Mäuse verwendet [209, 210]. Aufgrund der komplexen Biologie und Plastizität innerhalb der IL-12-Familie ist dieses Tiermodell zur Charakterisierung von IL-23 in diversen Erkrankungen nur bedingt geeignet. Aufgrund der fortschreitenden Zytokinforschung konnte gezeigt werden, dass die α-Untereinheit p19 nicht ausschließlich für die Komplexzusammensetzung von IL-23 benötigt wird, sondern auch für IL-39 [59, 63]. Somit wird durch das Fehlen von IL-23p19 sowohl die IL-23- als auch die IL-39-Signalweiterleitung verhindert. Da IL-23 aus den Untereinheiten p19 und p40 zusammengesetzt ist, besteht die Annahme, dass in diesen Tieren höhere Mengen an freiem p40 vorhanden sind. Das Zytokin IL-12 besteht aus der α-Untereinheit p35 und der β-Untereinheit p40 [62]. Durch das Fehlen von p19 und dem Überschuss an freiem p40, könnte es zu einer verstärkten Bildung an IL-12 kommen. Des Weiteren ist bekannt, dass p40 Homodimere bildet, wenn es alleine sezerniert wird. Das p40 Homodimer hat für die IL-12 Signaltransduktion eine antagonistische Wirkung [185] und weist entzündungshemmende Effekte auf [182, 314]. Aus diesem Grund wurden in Publikation 1 (s. Kapitel 3) zur Untersuchung der IL-23 Signalweiterleitung auf den Verlauf einer I/R neuartige IL-23-*signaling*-defiziente Mäuse verwendet [130]. Für die Inaktivierung der IL-23-induzierten Signalwege wiesen die Mäuse eine Deletion der intrazellulären IL-23R Domäne, beginnend mit dem C-terminalen Aminosäurerest 433 und die zusätzliche Punktmutation Y416F auf (IL-23R-Y416FΔICD). Mäuse, die ausschließlich die genetische Punktmutation (IL-23R-Y416F) besaßen, wurden zur Aufklärung der Wirkungsweise des PI3K/AKT Signalweges auf den Umbau des ischämischen Gewebes nach I/R verwendet [130]. Die Generierung der IL-23-*signaling*-defizienten Mäuse basierte auf Grundlage der bereits zuvor identifizierten Aminosäuren, die für die Bindung der signalvermittelnden Moleküle essenziell sind [109]. Mit diesem neu entwickelten Tiermodell erfolgte in Publikation 1 (s. Kapitel 3) eine detaillierte Untersuchung der IL-23-induzierten Signalwege in einem I/R Modell [130].

Zur Charakterisierung des Genotyps der Tiere wurden in Publikation 1 (s. Kapitel 3) die Expression des IL-23R und Produktion von IL-17 in IL-23R-Y416F- und IL-23R-Y416FΔICD-Mäusen im Vergleich zu IL-23R Wildtyptieren analysiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde an Milzzellen gezeigt, dass die Oberflächenexpression des IL-23R durch die Mutation und Verkürzung der intrazellulären IL-23R Domäne nicht verändert war [130]. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den veröffentlichten *in vitro* Daten, die ebenfalls zeigten, dass Mutationen und große Deletionen innerhalb der intrazellulären IL-23R Domäne die Oberflächenexpression und Präsentation der Rezeptoren nicht beeinflussten [109]. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die IL-17 Produktion in Milzzellen von IL-23R-Y416F- und verstärkt von IL-23R-Y416FΔICD Mäusen, verglichen mit Wildtypzellen, fünf Tage nach Stimulation mit den Zytokinen TGF-β1, IL-6 und IL-1β und/oder CD3/CD28 Antikörpern, signifikant reduziert war [130]. Dieses Ergebnis bestätigt die Rolle des IL-23 Signalweges in der T_H17-Zelldifferenzierung, die eine Sekretion von IL-17 initiiert [90, 106]. Bereits die alleinige Stimulation von Zellen mit CD3/CD28 Antikörpern induzierte eine erhöhte Expression an IL-23R, welches in einer IL-17 Expression resultierte [130, 315]. Dementsprechend zeigten die Ergebnisse, dass die neu generierten Mäuse dem IL-23R-*signaling*-defizienten Phänotypen entsprachen [130].

7.1.2. Das Fehlen der IL-23-induzierten Signalwege zeigte eine geringe Auswirkung auf das Remodeling des Herzens nach Myokardinfarkt

Ischämische Herzerkrankungen gehören weltweit zu den häufigsten Erkrankungen mit einer lebensbedrohlichen Verlaufsform. An dem Heilungsprozess des ischämischen Gewebes nach einem Myokardinfarkt sind hauptsächlich das Immunsystem und seine Zytokine beteiligt [316]. Da die molekularen Mechanismen der ischämischen Herzkrankheiten bis heute unvollständig geklärt wurden, sind nur wenige klinische Therapieansätze, darunter IL-1 Antikörper, zur Regulation der Entzündungsprozesse vorhanden [317]. Vor allem fehlt häufig das Wissen über die Wirkungsweisen von Zytokinen in ischämischen Herzerkrankungen, so wie bei IL-23. Da dieses ähnlich wie IL-6 die Immunreaktion und Geweberegeneration beeinflussen kann [318], war seine Beteiligung auch bei myokardialer Ischämie naheliegend. Interessanterweise wiedersprechen sich erste Studien an Mäusen zu der Rolle des pro-entzündlichen Zytokins IL-23 im kardialen Remodeling nach Myokardinfarkt [209-211]. Yan *et al.* zeigten 2012 erstmals die destruktive Wirkung von IL-23 auf das Herz nach Myokardinfarkt. Sie zeigten in einem murinen Modell der permanente Okklusion der LAD, dass bei IL-23p19-zytokindefizienten Mäusen bereits sieben Tage nach Myokardinfarkt das Gesamtüberleben verbessert war, im Vergleich zu

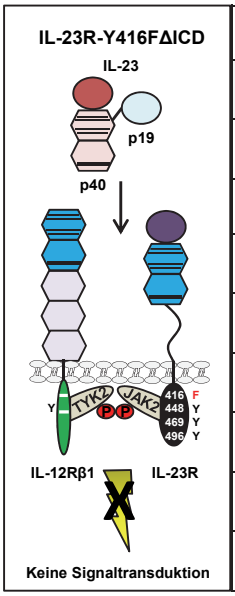
Wildtyptieren. Des Weiteren erwies sich mittels echokardiographischen Analysen 28 Tage nach Myokardinfarkt eine verbesserte Herzfunktion bei IL-23p19-defizienten Mäusen. Dieses Ergebnis korrelierte auch mit der verminderten Narbengröße im Herzen dieser Tiere verglichen mit Wildtypmäusen [210]. Im Jahr 2014 demonstrierten Savvatis und Mitarbeiter am gleichen Tiermodell und ebenfalls nach einer permanenten Okklusion der LAD, dass IL-23 eine protektive Wirkungen auf den Umbau des ischämischen Gewebes hatte. Hierbei zeigten IL-23p19-zytokindefiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyptieren eine höhere Mortalität und eine signifikant verminderte Produktion an Kollagen und α-SMA, was ihrer Ansicht nach auf ein verschlechtertes myokardiales Remodeling hindeutete. Des Weiteren zeigte die Arbeitsgruppe, dass bereits vier Tage nach Myokardinfarkt eine eingeschränktere Herzfunktion in IL-23p19-defizienten Mäusen messbar war, eine höhere Menge an Immunzellen das ischämische Gewebe infiltrierte und die Phosphorylierung von ERK und STAT3 signifikant reduziert war, verglichen mit Wildtypen [209]. Somit liegen derzeit keine eindeutigen Ergebnisse zu der Wirkungsweise von IL-23 bei Myokardinfarkt vor, da wissenschaftliche Veröffentlichungen eine entgegengesetzte Rolle dieses Zytokins bei kardialer Ischämie am murinen Modell beschrieben. Interessanterweise konnte im Rahmen der Publikation 1 (s. Kapitel 3) eindeutig gezeigt werden, dass IL-23 nahezu keinen Effekt auf das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt hat [130]. Bei IL-23R-, IL-23R-Y416F- und IL-23R-Y416FΔICD-Mäusen wurde zunächst bei geschlossenem Thorax eine 60-minütig Ischämie induziert, gefolgt von einer 24-stündigen, 4- oder 21-tägigen Reperfusion. Es zeigte sich, dass 24 h nach Ischämie der IL-23 Signalweg weder einen Einfluss auf die Herzfunktion noch auf den Heilungsprozess hatte. Bei IL-23R-Y416FΔICD Mäusen und Wildtyptieren war kein Unterschied in der Menge an α-SMA, HA und Galektin-3 (Marker für Makrophagen) im linken Ventrikel (LV) detektierbar. Auch im Serum von IL-23R-Y416FΔICD Mäusen und Wildtyptieren wurden ähnliche Werte an kardialem Troponin gemessen. Die mRNA Expression an entzündlichen-, zellzyklischen- und anti-apoptotischen-Faktoren ergab ebenfalls in allen drei Phänotypen keine Unterschiede. Dass IL-23 keine Rolle in der frühen Phase nach I/R spielte, zeigte sich auch an den vergleichbaren Ergebnissen zur Herzfunktion zwischen IL-23R-Y416FΔICD- und Wildtypmäusen, die mit Echokardiographie generiert wurden [130]. Diese Beobachtung wurde bereits 2012 von Yan und Mitarbeitern 24 h nach einer permanenten Okklusion der LAD gemacht. Sie zeigten, dass IL-23p19-defiziente Mäuse nach einem akuten Myokardinfarkt weder eine verstärkte Infarktexpansion, noch veränderte Paramater zur Herzfunktion aufwiesen, im Vergleich zu

Wildtyptieren [210]. Reproduziert werden, konnten jedoch weder die protektiven noch destruktiven Effekte der IL-23 Signaltransduktion auf das Gesamtüberleben und Herzfunktion in einem chronischen Modell zum Myokardinfarkt, den Savvatis *et al.* 2014 bzw. Yan *et al*. 2012 in IL-23p19-defizienten Mäusen demonstrierten [209, 210]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind wahrscheinlich auf die Verwendung von verschiedenen Tiermodellen zurückzuführen. IL-23p19-defiziente Mäuse sind für Untersuchungen zur Wirkungsweise von IL-23 in diversen Erkrankungen weniger geeignet (s. Kapitel 7.1.1). Durch das Fehlen von IL-23p19 war in den Tieren nicht nur der IL-23-, sondern auch der IL-39-Signalweg inaktiv [59, 63]. Außerdem können auch zusätzliche Effekte durch das freie p40 in den IL-23p19-defizienten Mäusen nicht ausgeschlossen werden [185]. Innerhalb dieser Dissertation wurden dagegen IL-23R-*signaling*-defiziente Mäuse verwendet, die eine Mutation und/oder Deletion in der IL-23R intrazellulären Domäne aufwiesen. Da der IL-23R innerhalb des IL-23 Rezeptorkomplexes die einzige signaltransduzierende Rezeptorkette ist, wurden in Publikation 1 (s. Kapitel 3) ausschließlich IL-23-induzierte Signalwege untersucht [130].

Drei Wochen nach Induktion der Ischämie am geschlossenen Thorax (*closed-chest*), gefolgt von einer Reperfusion, konnte in Herzen von IL-23R-Y416FΔICD Mäusen im Vergleich zu Wildtypherzen ein eingeschränktes kardiales Remodeling beobachtet werden [130]. Diese Erkenntnis resultierte aus einer signifikant erhöhten Menge an α-SMA, HA und der vergrößerten Narbe [130]. Die Expression von α-SMA ist ein charakteristischer Hinweis für Myofibroblasten, die eine Kollagensynthese induzieren [319]. Bereits seit langem konnte gezeigt werden, dass bei einer gewebshaltigen Narbe die α-SMA positiven Myofibroblasten mit einer abnormalen Ablagerung der extrazellulären Matrixkomponenten korrelieren und folglich das Fortschreiten der Krankheit fördern [320-322]. Die myofibroblastische Differenzierung führt zu einer verstärkten Expression und Akkumulation von HA in der Matrix [323]. Erhöhte Mengen an HA und seinem Zelleoberflächenrezeptor CD44 wurden bereits in zahlreichen gewebshaltigen Bereichen nachgewiesen, die mit einer Organdysfunktion assoziiert sind [324, 325]. Ein alleiniger Effekt des IL-23-induzierten PI3K/AKT Signalweges auf das kardiale Remodeling nach I/R wurde nicht beobachtet, da keine signifikanten Unterschiede im Heilungsprozess des Herzens in IL-23R-Y416F Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren feststellbar waren [130]. Dieses Resultat bestätigt die in den Veröffentlichungen gezeigten Ergebnisse zur Wechselwirkung von Zytokin-induzierten Signalmolekülen und einem Zusammenspiel dieser im Verlauf von Krankheiten [199, 326].

Die im akuten *closed-chest* I/R Modell gezeigten milden negativen Effekte auf das ischämische Herzgewebe, durch das Fehlen der IL-23-induzierten Signalwege, waren auf ein weiteres I/R Modell nicht übertragbar [130]. In diesem Modell wurde bei IL-23R Wildtypmäusen und IL-23R-Y416FΔICD Mäusen eine 50-minütige Ischämie bei geöffnetem Thorax (*open-chest*) durchgeführt, gefolgt von einer 4-wöchigen Reperfusion. Die Herzfunktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach I/R (Tag 1, 4, 7, 14, 21, 28) mittels MRI bestimmt. Wie bereits im *closed-chest* Modell konnten auch hier keine Unterschiede in der Herzfunktion zwischen den zwei Phänotypen beobachtet werden. Abweichend vom chronischen *closed-chest* Modell, wurde dagegen bei diesem Modell nur ein tendenzieller Anstieg einer α-SMA und HA Expression, 28 Tage nach I/R im linken Ventrikel des Herzens, gezeigt. Des Weiteren konnte auch keine signifikant stärkere Expansion des Infarktes in IL-23R-Y416FΔICD Mäusen verglichen mit Wildtyptieren beobachtet werden [130]. Die fehlende Übertragbarkeit der generierten Ergebnisse im chronischen *closed-chest* I/R Modell auf das *open-chest* I/R Modell, könnte auf Grund der unterschiedlich gewählten Zeitpunkte zur Analyse des Remodelings nach I/R entstanden sein. Der Prozess nach Myokardinfarkt unterliegt einer ständig wechselnden Veränderung [209] und macht somit einen direkten Vergleich der Resultate schwierig. Aus den generierten Studien wurde die Erkenntnis gewonnen, dass der IL-23-induzierte Signalweg nur eine untergeordnete Rolle im kardialen Remodeling nach I/R spielt [130]. Trotz der in Publikation 1 (s. Kapitel 3) verwendeten hochmodernen Techniken zur Phänotypbestimmung, wie Echokardiographie und MRI, konnten die von Savvatis *et al*. 2014 und Yan *et al*. 2012 gezeigten Ergebnisse zur deutlichen protektiven oder destruktiven Wirkungsweise von IL-23 Signaltransduktion [209, 210] nicht reproduziert werden [130]. Zum einen wurde im Rahmen dieser Arbeit kein Modell zur permanenten Okklusion der LAD verwendet, sondern eine 50-60-minütige Ischämie gefolgt von einer Reperfusion durchgeführt. Das I/R Modell hat eine größere klinische Relevanz, denn es ist vergleichbar mit einem Myokardinfarkt in Patienten. Die Reperfusion ist in der Klinik zurzeit die einzige Methode, um die Infarktexpansion zu begrenzen und das Mortalitätsrisiko bei Patienten zu senken [20, 31]. Jedoch führt eine erneute Durchblutung des ischämischen Gewebes zu einer weiteren Schädigung [34], die im I/R, aber nicht im Modell zur permanenten Okklusion der LAD berücksichtigt werden. Zum anderen wurden in allen drei Studien Tiere mit einem unterschiedlichen genetischen Hintergrund verwendet. Schon seit langem ist bekannt, dass durch Verwendung von Tieren, die auf verschiedenen genetischen Hintergründen beruhen, oft

unterschiedliche Studienergebnisse erzielt werden. Nicht zuletzt beeinflusst auch die Art der Tierhaltung die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen [327].



	Closed-chest / *Open-chest*											
Reperfusions-dauer	**24 Stunden**		**4 Tage**		**7 Tage**		**14 Tage**		**21 Tage**		**28 Tage**	
Gesamt-überleben	↔	–	–	–	↔	–	↔	–	↔	–	–	–
Herzfunktion	–	↔	↔	↔	–	↔	–	↔	↔	↔	–	↔
Infarktgröße	–	↔	–	–	–	–	–	–	↑	–	–	↔
α-SMA Expression	↔	–	–	–	–	–	–	–	↑	–	–	↔
HA Expression	↔	–	–	–	–	–	–	–	↑	–	–	↔
Galectin-3 Expression	↔	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Kardiales Troponin	↔	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
mRNA Expression	↔	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Abbildung 10: Zusammenfassende Ergebnisse zur myokardialen Analyse von IL-23-*signaling*-defizienten Mäusen, die in einem *closed*- oder *open-chest* I/R Modell herausgefordert wurden. Die Analysen zur Herzfunktion und zum Heilungsprozess zeigen, dass das Fehlen der IL-23-induzierten Signalwege nahezu keinen Einfluss auf das Remodeling nach Myokardinfarkt hat. Eine größere Narbe und eine erhöhte Expression an α-SMA und HA zeigt sich ausschließlich in IL-23R-Y416FΔICD Mäusen 21 Tage nach *closed-chest* I/R [130]. Pfeil nach oben (↑): Anstieg dieses Parameters im Vergleich zum IL-23R Wildtyptier; Pfeil nach links und rechts (↔): Keine Veränderung dieses Parameters im Vergleich zum IL-23R Wildtyptier; Bindestrich (-): Dieser Parameter wurde nicht untersucht.

7.1.3. Die Behandlung mit IL-23 hat nahezu keine therapeutische Wirkung auf den Heilungsprozess des ischämischen Herzgewebes nach I/R

Das pro-entzündliche Zytokin IL-23 wirkt sich auf den Verlauf diverser Erkrankungen negativ aus. So wurden bei Patienten unter anderem mit Psoriasis erhöhte Werte an IL-23 im Serum gemessen [312]. Zur Behandlung dieser Erkrankung wurden bereits zwei monoklonale Antikörper, namens Guselkumab und Ustekinomab, zugelassen. Diese binden an die p19- bzw. p40-Untereinheit von IL-23 und blockieren die IL-23-induzierte Signalweiterleitung [186, 189]. Des Weiteren zeigen neueste Studien an Ratten, dass die Injektion von IL-23 die myokardiale Verletzung durch eine erhöhte Entzündungsreaktion und oxidativen Stress nach I/R fördert [211, 328]. Die Inhibierung von IL-23 konnte dagegen den Infarktbereich im Herzen signifikant verkleinern und die Kardiomyozyten vor dem Untergang schützen [211, 328]. Die Gruppe um Hu *et al*. 2016 injizierten hierbei den Ratten nach Induktion der Ischämie und 15 min vor Einleitung

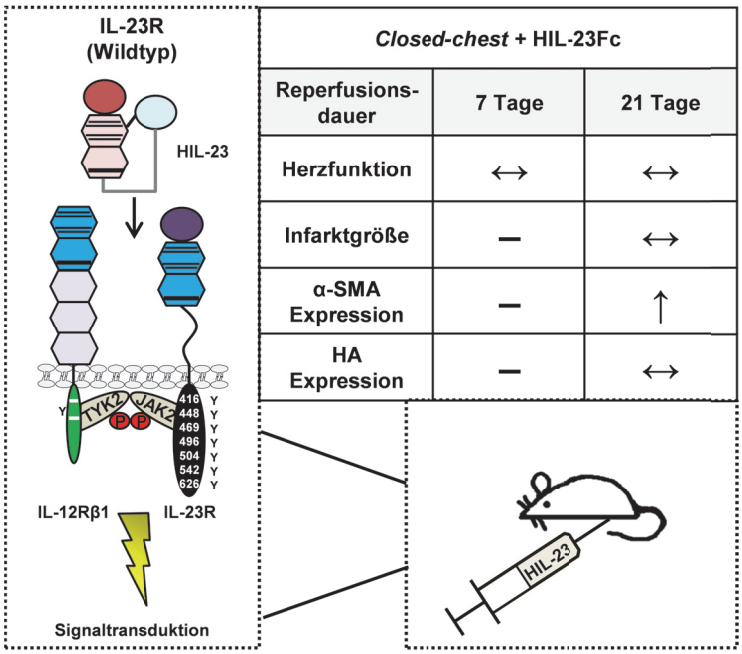
der Reperfusion einmalig IL-23 oder einen anti-IL-23 monoklonalen Antikörper intravenös. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigte sich in der IL-23 Injektionsgruppe nach Ischämie und 4 h Reperfusion ein größerer Infarktbereich im Herzen, erhöhte Werte an Herzschädigungsmarkern und pro-entzündlichen Zytokinen im Serum. Außerdem zeigten Ratten nach I/R und IL-23 Injektion eine signifikante Herunterregulation der Superoxiddismutase im Herzen [328], was auf einen höheren oxidativen Stress hindeutete [196]. Des Weiteren waren in diesen Tieren mehr Kardiomyozyten vom Zelltod betroffen [328], sodass vermutet werden kann, dass auf Grund dessen im weiteren Verlauf des Remodelingprozesses eine größere bindegewebshaltige Narbe entstand [329]. All die negativen Effekte von IL-23 nach I/R konnten durch die Verabreichung des anti-IL-23 monoklonalen Antikörpers wieder aufgehoben werden [211, 328]. Mit diesem Hintergrundwissen wurde im Rahmen der Publikation 1 (s. Kapitel 3) der therapeutische Effekt von IL-23 in einem murinen chronischen I/R Modell untersucht [130]. Hierzu wurde ein Fusionsprotein aus p40 und p19, verbunden mit einem Fc-Tag (HIL-23Fc), hergestellt. Die biologische Aktivität dieses Proteins wurde an der murinen prä-B Zelllinie Ba/F3-IL-23R-IL-12Rβ1 getestet. Diese Zelllinie exprimierte auf der Oberfläche neben dem gp130 Rezeptor auch den IL-23R und IL-12Rß1 [130]. Ba/F3 Zellen werden in der Wissenschaft sehr häufig zur Untersuchung der Zytokinsignaltransduktion verwendet [330] und die IL-23 Signalgebung wurde bereits anhand dieser Zellen erfolgreich charakterisiert [109].

Im Zellviabilitätstest zeigte sich an Ba/F3-gp130-IL-23R-IL-12Rβ1, dass eine halbmaximale Proliferation bereits mit 0,4 ng/ml HIL-23Fc erreicht wurde. Auch die Signaltransduktionswege STAT3, ERK1/2 und AKT wurden nach Stimulation der Ba/F3-gp130-IL-23R-IL-12Rβ1 mit HIL-23Fc aktiviert. Dass die HIL-23Fc-induzierte Proliferation und Signaltransduktion spezifisch waren, zeigte sich an der fehlenden Signalweiterleitung nach Stimulation dieser Zellen mit GFP. Somit wurde bestätigt, dass das hergestellte und gereinigte rekombinante Protein HIL-23Fc eine hohe Spezifität und Aktivität besaß. Fc basierte Fusionsproteine finden immer häufiger Anwendung bei der Herstellung von Medikamenten [331]. Bereits elf Fc-Fusionsproteine wurden als Arzneimittel von der FDA zugelassen [332]. Das Protein sgp130Fc, welches spezifisch die IL-6-trans-Signaltransduktion inhibiert, wird ebenfalls auf die klinische Anwendung von CED geprüft [333]. Proteine werden mit einem Fc-Tag fusioniert, da es einen biologischen und pharmakologischen Vorteil verschafft. Zum einen wird auf Grund des Fc-Tags die Plasmahalbwertszeit und somit auch die therapeutische Aktivität einiger Proteine verlängert [334, 335]. Zum anderen verbessert die Fc-Region die

Löslichkeit und Stabilität des Partnerproteins und erlaubt außerdem eine einfache und kostengünstige Proteinreinigung [336, 337].

Bei C57/BL6J Mäusen wurde eine 60-minütige Ischämie am geschlossenen Thorax, gefolgt von einer 3-wöchigen Reperfusion durchgeführt. Direkt nach Einleitung der Reperfusion und vier weitere Male wurden die Tiere entweder mit PBS oder HIL-23Fc durch intraperitoneale (i.p.) Injektion behandelt. Die Analysen zur Herzfunktion erfolgten mittels Echokardiographie am Tag 7 und 21 nach I/R. Des Weiteren wurden Infarktgröße und Expression von α-SMA und HA 21 Tage nach I/R untersucht. Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte die HIL-23Fc Injektionsgruppe keinen Unterschied in der Herzfunktion. Es wurde jedoch eine signifikante Abnahme an α-SMA positiven Myofibroblasten und eine tendenzielle Reduktion der HA Synthese im linken Herzventrikel von Mäusen nach HIL-23Fc Behandlung und 21 Tage nach I/R beobachtet. Des Weiteren war die Infarktgröße in Herzen von HIL-23Fc behandelten Mäusen tendenziell vermindert, im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse korrelieren mit den erzielten Resultaten zum chronischen *closed-chest* I/R Modell an IL-23-*signaling*-defizienten Mäusen. Der milde negative Effekt auf das Remodeling des Herzens, der in IL-23-*signaling*-defizienten Mäusen im chronischen *closed-chest* I/R Modell beobachtet wurde, konnte durch die therapeutische Behandlung mit IL-23 wieder aufgehoben werden [130]. Dieser Befund widerspricht den Ergebnissen von Hu *et al*. 2016 und Liao *et al*. 2017 die zeigten, dass IL-23 Injektion die myokardiale I/R-Verletzung förderte [211, 328]. Ein entscheidender Punkt ist hier, dass die Herzen im Rahmen dieser Arbeit, im Vergleich zu den beiden wissenschaftlichen Veröffentlichungen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach I/R untersucht wurden. Möglicherweise spielt IL-23 nur in der ganz frühen Entzündungsphase eine destruktive Rolle, hat jedoch milde protektive Auswirkungen auf den weiteren Verlauf des kardialen Remodelings. So wurde auch in einem Tumormodell beobachtet, dass die protektive Wirkung der IL-23 Behandlung erst zu späten Zeitpunkten auftrat [338]. Auch die Tatsache, dass in den Studien unterschiedliche Tierarten verwendet wurden, könnte zu anderen Ergebnissen geführt haben. Die genetische Distanz zwischen Mäusen und Ratten ist ziemlich groß und somit bestehen auch funktionelle Unterschiede auf molekularer Ebene [339]. Außerdem erfolgte die IL-23 Injektion in den Studien von Hu *et al*. 2016 und Liao *et al*. 2017 präventiv vor Beginn der Ischämie oder der Reperfusion [211, 328]. Wohingegen in dieser Arbeit IL-23 zur therapeutischen Behandlung eingesetzt wurde [130]. Dass sich eine prophylaktische im Vergleich zur therapeutischen

Behandlung unterschiedlich auf Krankheitsbilder auswirkt, wurde bereits für andere Zytokine gezeigt [340].



Closed-chest + HIL-23Fc		
Reperfusions-dauer	7 Tage	21 Tage
Herzfunktion	↔	↔
Infarktgröße	–	↔
α-SMA Expression	–	↑
HA Expression	–	↔

Abbildung 11: Zusammenfassende Ergebnisse zum therapeutischen Effekt von HIL-23Fc auf das ischämische Herz von C57/BL6J Mäusen, die in einem *closed-chest* I/R Modell herausgefordert wurden. Die Behandlung von C57/BL6J Mäusen mit HIL-23Fc führt zu keiner signifikanten Verbesserung der Herzfunktion und des myokardialen Remodelings nach I/R. Die HIL-23Fc Injektion bewirkt ausschließlich einen signifikanten Anstieg der α-SMA Expression 21 Tage nach Reperfusion [130]. Pfeil nach oben (↑): Anstieg dieses Parameters im Vergleich zur Kontrollgruppe; Pfeil nach links und rechts (↔): Keine Veränderung dieses Parameters im Vergleich zur Kontrollgruppe; Bindestrich (-): Dieser Parameter wurde nicht untersucht.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass IL-23 keine Schlüsselrolle im kardialen Remodeling nach I/R einnimmt und eine therapeutische Behandlung mit IL-23 zu keiner signifikanten Verbesserung der Infarktgröße beiträgt [130].

7.2. Neuartiges synthetisches Zytokinrezeptorsystem phänokopiert natürliche Zytokinrezeptorsignale *in vitro* und *in vivo*

7.2.1. Das synthetische Zytokinrezeptorsystem phänokopiert die IL-23 Signalgebung und ist leicht ein- und ausschaltbar

Zytokine sind an vielen Prozessen im Körper beteiligt, wie an der Differenzierung, Viabilität und Zellwachstum und werden als Hormone des Immunsystems bezeichnet [40-42]. Sie üben ihre Funktion aus, in dem sie an ihre spezifischen, signalgebenden Rezeptoren in der Plasmamembran binden [341]. Die Regulation der Signalweiterleitung basiert auf natürlichen biologischen Schaltern [139]. Eine schnelle Aktivierung der Zytokinantwort führt häufig zu einer lang

anhaltenden Inhibierung der Zytokinrezeptoren durch unterschiedliche negative Rückkopplungsmechanismen, wie unter anderem durch SOCS3 [227, 229]. Bis heute ist es Wissenschaftlern nicht gelungen ein schaltbares und hintergrundfreies Zytokinrezeptorsystem zu entwickeln, mit einer vollständigen Kontrolle über die Rezeptorzusammensetzung. Ein solches System ist für neue therapeutische Ansätze von großer Bedeutung. So ist auch die therapeutische Anwendung von Zytokinen mit Nebeneffekten verbunden, denn bisher ist es mit ihnen nicht möglich, eine gezielte, lokal begrenzte Aktivierung der Zielzellen im gewünschten Gewebe zu erreichen [342]. Erste Erfolge zur Zelltypspezifischen Therapie wurden mittels einer Kombination des Zytokins und eines zellspezifischen Antikörpers erreicht. Dabei wurde der TNF Signalweg gezielt nur auf myeloiden Zellen inhibiert [343].

Im Rahmen der Publikation 2 (s. Kapitel 4) wurde eine hintergrundfreie SyCyR-Technologie entwickelt, die eine exakte Phänokopie natürlicher Zytokinrezeptorsignalwege sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* ermöglicht [98, 308]. Der SyCyR ist hierbei streng modular aufgebaut, bestehend aus einem Nanobody, der sich spezifisch gegen GFP oder mCherry richtet [298, 299], gefolgt von der TMD und einer ICD des natürlichen, zu untersuchenden Rezeptors [98, 308]. Für den Aufbau der synthetischen Zytokinrezeptoren wurden Nanobodies verwendet die sich spezifisch gegen GFP und mCherry richteten [298, 299]. An Säugetieren wurde bereits gezeigt, dass sowohl Nanobodies, als auch die Fluoreszenzproteine GFP und mCherry keine toxischen Reaktionen in Zellen auslösen [296, 344, 345].

Das SyCyR-System wurde zunächst für eine Nachbildung der natürlichen IL-23 Signaltransduktion angewandt [98]. Die natürliche IL-23 Signalweiterleitung basiert auf der Bindung von IL-23 an den IL-23R und IL-12Rβ1 [72, 109]. Um die IL-23 Signalgebung zu imitieren, wurde der extrazelluläre Teil vom IL-23R und IL-12Rβ1 durch einen mCherry-Nanobody (C_{VHH}) bzw. GFP-Nanobody (G_{VHH}) ersetzt [298, 299]. Die SyCyRs wurden anschließend entweder nacheinander (SyCyR(IL-23)), in einem 2A Konstrukt (SyCyR(IL-23/2A) oder einzeln (C_{VHH}-IL-23R oder G_{VHH}-IL-12Rβ1) in Ba/F3-gp130 Zellen exprimiert [98]. Im 2A Konstrukt werden mindestens zwei cDNAs, die für unterschiedliche Proteine kodieren, in einem Transkript vereinigt. Die Expression erfolgt dabei aus einem einzigen offenen Leseraster [346]. Suthaus *et al*. 2010 bestätigten die biologische Aktivität von Rezeptorfusionsproteinen, deren Expression aus einem Transkript erfolgte [247]. Als SyCyR-Liganden wurden Variationen von synthetischen Fusionsproteinen, bestehend aus einer definierten Anzahl an GFP und mCherry, hergestellt und von *chinese hamster ovary* (CHO)-Zellen produziert [98]. CHO-Zellen zählen

mittlerweile zum standardisierten Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen in klinischen Anwendungen [347]. Die generierten Ba/F3-gp130 Zellen wurden schließlich hinsichtlich ihrer Proliferation und Signaltransduktionswege untersucht [98]. Hierbei zeigte sich, dass eine Proliferation in Ba/F3-SyCyR(IL-23) und SyCyR(IL-23/2A) Zellen mit den fusionierten Liganden GFP-mCherry oder 2xGFP-mCherry ausgelöst wurde, jedoch nicht mit monomerem GFP oder mCherry. Bei Ba/F3-gp130 Zellen, die einen einzelnen SyCyR exprimierten, wurde in Anwesenheit fusionierter oder monomerer Fluoreszenproteine, ebenfalls keine Proliferation gemessen [98]. Diese Ergebnisse bestätigen die hohe Selektivität von GFP-mCherry als synthetische Zytokinliganden. Auch in weiteren Studien wurde die hohe Spezifität von GFP-Nanobodies und mCherry-Nanobody gezeigt [298, 299, 348]. Des Weiteren wurde in Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A) Zellen beobachtet, dass ein lösliches G_{VHH}-C_{VHH} Fusionsprotein die GFP-mCherry induzierte Proliferation vollständig inhibierte [98]. Dies macht deutlich, dass SyCyRs nicht nur gezielt an-, sondern auch wieder ausgeschaltet werden können. Sie besitzen damit das Potenzial im Körper als Schalter zu fungieren, um biologische Prozesse zu steuern. Das SyCyRs im Vergleich zu natürlichen Zytokinrezeptoren nahezu ein identisches Proliferationsverhalten in Zellen bewirkten, zeigte sich im Dosis-abhängigen Zellviabilitätstest [98]. Hierbei wurden Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A) Zellen und Ba/F3-IL-23R-IL-12Rβ1 mit verschiedenen Konzentrationen an GFP-mCherry bzw. HIL-23 stimuliert und deren Proliferation gemessen. Die Daten zeigten, dass die halbmaximale Proliferation bei nahezu identischen Ligandenkonzentrationen von 5-10 ng/ml erreicht wurde. Der Aspekt, dass Ba/F3-IL-23R-IL-12Rβ1 Zellen eine halbmaximale Proliferation bei 5-10 ng/ml HIL-23 aufweisen, wurde bereits in wissenschaftlichen Veröffentlichungen gezeigt [68] und auch in Publikation 3 (s. Kapitel 5) reproduziert. Weiterhin wurden SyCyRs hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Imitierung von Signaltransduktionswegen untersucht [98]. Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A) zeigten nach der Stimulation mit GFP-mCherry und 2xGFP-mCherry, jedoch nicht mit monomeren Fluoreszenzproteinen oder 3xGFP, eine Aktivierung der IL-23-typischen Signaltransduktionswege STAT3, ERK1/2 und AKT [98]. Hiermit werden erneut die hohe Selektivität und die Imitierungsgenauigkeit deutlich, die mit den Fusionsproteinen erreicht werden kann. Außerdem ist das System zellspezifisch, denn die Aktivierung der zellulären Antwort erfolgt nur in Zellen, die SyCyRs an der Oberfläche exprimieren. Natürliche Zytokinrezeptorkomplexe induzieren die Signalweiterleitung über die Rezeptor-assozierten JAKs [100-102]. JAKs haben keine kovalente Bindung mit den Zytokinrezeptoren, sondern sind mit

ihnen nur konstitutiv assoziiert [135, 136]. Nach Bindung des natürlichen Liganden an die Zytokinrezeptoren werden JAKs in unmittelbare Nähe gebracht und es erfolgt eine Transphosphorylierung, bei der sie von einem inaktiven in einen aktiven Status wechseln [99]. Die induzierte Kinaseaktivität führt zur Phosphorylierung von intrazellulären Rezeptortyrosinen und Signalmolekülen wie STAT3, ERK1/2 und AKT [109, 111]. Eine solche Transphosphorylierung der JAKs wurde im Rahmen der Publikation 2 (s. Kapitel 4) nicht nur bei einem natürlichen, sondern auch bei einem synthetischen Rezeptorkomplex beobachtet [98]. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die Interaktion zwischen GFP-mCherry und den synthetischen Rezeptoren (C_{VHH}-IL-23R und G_{VHH}-IL-12Rβ1) eine Dimerisierung der Rezeptorketten hervorruft und die Kinaseaktivität aktiviert. Dabei werden alle IL-23-typischen Signaltransduktionswege angeschaltet [98]. Außerdem wurde gezeigt, dass das SyCyR-System nicht nur in murinen Zellen angewandt werden kann, sondern auch in humanen Zellen. Hierbei ließ sich ebenfalls die IL-23-typische Signaltransduktion phänokopieren. Humane U4C Zellen, die sowohl C_{VHH}-IL-23R als auch G_{VHH}-IL-12Rβ1 koexprimierten, zeigten nach Stimulation mit GFP-mCherry die Phosphorylierung von STAT3 Molekülen [98].

Des Weiteren wurden detaillierte, zeitaufgelöste Analysen der intrazellulären Signaltransduktion durchgeführt [98]. Dabei konnte eindeutig gezeigt werden, dass Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A) und Ba/F3-IL-23R-IL-12Rβ1 Zellen, nach Aktivierung durch den jeweiligen Liganden GFP-mCherry oder HIL-23, einen identischen kinetischen Verlauf von pSTAT3 und SOCS3 aufwiesen. Sowohl beim natürlichen, als auch beim synthetischen Rezeptorkomplex wurde die Phosphorylierung von STAT3 bei einer Langzeitaktivierung nicht supprimiert [98]. In der Literatur wurde eine solche langanhaltende IL-23-induzierte STAT3 Phosphorylierung bereits beschrieben [109]. Dieses Ergebnis ist darauf zurückzuführen, dass der IL-23 Rezeptorkomplex keiner negativen Rückkopplung durch SOCS3 Moleküle unterliegt [109]. Mit einer allgemeinen Analyse typischer IL-23 Signaltransduktionswege und einem zeitabhängigen Aktivierungsprofil wurde gezeigt, dass der Austausch der extrazellulären Domänen von Zytokinrezeptoren durch Nanobodies die Signalstärke und Kinetik nicht beeinflussten. Beobachtungen ergaben, dass die intrazelluläre IL-23 Antwort exakt vom synthetischen System imitiert wurde [98]. Ein kürzlich erschienener Bericht zeigte, dass nicht nur die intrazelluläre Rezeptordomäne, sondern auch die Genauigkeit der Rezeptorzusammensetzung wichtig für die Stärke der Signalgebung ist [349]. Kim und Mitarbeiter beobachteten 2010, dass bereits eine Punktmutation im Epo-Protein die Dimerisierung der Rezeptoren beeinflusste. Die veränderte Epo Rezeptordimerisierung resultierte

in einer eingeschränkten Phosphorylierung der STAT1- und STAT3-Moleküle, jedoch nicht in einer verminderten STAT5 Aktivierung [349]. Ein solches Phänomen konnte in SyCyRs durch detaillierte Analysen der Signaltransduktionswege ausgeschlossen werden. Auch Analysen zur globalen mRNA Expression verifizierten die Präzision der synthetischen Rezeptoren zur Imitierung der natürlichen Zytokinsignaltransduktion. Die Transkriptomanalyse ergab, dass 85% aller angeschalteten Gene sowohl in Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A), als auch in Ba/F3-IL-23R-IL-12Rβ1 Zellen nach Stimulation mit GFP-mCherry bzw. HIL-23 reguliert wurden [98]. In beiden Systemen fand die Transkription typischer STAT3 Zielgene, wie *PIM1*, *SOCS3* und *OSM* statt [98]. Um alle möglichen Effekte zu berücksichtigen, wurde für die Transkriptomanalyse eine 1,5-fache Veränderung der mRNA als untere Grenze für die statistische Auswertung ausgewählt. Dadurch konnten 15% der mRNA-Transkripte für das synthetische System im Vergleich zum natürlichen System nicht nachgewiesen werden. Durch Anpassung der Grenzen der statistischen Auswertung wurden 12% der fehlenden mRNA-Transkripte auch für das synthetische System bestätigt, die ebenfalls in dieselbe Richtung wie im natürlichen System reguliert wurden. Nur die Regulation von 3% der mRNA-Transkripte erfolgte auf einer anderen Weise. Ein signifikanter Einfluss auf die Ergebnisse der mRNA Expression wurde erwartet, da zwei unterschiedliche Zellsysteme und verschiedene Liganden für die Zellstimulation verwendet wurden. Von großer Bedeutung ist jedoch, dass von 28.000 analysierten Transkripten nur 0,004% alle Gene im synthetischen System, verglichen zum natürlichen System, unterschiedlich reguliert wurden. Dieser Befund macht deutlich, dass die Genregulation in beiden Systemen sehr ähnlich ablief. Zusätzlich zeigten *Pathway*-Analysen des natürlichen und synthetischen IL-23 Rezeptorkomplexes, dass die regulierten Gene durch GFP-mCherry und HIL-23 den gleichen Signalwegen zuzuordnen sind [98]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die erste Studie mit synthetischen Rezeptorkomplexen durchgeführt, die eine detaillierte Analyse der Signaltransduktionswege und Transkriptomprofile beinhaltet [98].

7.2.2. Der synthetische IL-23R, jedoch nicht IL-12Rβ1, ist als homodimerer Komplex biologisch aktiv

Anhand von kürzlich veröffentlichten Studien wurde vermutet, dass die IL-23 Signaltransduktion nicht ausschließlich über den heterodimeren Komplex aus IL-23R und IL-12Rβ1 verlaufen kann, sondern auch über IL-23R Homodimere [93, 97, 350]. Seit langem ist bekannt, dass IL-12Rβ1 eine geringe Affinität zu dem Zytokin IL-23 aufweist, wohingegen der IL-23R eine hohe Affinität hat [70, 72]. Die Studie von Li und Mitarbeitern 2013 zeigte erstmals die biologische

Aktivität von IL-23R Homodimeren in Krebszellen. Sie demonstrierten, dass trotz der Blockierung von IL-12Rβ1, geringe Konzentrationen an IL-23 zu einer Zellproliferation und STAT3 Aktivierung in Krebszellen führte [350]. Des Weiteren wurde von Schröder *et al.* 2015 beobachtet, dass die Stimulation von Ba/F3-IL-23R-IL-12Rβ1 Zellen mit p40_D2D3-p19Fc die Zellproliferation und Signaltransduktion nicht inhibierte. Das Fusionsprotein p40_D2D3-p19Fc besaß eine Deletion der Domäne 1 in der p40 Untereinheit, sodass die Bindung des IL-12Rβ1 verhindert wurde [93]. Auch weitere Veröffentlichungen postulierten, dass IL-23R in der Lage ist, bioaktive Homodimere zu bilden. Hierbei wurde berichtet, dass eine vollständige Deletion der IL-23R Gelenkregion zu einer ligandenunabhängigen, autonomen Rezeptoraktivierung führte, unabhängig vom IL-12Rβ1. Der homodimere IL-23R Komplex ist somit biologisch aktiv und benötigte den IL-12Rβ1 nicht, um eine Signaltransduktion zu vermitteln [97].

Um diesem Themenbereich nachzugehen und die biologische Aktivität des IL-23R Homodimers zu überprüfen, wurde ein SyCyR generiert, bestehend aus extrazellulärem G_{VHH} fusioniert an die TMD und ICD des IL-23R [98, 308]. Dieser wurde anschließend einzeln in Ba/F3-gp130 Zellen exprimiert (Ba/F3-SyCyR(IL-23R)). Zellviabilitätsanalysen zeigten, dass sich ein aktiver IL-23R-SyCyR Rezeptorkomplex mit 2xGFP-mCherry und 3xGFP bildete. Monomere Fluoreszenzproteine und GFP-mCherry induzierten in Ba/F3-SyCyR(IL-23R) Zellen dagegen keine Proliferation. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Untersuchung der Signaltransduktion erzielt. Die Phosphorylierung von JAK, STAT3, ERK1/2 und AKT erfolgte in Ba/F3-SyCyR(IL-23R) Zellen ausschließlich nach Stimulation mit 2xGFP-mCherry oder 3xGFP. Die Signaltransduktion wurde dagegen nicht in Anwesenheit von GFP induziert [98]. Hiermit wurde erneut gezeigt, dass SyCyRs mit hoher Spezifität und Affinität aktiviert werden. Des Weiteren bestätigten die im Rahmen der Publikation 2 (s. Kapitel 4) gezeigten Ergebnisse, die Annahmen eines möglichen biologisch aktiven homodimeren IL-23 Rezeptorkomplexes. Auch konnten Studien bereits zeigen, dass der IL-12Rβ1 für die Bindung an die Untereinheit p40 erforderlich ist, jedoch nicht für die IL-23 Funktion [93, 350]. Die Hauptkomponente für die Signalweiterleitung stellt der IL-23R dar, der für die Entwicklung diverser Erkrankungen verantwortlich zu sein scheint [351]. Für die hohe Anfälligkeit für Krankheiten sind vor allem kürzlich identifizierte SNPs innerhalb des IL-23R verantwortlich [180, 181, 352].

Der kinetische Verlauf von pSTAT3 und SOCS3 war in Ba/F3-SyCyR(IL-23R) Zellen vergleichbar mit dem in Ba/F3-IL-23R-IL-12Rβ1 Zellen nach Stimulation mit 3xGFP bzw. HIL-23 [98]. Wie zuvor in dem natürlichen heterodimerem Rezeptorkomplex gezeigt [98, 109],

konnte auch in homodimerem IL-23R-SyCyR eine langanhaltende STAT3 Aktivierung beobachtet werden [98]. Diese Erkenntnis legt nahe, dass auch IL-23R Homodimere keiner negativen Rückkopplung durch SOCS3 unterliegen. Unterschiede zwischen dem hetero- und homodimeren Rezeptorkomplex wurden im dosisabhängigen Zellviabilitätstest beobachtet. Während Ba/F3-IL-23R-IL-12Rβ1 Zellen in Anwesenheit von HIL-23 eine halbmaximale Proliferation bei 5-10 ng/ml erreichten, zeigten Ba/F3-SyCyR(IL-23R) Zellen eine halbmaximale Proliferation erst bei 10-20 ng/ml 3xGFP [98]. Auch die nähere Betrachtung der Genexpression offenbarte eine Differenz zwischen einem hetero- und homodimeren Rezeptorkomplex, obwohl die allgemeine Aktivierung der IL-23-typischen Signalwege ähnlich zu sein schien. Transkriptionsanalysen zeigten, dass nach Stimulation der Ba/F3-SyCyR(IL-23R) Zellen mit 3xGFP nur 37% der Gene, bei einer 1,5-fachen Veränderung der mRNA, hoch- oder runterreguliert wurden, im Vergleich zu Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A) Zellen in Anwesenheit von GFP-mCherry. Dieser Effekt könnte sich auch durch die verringerte Proliferation begründen, die bei der SyCyR(IL-23R) Signalgebung im Vergleich zum natürlichen heterodimeren Rezeptorkomplex ersichtlich war [98]. Zusammenfassend zeigte sich, dass die Dimerisierung zweier IL-23 Rezeptoren eine Aktivierung von Jak2 hervorruft und zur IL-23-typischen Signaltransduktion führt. Obwohl die Stimulation von Ba/F3-SyCyR(IL-23R) Zellen mit 3xGFP eine insgesamt reduzierte Genexpression im Vergleich zu GFP-mCherry stimulierten Ba/F3-SyCyR(IL-23/2A) Zellen induzierte, phänokopierte die homotypische Aktivierung von SyCyR(IL-23R) die IL-23 Signaltransduktion in Bezug auf Signalwege und Kinetik [98]. Laut Literatur können einige Zytokine auf natürlichem Wege über Rezeptorhomodimere signalisieren. Ein Beispiel hierfür ist das kürzlich entdeckte Zytokin IL-35 der IL-12-Familie. Veröffentlichungen zeigten, dass die IL-35 Signalweiterleitung durch die Rekrutierung von hetero- und homodimeren gp130 und IL-12Rβ2 Rezeptoren erfolgte [75]. Auch in Publikation 3 (s. Kapitel 5) wurde dieses Phänomen beobachtet [68]. Ebenfalls können einige Mitglieder der IL-6-Familie ihre Signalweiterleitung über die Aktivierung von Homodimeren vermitteln. So sind IL-6 und IL-11 in der Lage, nach Bindung an ihren spezifischen α-Rezeptor, mit homodimeren gp130 Rezeptoren zu interagieren [221, 353].

Mit dem Wissen zur Zytokin-induzierten Signalweiterleitung durch Rekrutierung von Rezeptorhomodimeren, wurde auch die biologische Aktivität von homodimeren IL-12Rβ1 mittels SyCyR-System untersucht [98]. Hierzu wurden Ba/F3-gp130- und U4C-Zellen generiert, die einen SyCyR, bestehend aus G_{VHH}, TMD und ICD des IL-12Rβ1 (G_{VHH}-IL-12Rβ1), auf der

Zelloberfläche exprimierten [98, 308]. Diese Zellen wurden anschließend hinsichtlich ihrer Zellviabilität und STAT3 Aktivierung evaluiert. Nach Stimulation der generierten Zellen mit 2xGFP-mCherry und 3xGFP konnte weder eine Proliferation, noch eine Phosphorylierung von STAT3 beobachtet werden [98]. Dieses Resultat weist darauf hin, dass der IL-12Rβ1 Homodimer keine Signalfunktion hat und somit biologisch nicht aktiv ist. Dies bestätigt auch die Annahme, dass nach Bindung des Zytokins IL-23 an IL-23R und IL-12Rβ1, ausschließlich der IL-23R die Signalweiterleitung vermittelt [86, 350]. Neben der Kinaseaktivierung ist über die Signalfunktion von IL-12Rβ1 im Rezeptorkomplex wenig bekannt [139]. Studien zeigten, dass die IL-23R-assoziierte Jak2 für die IL-23 Signalweiterleitung essenziell ist, während die IL-12Rβ1-assoziierte TYK2 entbehrlich ist [86]. Diese Beobachtungen waren auch auf die Ergebnisse in Publikation 2 (s. Kapitel 4), die mittels der SyCyR-Technologie generiert wurden, zutreffend [98]. Diese Resultate stützen die Annahme, dass der IL-12Rβ1 nur in Kombination mit dem IL-23R eine biologische Funktion hat [350].

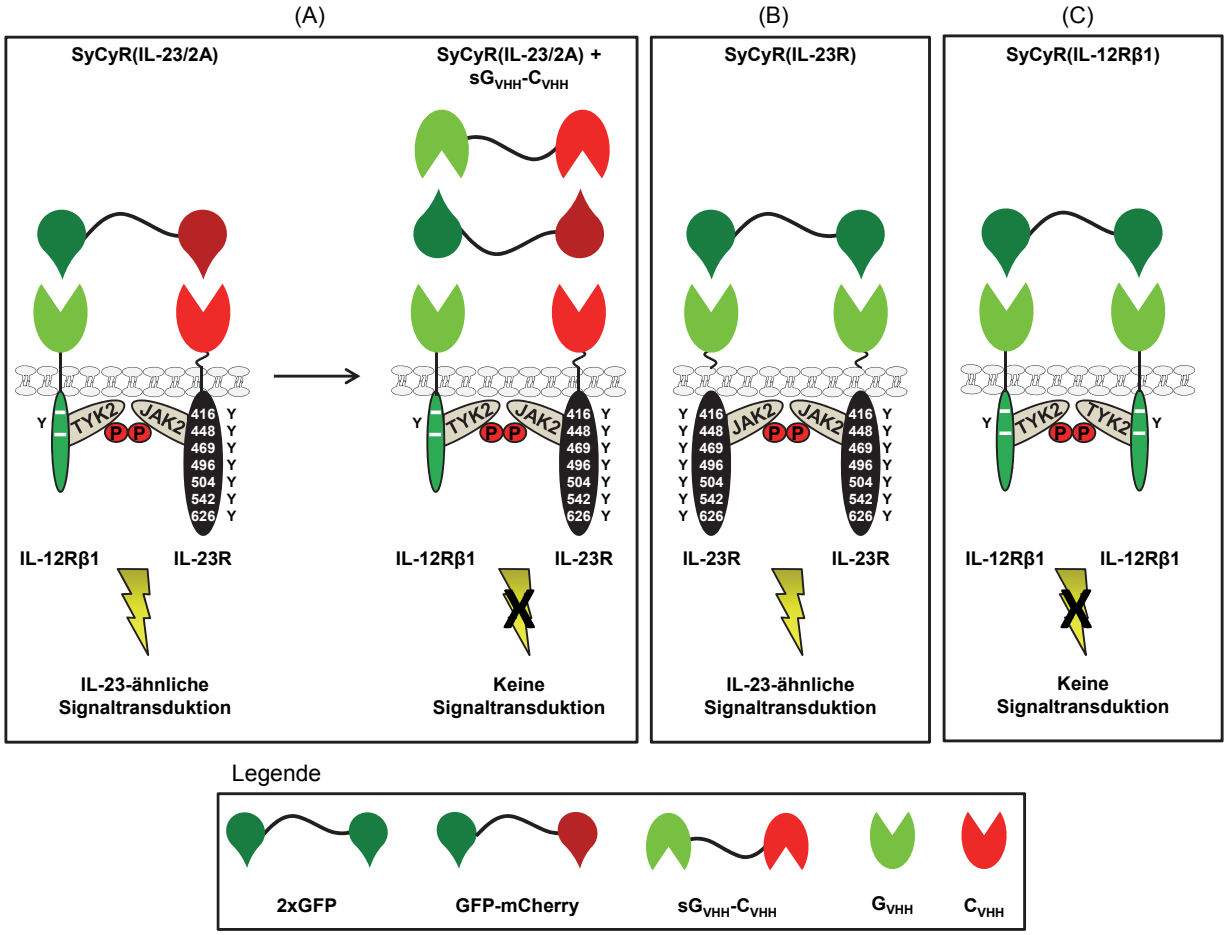


Abbildung 12: Die SyCyR-Technologie phänokopiert die Zytokin-induzierte Signaltransduktion und ermöglicht die definierte Zusammensetzung von Rezeptoren. Die dargestellten SyCyRs bestehen aus einem N-terminalen G_{VHH} oder C_{VHH} gefolgt von der TMD und ICD des IL-12Rβ1 bzw. IL-23R. Beide Rezeptoren weisen eine konstitutive Bindung mit Januskinasen auf. Die fusionierten Fluoreszenzproteine 2xGFP und GFP-mCherry dienen als synthetische Zytokinliganden. (A) SyCyRs für IL-23 (SyCyR(IL-23/2A)) induzieren eine IL-23-ähnliche Signaltransduktion. Durch die Bindung von GFP-mCherry an G_{VHH}-IL-12Rβ1 und C_{VHH}-IL-23R wird die Transphosphorylierung der Rezeptor-assoziierten Januskinasen initiiert und folglich eine IL-23-ähnliche Signalweiterleitung induziert. Des Weiteren kann die IL-23-ähnliche Signaltransduktion wieder abgeschaltet werden. Lösliches G_{VHH}-C_{VHH} Fusionsprotein dient dabei als Inhibitor, der an GFP-mCherry bindet und damit die Interaktion mit SyCyR(IL-23/2A) verhindert. Die IL-23-ähnliche Signalweiterleitung wird somit inhibiert. (B) Die Homodimerisierung von G_{VHH}-IL-23R führt zur IL-23-ähnlichen Signaltransduktion. (C) Der homodimere Komplex aus G_{VHH}-IL-12Rβ1 kann durch die Rezeptor-assoziierten TYK2 keine Signaltransduktion induzieren [98, 308].

7.2.3. SyCyRs phänokopieren die IL-6/IL-11 Signalweiterleitung *in vitro* und *in vivo*

Nachdem gezeigt wurde, dass SyCyRs durch homodimere und multimere Liganden aktiviert werden können, wurde in Publikation 2 (s. Kapitel 4) das System auf den IL-6/IL-11 Rezeptorkomplex ausgeweitet [98, 308].

Für die Signaltransduktion binden IL-6 und IL-11 an ihren nicht signalgebenden α-Rezeptor und bilden darauffolgend einen Komplex mit dem gp130 Rezeptor [221, 353]. Die Signalweiterleitung erfolgt über die gp130-assoziierten Januskinasen. Diese phosphorylieren die intrazellulären Tyrosinreste des gp130 Rezeptors [219, 220], die als Adapterstellen für die nachgeschalteten Signalmoleküle dienen. Durch die Aktivierung des gp130 Homodimers werden die drei Hauptsignalwege JAK/STAT, MAPK und PI3K angeschaltet [74], die wiederum negativen Rückkopplungsmechanismen unterliegen [229]. Jedoch zeigen Berichte, dass Deletionen innerhalb der extrazellulären Domäne des gp130 Rezeptors zu einer ligandenunabhängigen und autonomen Aktivierung der IL-6/IL-11 Signalwege führen. Diese konstitutiv aktiven gp130 Rezeptoren tragen zur Entwicklung von entzündlichen hepatozellulären Adenome bei [237, 240]. Zur Analyse der konstitutiven biologischen Aktivität von gp130 Homodimeren, sind bereits mehrere synthetische Zytokinrezeptorsysteme entwickelt worden, die zu einer ligandenunabhängigen Dimerisierung befähigt sind. Mit diesen Systemen wurde eine langanhaltende Aktivierung der IL-6/IL-11 Signaltransduktion nur bedingt imitiert, da sie nur zu einer konstitutiven Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 führen und die Signalwege ERK und AKT nicht aktivieren [246-248].

Im Rahmen der Publikation 2 (s. Kapitel 4) wurde gezeigt, dass der IL-6/IL-11 Signalweg durch eine synthetische gp130 Homodimerisierung mittels der SyCyR-Technologie *in vitro* und *in vivo* vollständig phänokopiert werden konnte [98, 308]. Hierzu wurde der SyCyR(IL-6) hergestellt, bestehend aus einem extrazellulären G_{VHH} fusioniert mit der TMD und ICD von gp130 (G_{VHH}-gp130) [98, 308]. Nach Stimulation mit 2xGFP-mCherry, jedoch nicht mit GFP-mCherry, wurden die Januskinasen JAK2, TYK2 und JAK1 in Ba/F3-SyCyR(IL-6) Zellen aktiviert. Des Weiteren wurde ihm Rahmen der Arbeit gezeigt, dass der synthetische Ligand aus mindestens 2xGFP bestehen muss, um die Signalwege JAK/STAT3 und MAPK in Ba/F3-SyCyR(IL-6) Zellen zu induzieren, da die Signalinitiation nach Stimulation mit 1xGFP ausblieb [98]. Somit hat sich bestätigt, dass die IL-6/IL-11 Signaltransduktion über die Rekrutierung von zwei gp130 Rezeptoren verläuft [354, 355].

Im Vergleich zwischen Ba/F3-SyCyR(IL-6) und Ba/F3-gp130 Zellen zeigte sich, dass eine halbmaximale Proliferation bei nahezu identischen Ligandenkonzentrationen von etwa 1 ng/ml 3xGFP bzw. HIL-6 erreicht wurde [98]. Der Wert zur halbmaximalen Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen in Anwesenheit des Liganden HIL-6 deckte sich mit dem Wert aus der Literatur [356]. Diese Beobachtungen machten deutlich, dass mittels des SyCyR-Systems nicht

nur die IL-23 Signaltransduktion präzise phänokopiert werden konnte, sondern auch der IL-6/IL-11 Signalweg im Detail imitiert wurde. Darüber hinaus zeigte sich, dass der SyCyR(IL-6)-induzierte STAT3 Signalweg, ebenfalls wie der natürliche [229], einer negativen Rückkopplung durch SOCS3 unterlag [98]. Die zeitaufgelöste Analyse der intrazellulären Signaltransduktion demonstrierte mit 3xGFP stimulierten Ba/F3-SyCyR(IL-6) Zellen eine schnelle STAT3 Phosphorylierung gefolgt von einer SOCS3 Produktion und Hemmung der Signaltransduktion. Dieser Zeitverlauf war verglichen mit der Kinetik von Ba/F3-gp130 Zellen, nach Stimulation mit HIL-6, nahezu identisch [98]. Die Dynamik der STAT3-Phophorylierung, die durch IL-6/IL-11-induziert und durch negative Rückkopplungsmechanismen gegenreguliert wird, wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben [109, 218] und auch im Rahmen dieser Arbeit mit einem natürlichen und synthetischen Rezeptorkomplex bestätigt [98]. Zugleich ist es wichtig zu erwähnen, dass das hier dargestellte SyCyR-System keine autonome Aktivierung der IL-6/IL-11 Signalwege auslöste. Die IL-6/IL-11 Signalweiterleitung mittels SyCyRs erfolgte erst nach Bindung der synthetischen Liganden und stellt damit eine Phänokopie des natürlichen Systems dar. Unterdessen wird die konstitutive gp130 Aktivierung als Onkogen definiert [237, 357], wohingegen das SyCyR-System kein onkogenes Potenzial aufweist, da es zu keiner langanhaltenden Aktivierung der IL-6/IL-11 Signaltransduktion beiträgt [98].

Darüber hinaus wurde anhand der SyCyR(IL-6) Expression in der Leber von Mäusen gezeigt, dass die SyCyRs ebenfalls *in vivo* biologisch aktiv sind [98]. Die SyCyR-Technologie erlaubt somit spezifische Zelltypen in Zielorganen anzusteuern. Mittels hydrodynamischer Schwanzveneninjektion wurden G_{VHH}-gp130- und/oder 3xGFP-kodierende cDNAs in C57/BL6 Mäuse eingebracht. Diese Technik führte hauptsächlich zur *in vivo* Transfektion von Fremd-DNA in Hepatozyten [358]. Mit der Verwendung der hydrodynamischen Injektion wurde sichergestellt, dass hohe systemische Konzentrationen von zirkulierenden Fremd-DNAs erreicht wurden [98, 359]. 24 h nach Transfektion der G_{VHH}-gp130- und/oder 3xGFP-kodierenden cDNAs wurden Hepatozyten hinsichtlich der Phosphorylierung von STAT3 und Erhöhung der Akute-Phase-Reaktion untersucht. Zusätzlich wurden die Hepatozyten und das Blut auf das Vorhandensein von 3xGFP und G_{VHH}-gp130 analysiert. Hierbei wurde gezeigt, dass eine Phosphorylierung von STAT3 *in vivo* ausschließlich aus Kombination von G_{VHH}-gp130 und 3xGFP erfolgte. Die Phosphorylierung von STAT3 blieb in Mäusen aus, denen nur eine cDNA, kodierend für G_{VHH}-gp130 oder 3xGFP, injiziert wurde [98]. Dieses Ergebnis zeigt die hohe Spezifität, Affinität und Aktivität von SyCyRs *in vivo*. Interessanterweise wurde eine starke

Akkumulation von G_{VHH}-gp130 oder 3xGFP in Mäusen beobachtet, denen einzeln cDNAs, welche für das jeweilige Protein kodierten, injiziert wurden [98]. Dies deutet darauf hin, dass bei Doppelinjektion die SyCyRs über rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert und degradiert wurden. Die Endozytose ist ein Mechanismus zur Signalregulation. Hierbei werden Rezeptoren von der Zelloberfläche in das –innere befördert. Dies tritt ein, wenn die ligandeninitiierte Signaltransduktion lange anhält [360]. Obwohl Daten belegen, dass gp130 auch ligandenunabhängig endozytiert wird [361], lassen die hier gezeigten Ergebnisse vermuten, dass die Rate der Internalisierung und Degradation der Rezeptoren nach Ligandenbindung erhöht wird [362, 363].

Des Weiteren zeigten Mäuse ausschließlich nach kombinatorischer Schwanzveneninjektion von G_{VHH}-gp130 und 3xGFP cDNAs eine übermäßige mRNA Expression von *Saa1* in der Leber [98]. Dieses Gen kodiert für das Akute-Phase Protein SAA1 und wird vor allem durch IL-6 in der Leber gebildet [235, 239]. Somit spiegelt sich hierbei die präzise Imitierung der IL-6/IL-11-initiierten physiologischen Reaktionen durch gp130-SyCyRs wieder. Des Weiteren wurde deutlich, dass das SyCyR-System zellspezifisch ist, da nur Leberzellen, die G_{VHH}-gp130 exprimierten, durch 3xGFP aktiviert wurden [98]. Die Tiere zeigten nach Injektion beider cDNAs äußerlich keine Symptome. Es konnte weder eine Erhöhung der Körpertemperatur noch Abnormitäten im Verhalten beobachtet werden, wie es normalerweise der Fall bei einer IL-6 Injektion wäre, da es alle Zellen im Körper beeinflusst [364]. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die SyCyR-Technologie eine vielfältige Anwendung erlaubt, um zelltypspezifische Rezeptoraktivierung zu untersuchen. Bis heute ist es keiner Arbeitsgruppe gelungen, solche detaillierten Analysen mit einem synthetischen Rezeptorsystem durchzuführen.

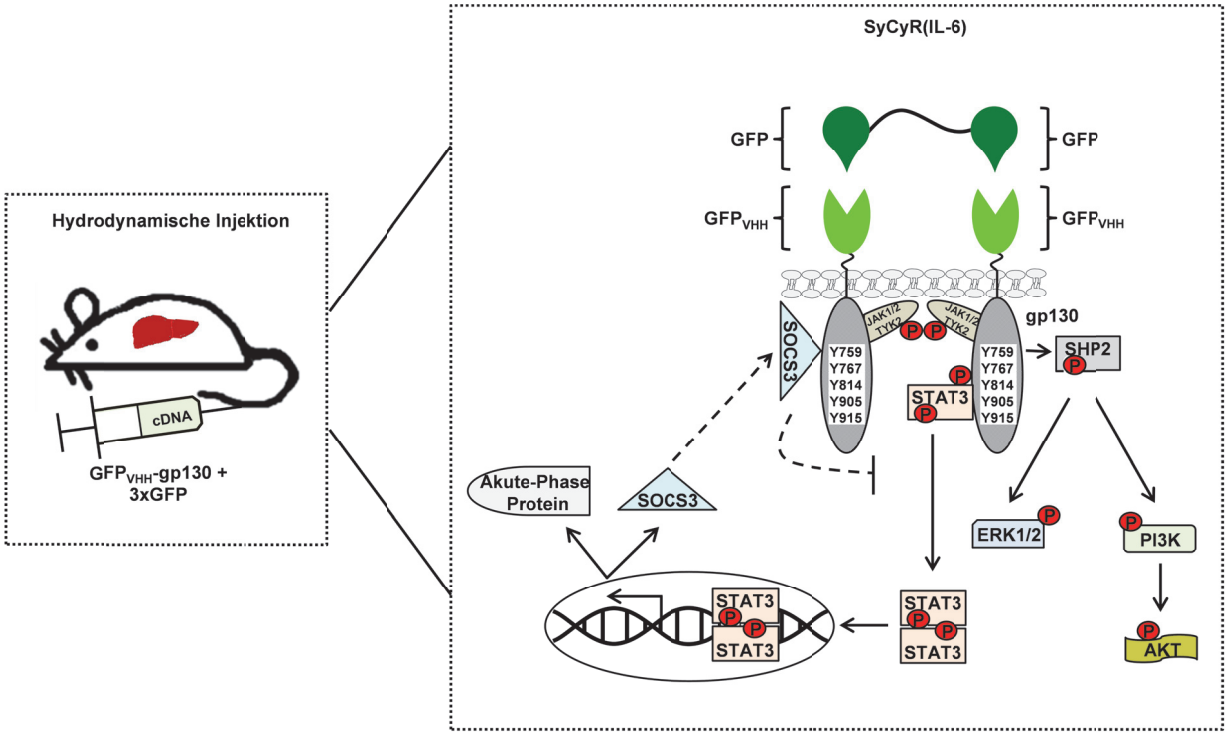


Abbildung 13: Gp130-SyCyRs sind *in vivo* biologisch aktiv. Die *in vivo* Transfektion von G_{VHH}-gp130 (SyCyR(IL-6))- und 3xGFP-kodierender cDNA in der Leber erfolgte mittels hydrodynamischer Injektion. Die Expression von SyCyR(IL-6) und synthetischem 3xGFP-Liganden phänokopiert die IL-6/IL-11 Signaltransduktion in der Leber von C57/BL6 Mäusen [98, 308].

7.2.4. Das SyCyR-System kann zur STAT3-Transphosphorylierung genutzt werden

Unter Transphosphorylierung wird üblicherweise die gegenseitige Phosphorylierung von Rezeptor-assoziierten JAKs verstanden, die nach einer ligandeninduzierten Rezeptordimerisierung erfolgt [100-102]. Die aktiven JAKs können daraufhin die intrazellulären Tyrosinreste ihres konstitutiv assoziierten Rezeptors phosphorylieren [45, 103]. In den 90er Jahren wurde jedoch erstmals für die Tyrosinkinase Rezeptoren der *platelet-derived growth factor* (PDGF)-Familie beschrieben, dass eine Tyrosinrezeptorkinase auch dazu befähigt ist, nach Rezeptordimerisierung einen mutierten, Kinase-inaktiven Rezeptor zu transphosphorylieren und eine Signaltransduktion zu induzieren [365]. Diese Beobachtung konnte auch reproduziert und bestätigt werden [366]. Lai und Mitarbeiter 1998 zeigten anhand eines Rinder-Papillomavirus E5 Proteins, dass dieses mit dem PDGF Rezeptor interagierte und eine Transphosphorylierung zwischen dem Kinase-aktivem und –inaktivem Rezeptor induzierte, welches folglich zu einer Signalweiterleitung führte [366]. Mehrere Studien schilderten ein solches Phänomen auch bei der *epidermal growth factor* (EGF)-Familie [367-369]. Interessanterweise zeigten Luwor *et al.* 2004, dass der Kinase-inaktive mutierte de2-7 EGF Rezeptor (EGFR), der häufig in Verbindung mit der

Entstehung eines Glioms gebracht wird, in der Lage war, die funktionelle Kinase eines wildtypischen EGFR durch Transphosphorylierung zu aktivieren und dadurch die Zellproliferation zu verstärken [368].

In Publikation 2 (s. Kapitel 4) wurde zum ersten Mal die Möglichkeit zur Rezeptor-Transphosphorylierung für Januskinase-assoziierte Zytokinrezeptoren dargelegt. Auf der Grundlage der Publikation von Floss *et al.* 2016 [86] wurde zur Untersuchung der Zytokinrezeptortransphosphorylierung ein intrazellulär verkürzter IL-23R (Δ503) mit G_{VHH} fusioniert (G_{VHH-} IL-23R-ΔSTAT), der fehlende STAT3-Bindemotive aufwies [98, 109, 309]. Floss *et al.* 2016 zeigten, dass der verkürzte Rezeptor nicht mehr zur Phosphorylierung von STAT3, jedoch weiterhin zur Aktivierung von JAK, ERK und AKT, fähig war [109]. Durch Di- und Trimerisierung des G_{VHH}-IL-23R-ΔSTAT in Ba/F3-gp130 exprimierenden Zellen, nach Stimulation mit 2xGFP-mCherry bzw. 3xGFP, konnten die gleichen Ergebnisse, wie zuvor von Floss und Mitarbeitern 2016 für den verkürzten Rezeptor beschrieben [109], erzielt werden [98]. Da die SyCyRs einen modularen Aufbau mit einer extrazellulären Bindestelle für GFP oder mCherrry besaßen, konnte mittels synthetischer Liganden eine genaue Zusammensetzung der Rezeptorstöchiometrie bestimmt werden [98, 308]. Diese Tatsache ermöglichte eine detaillierte Analyse zur biologischen Aktivität von trimeren Rezeptorkomplexen, indem Kinase-assoziierte Rezeptoren der Zytokinfamilie gezielt in einer bestimmten Anordnung in räumliche Nähe zueinander gebracht wurden. Um trimere Rezeptorkomplexe zu erzeugen, wurden neben G_{VHH}-IL-23R-ΔSTAT weitere IL-23R Varianten mit Deletionen innerhalb der ICDs generiert, die einen Aktivitätsverlust der JAKs bewirkten. Die Fusion der JAK-defizienten Rezeptoren erfolgte mit extrazellulären mCherry-Nanobodies (C_{VHH}-IL-23R-ΔJAK-A-C) [86, 98, 299, 308]. Bereits aus der Literatur war für diese Deletionsvarianten bekannt, dass sie unfähig waren, die IL-23 Signalweiterleitung in einem Rezeptorkomplex zu vermitteln [86]. Auch mittels SyCyR-System wurde nach 2xmCherry-Stimulation der Ba/F3-gp130 Zellen, die jeweils eine C_{VHH}-IL-23R-ΔJAK Variante exprimierten, beobachtet, dass die Dimerisierung dieser SyCyRs nicht zur Phosphorylierung von STAT3 führte. Somit wurde demonstriert, dass die homodimeren C_{VHH}-IL-23R-ΔJAK Varianten biologisch nicht aktiv waren [98]. Bemerkenswert war jedoch, dass die Zusammensetzung eines trimeren Komplexes, bestehend aus zwei G_{VHH}-IL-23R-ΔSTAT und einer C_{VHH}-IL-23R-ΔJAK Rezeptorvariante, welches durch 2xGFP-mCherry induziert wurde, eine biologische Aktivität zeigte. Der trimere Komplex resultierte in einer STAT3-Transphosphorylierung und Zellviabilität [98]. Somit wurde erstmals gezeigt, dass aktive Kinase-

assoziierte Zytokinrezeptoren einen Kinase-defizienten Zytokinrezeptor im Komplex transphosphorylieren und dadurch eine Signalweiterleitung induzieren können. Des Weiteren wurde experimentell bewiesen, dass für die Rezeptoraktivierung zwei funktionsfähige JAKs benötigt werden. Denn die GFP-mCherry induzierte Dimerisierung des G_{VHH}-IL-23R-ΔSTAT mit C_{VHH}-IL-23R-ΔJAK führte nicht zur Proliferation und STAT3-Transphosphorylierung [98]. Seit langem wurde angenommen, dass die Signalweiterleitung bei natürlichen Tyrosinrezeptoren und Kinase-assoziierten Rezeptoren ausschließlich nach einer Dimerisierung erfolgt [370], indem die Rezeptorkinasen in räumliche Nähe gebracht und aktiviert werden [100-102]. Die im Rahmen der Publikation 2 (s. Kapitel 4) dargelegten Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass eine STAT3Transphosphorylierung durch Zytokinrezeptoren nur vermittelt werden kann, nachdem die Januskinasen ebenfalls durch Transphosphorylierung aktiviert wurden [98].

Um zu untersuchen, ob die Transphosphorylierung auch auf weitere Zytokinrezeptorketten übertragbar ist, wurde die ICD des G_{VHH}-gp130 soweit gekürzt, bis die Bindungsmotive für STAT, ERK und AKT nicht mehr vorhanden waren (G_{VHH}-gp130-ΔSTAT) [98, 308]. Die Bindungsmotive für die Signalmoleküle innerhalb der ICD des gp130 Rezeptors sind bekannt [371]. Eine Di- oder Trimerisierung der verkürzten Rezeptoren, welche durch 2xGFP-mCherry bzw. 3xGFP induziert wurde, resultierte weder in einer STAT3, noch in einer ERK1/2 Phosphorylierung [98]. Dieses Ergebnis bestätigte den postulierten Bereich der Bindungsmotive für die Signalmoleküle innerhalb des gp130 Rezeptors [371]. Mittels 2xGFP-mCherry wurden zwei G_{VHH}-gp130-ΔSTAT und ein C_{VHH}-IL-23R-ΔJAK zusammengebracht und erneut das Phänomen der Transphosphorylierung, auf Basis eines pSTAT3 Signals und zellulärer Proliferation, beobachtet [98]. Auch im Komplex mit gp130 war eine funktionsfähige Januskinase nicht ausreichend, um den Rezeptor zu aktivieren. Die präsentierten Daten belegten die Transphosphorylierung für unterschiedliche Zytokinrezeptoren, die mit Januskinasen assoziiert waren [98].

Zuletzt sollte in Erfahrung gebracht werden, ob der TYK2-assoziierte IL-12Rβ1 ebenfalls für die STAT3-Transphosphorylierung geeignet ist. Viele Veröffentlichungen beschreiben, dass TYK2 hauptsächlich mit niedrig affinen Rezeptoruntereinheiten interagiert, die keine phospho-Tyrosin basierten STAT Bindungsmotive aufweisen [101, 372-374]. So ist auch der IL-12Rβ1 konstitutiv mit TYK2 assoziiert und weist ebenfalls keine Bindungsmotive für Signalmoleküle auf [94-96]. Signalgebende Rezeptoren sind dagegen häufig mit JAK1 und JAK3 assoziiert, die sich unter anderem mit TYK2 koaktivieren können [375, 376].

Im Rahmen der Publikation 2 (s. Kapitel 4) wurde durch eine 2xGFP-mCherry-induzierte Trimerisierung von zwei G_{VHH}- IL-12Rβ1 und einem C_{VHH}-IL-23R-ΔJAK demonstriert, dass der TYK2-assoziierte IL-12Rβ1 nicht zu einer STAT3-Transphosphorylierung fähig war [98]. Eine STAT3-Transphosphorylierung kann somit nur durch JAK-assoziierte Rezeptoren vermittelt werden.

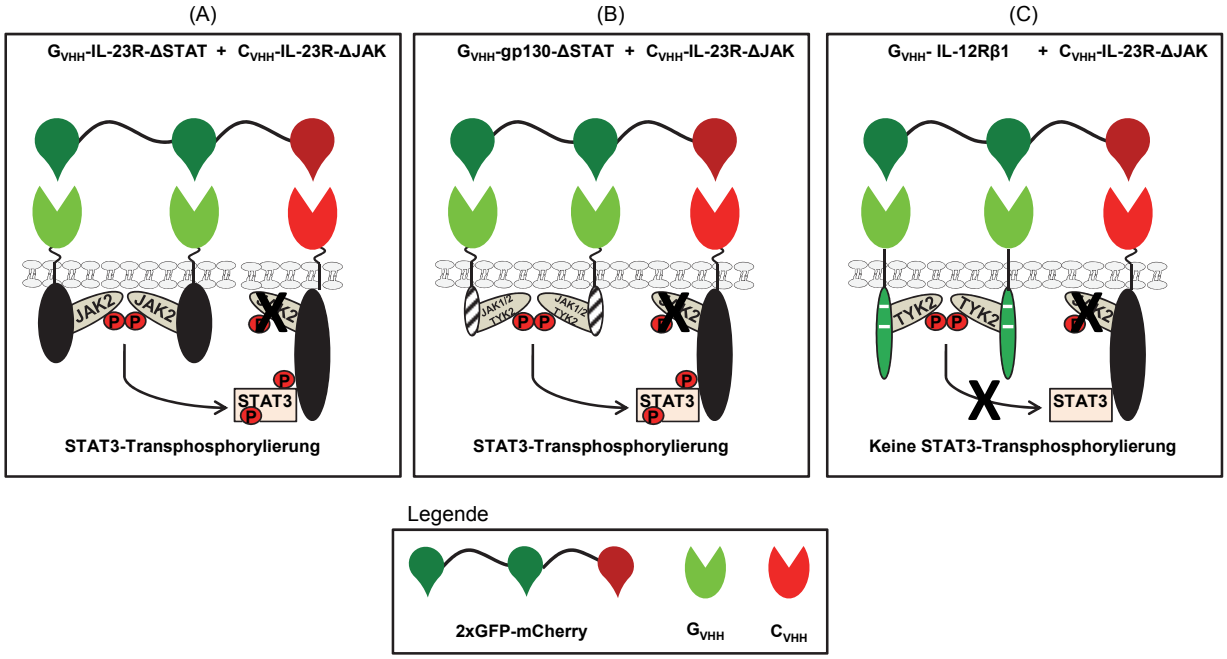


Abbildung 14: STAT3-Transphosphorylierung mittels Zytokinrezeptoren. (A) Der trimere Rezeptorkomplex aus zwei G_{VHH}-IL-23R mit intrazellulär assoziierten JAKs, aber fehlenden STAT3-Bindemotiven (G_{VHH}-IL-23R-ΔSTAT) und einem C_{VHH}-IL-23R mit dysfunktionalem intrazellulärem JAK, aber mit vorhandenen STAT3-Bindemotiven (C_{VHH}-IL-23R-ΔJAK) resultiert in einer STAT3-Transphosphorylierung. Die Rezeptortrimerisierung erfolgt mittels synthetischem 2xGFP-mCherry Liganden. (B) Die Bindung von 2xGFP-mcherry an zwei G_{VHH}-gp130 Rezeptoren mit intrazellulär assoziierten JAKs, aber fehlenden STAT3-Bindemotiven (G_{VHH}-gp130-ΔSTAT) und einem C_{VHH}-IL-23R mit dysfunktionalem intrazellulärem JAK, jedoch mit vorhandenen STAT3-Bindemotiven (C_{VHH}-IL-23R-ΔJAK), induziert eine STAT3-Transphosphorylierung. (C) Die 2xGFP-mCherry induzierte Trimerisierung des Rezeptorkomplexes aus zwei G_{VHH}-IL-12Rβ1 und einem C_{VHH}-IL-23R mit dysfunktionalem intrazellulärem JAK, aber vorhandenen STAT3-Bindemotiven (C_{VHH}-IL-23R-ΔJAK) führt zu keiner STAT3-Transphosphorylierung. Somit waren TYK2-assoziierte Rezeptoren nicht zur STAT3-Transphosphorylierung befähigt [98, 308].

Zusammenfassend wurde in Publikation 2 (s. Kapitel 4) eine SyCyR-Technologie beschrieben, die zellspezifische und hintergrundfreie Analysen zur Rezeptorsignaltransduktion ermöglicht [98, 308] und somit ein großes Potenzial zur Entwicklung neuer Therapieansätze darstellt. Unter anderem nach I/R könnten mit dem SyCyR-System Signalwege zellspezifisch an- und ausgeschaltet werden um neue Therapiemöglichkeiten zu entdecken.

7.2.5. Perspektive der SyCyR-Technologie in der Tumorimmungentherapie

Krebserkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit und stellen somit ein zentrales, gesundheitliches Problem dar. Ziel der Forschung zur Krebsbekämpfung ist die Entwicklung von Immuntherapien, die die körpereigene Leistungsfähigkeit des Immunsystems des Patienten nutzen und verbessern [377]. Die CAR T-Zell Technologie hat die Tumortherapie bereits revolutioniert. Sie wurde entwickelt, um die T-Zellen eines Patienten dahingehend zu verändern, dass sie Tumorzellen gezielt angreifen und zerstören [378]. Die Gefahr der CAR T-Zell Tumorimmungentherapie ist jedoch eine überschießende und unspezifische Immunaktivierung, die zu schweren Nebenwirkungen, wie dem *cytokine release syndrome* (CRS), führen können [379]. Ein weiterer Nachteil der CAR T-Zell Technologie ist außerdem, dass das Antigen der Tumorzelle bekannt sein muss, damit es von der CAR T-Zelle erkannt und eliminiert werden kann [380]. Mit der SyCyR-Technologie kann die (CAR)-Tumorimmungentherapie weiterentwickelt werden. Es ist ein aktivier- und deaktivierbares, hintergrundfreies System mit vollständiger Kontrolle über die Zusammensetzung des Rezeptorkomplexes, welches auf viele Zytokinrezeptorsysteme adaptierbar ist. Die SyCyR-Technologie ermöglicht eine genau regulierbare Aktivität der tumoraktiven T-Zellen im Patienten. Gleichzeitig würden die Nebenwirkungen der Tumorimmungentherapie reduziert werden, da SyCyRs aufgrund ihrer synthetischen Natur nur auf modifizierte T-Zellen und nicht auf andere Zellen wirken und nur bei Bedarf durch synthetische Liganden, die keine körpereigenen Rezeptoren oder Strukturen binden, aktiviert und deaktiviert werden. Die SyCyR-Technologie kann der CAR T-Zell Tumorimmungentherapie helfen, durch die zielgenaue Regulation der Rezeptoraktivierung, Rezeptorkinetik, Stöchiometrie und den nachgeschalteten biochemischen Eigenschaften, den Wirkungsgrad zu erhöhen. Das SyCyR-System kann nicht nur mit anderen Therapieformen, wie der CAR T-Zell Tumorimmungentherapie, kombiniert, sondern auch als eigenständige Therapie entwickelt und in Patienten angewandt werden. Hierbei würden körpereigene tumorspezifische T-Zellen mit den SyCyRs re-stimuliert werden, sodass diese wieder effektiv in der Lage wären, das Tumorgewebe zu entfernen. Eine mehrfache Gabe des Liganden könnte jedoch die Wirkung des SyCyRs, durch eine körpereigene Immunreaktion gegen den Liganden, abschwächen. Daher wäre es notwendig, die bisher entwickelte SyCyR-Technologie zu optimieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das SyCyR-System ein großes Potential für neue therapeutische Ansätze in der Tumorimmungentherapie bietet. Es zeichnet sich durch eine

schnelle Aktivierung/Deaktivierung, Spezifität, nicht vorhandene Toxizität und Nebenwirkungsfreiheit aus und ermöglicht damit eine Feinregulation und Verstärkung der Tumorabwehr.

7.3. Die synthetische Biologie ermöglicht eine detaillierte Aussage über Rezeptorzusammensetzungen

7.3.1. Die IL-35-induzierte Signaltransduktion erfolgt über unterschiedliche Rezeptorzusammensetzungen

IL-35 ist ein anti-entzündliches Zytokin, das als neuestes Mitglied der IL-12-Familie angehört. Es besteht aus den Untereinheiten p35 und EBI3 [56, 66] und wird von B- und T-Zellen sezerniert [54, 55]. IL-35 ist ein einzigartiges Zytokin, da es über unterschiedliche Rezeptorkomplexe auf seine Zielzellen wirken kann [74, 75]. Studien an Mäusen zeigen, dass IL-35 präventiv auf die Entstehung vieler Krankheiten wirkt [58, 381]. Jedoch fehlen detaillierte Analysen zu IL-35 Signalwegen und Rezeptorzusammensetzungen, über die IL-35 signalisiert. Ein Grund dafür ist vor allem, dass kein biologisch aktives, rekombinantes IL-35 erhältlich ist und somit aussagekräftige *in vitro* Analysen im typischen Zellsystem wie Ba/F3 erschwert werden [109, 382]. Bereits mehrere Arbeitsgruppen versuchten, IL-35 im bakteriellen und eukaryotischem Zellsystem zu produzieren [64, 89]. Jedoch ist es weder gelungen, biologisch aktives IL-35 aus Bakterien zu reinigen, noch eine Sekretion von HIL-35 in eukaryotischen Zellkulturüberstand zu induzieren [64]. Interessanterweise wurden andere Hyper-Zytokine der IL-6/IL-12-Familie, wie HIL-6 [382], HIL-27 [383], HIL-12 [384] und HIL-23 [98] nach Transfektion eukaryotische Zellen erfolgreich in den Zellkulturüberstand sekretiert und waren zudem biologisch aktiv [64, 98]. Es wird angenommen, dass die Untereinheit p35 im bakteriellen und eukaryotischem Zellsystem ineffektiv rückgefaltet wird, sodass ein aktiver Komplex mit EBI3 nicht gebildet werden kann. Beide Untereinheiten von IL-35 scheinen nur intrazellulär miteinander zu agieren und möglicherweise wird ein biologisch aktiver Komplex *in vivo* mit weiteren, bisher nicht identifizierten Faktoren, gebildet [64]. Bisher berichtete lediglich eine Arbeitsgruppe von einer erfolgreichen Produktion von IL-35 in Insektenzellen, der es jedoch auch nicht gelang hohe Ausbeuten zu generieren [89].

Um die *in vitro* Signaltransduktion und Rezeptorzusammensetzung von IL-35 zu studieren, wurde in Publikation 3 (s. Kapitel 5) die synthetische Biologie hinzugezogen. Von allen bisher beschriebenen Rezeptoren, die einen Komplex mit IL-35 bilden, wurden Chimären

hergestellt [68]. Es ist bereits bekannt, dass IL-35 an vier unterschiedliche β-Rezeptorkomplexe binden kann, nämlich IL-12Rβ2:gp130, IL-12Rβ2:IL-12Rβ2, gp130:gp130 und IL-12Rβ2:WSX-1 [75, 76]. Durch den Austausch der extrazellulären Rezeptordomänen durch IL-12Rβ1 und IL-12Rβ2 konnten die IL-35 Rezeptorkomplexe durch IL-12 aktiviert werden. Es wurden Analysen zur Phosphorylierung von STAT und ERK Molekülen und zellulärer Proliferation, mit den postulierten IL-35 Rezeptorzusammensetzungen, durchgeführt. Die Transduktion und Expression der chimären Rezeptoren erfolgte in Ba/F3-gp130 Zellen. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Heterodimerisierung zwischen gp130 und IL-12Rβ2 und eine Homodimerisierung zwischen den beiden gp130 Rezeptoren zu einer Phosphorylierung von STAT1, STAT3 und ERK1/2 führte. Außerdem wurde bei diesen Rezeptorzusammensetzungen eine zelluläre Proliferation und Transkription von *PIM1* beobachtet [68]. Die Transkription von *PIM1* wird durch STAT3 ausgelöst [385]. Interessanterweise decken die sich hier gezeigten Daten nicht in vollem Umfang mit der Literatur, hinsichtlich der STAT Phosphorylierungsmuster [68, 75]. Die Aktivierung von ERK wurde in Zusammenhang mit der IL-35 Signaltransduktion bisher nicht gezeigt und in Publikation 3 (s. Kapitel 5) erstmals analysiert [68]. In primären T-Zellen wurde demonstriert, dass IL-35 im Komplex mit gp130 und IL-12Rβ2 die Phosphorylierung von STAT1 und STAT4 induzierte, wohingegen mit homodimerem gp130 nur STAT1 aktiviert wurde [75]. Alle Mitglieder der IL-6- und IL-12-Familie induzieren die Phosphorylierung von STAT Proteinen nach einem gleichen Muster, nämlich STAT1, STAT3, STAT4 und zu einem geringen Anteil auch STAT5 [84, 85]. IL-35 ist bisher das einzige Zytokin, von dem bekannt ist, dass seine Rekrutierung von zwei gp130 Rezeptoren ausschließlich zur STAT1 Aktivierung führen [75]. Dagegen bewirkt die Bindung von IL-6 und IL-11 an ihre spezifischen α-Rezeptoren und die darauffolgenden Interaktionen mit gp130 Homodimeren, eine bevorzugte Phosphorylierung von STAT3 [147]. Des Weiteren konnte anhand der synthetischen Rezeptorzusammensetzung die biologische Aktivität von IL-12Rβ2 Homodimeren bestätigt werden [68]. Die IL-12Rβ2 Homodimerisierung führte in Ba/F3-gp130 Zellen zu einer STAT3 und schwachen ERK1/2 Phosphorylierung, jedoch nicht zur Aktivierung von STAT1. Angesichts dessen waren die zelluläre Proliferation und die Transkription von *PIM1* beeinträchtigt [68]. In primären T-Zellen wurde dagegen nach Bindung von IL-35 an IL-12Rβ2 Homodimer nur eine STAT4 Aktivierung induziert [75]. Da Ba/F3-Zellen kein STAT4 exprimieren, wurde dieser postulierte IL-35-induzierte Signalweg in Publikation 3 (s. Kapitel 5) nicht untersucht.

Abschließend wurde der vierte postulierte IL-35 Rezeptorkomplex aus IL-12Rβ2 und WSX-1 mittels der generierten chimären Rezeptoren untersucht [68]. Die Heterodimerisierung dieser Rezeptoren resultierte in einer Aktivierung von STAT1 und STAT3 und Transkription von *PIM1*. Außerdem konnte eine Zellproliferation, jedoch keine ERK1/2-Phophorylierung beobachtet werden [68]. Studien konnten bereits zeigen, dass ein IL-35-induzierter IL-12Rβ2:WSX-1 Rezeptorkomplex in T-Zellen zur Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT4 führt, wohingegen in B-Zellen der STAT1 und STAT3, jedoch nicht der STAT4 Signalweg ausgelöst wurde [89]. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die IL-35 Signaltransduktion je nach Zelltyp unterschiedlich verläuft. Auch die in Ba/F3 Zellen gezeigten Effekte können zelltypspezifisch sein. Vor allem kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Ba/F3-Zellen die Rezeptorsignalweiterleitung durch das Fehlen der STAT4 Expression beeinflusst wurde. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Abwesenheit bereits von einem STAT Molekül zu einer Veränderung des Zytokinsignals führen kann [386]. Hierbei wurde in murinen embryonalen Fibroblasten demonstriert, dass die fehlende STAT3 Expression in Anwesenheit von IL-6 zu einer verlängerten STAT1 Aktivierung führte und eine IFN-γ-ähnliche Antwort vermittelte [386].

Zusammenfassend konnte in Publikation 3 (s. Kapitel 5) hinsichtlich der IL-35 Rezeptorzusammensetzung gezeigt werden, dass alle in der Literatur beschriebenen Komplexe biologisch aktiv waren. Wie bei allen Mitgliedern der IL-6/IL-12-Familie konnte in Ba/F3-Zellen nach Zusammensetzung der Rezeptoren, die für IL-35 postuliert wurden, konventionelle STAT Aktivierungsmuster induziert werden [68]. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, warum in T- und B- Zellen andere Signalmuster aktiviert werden [75, 89]. Vermutlich unterliegen unterschiedliche Zellsysteme verschiedenen Mechanismen, die noch ungelöst sind.

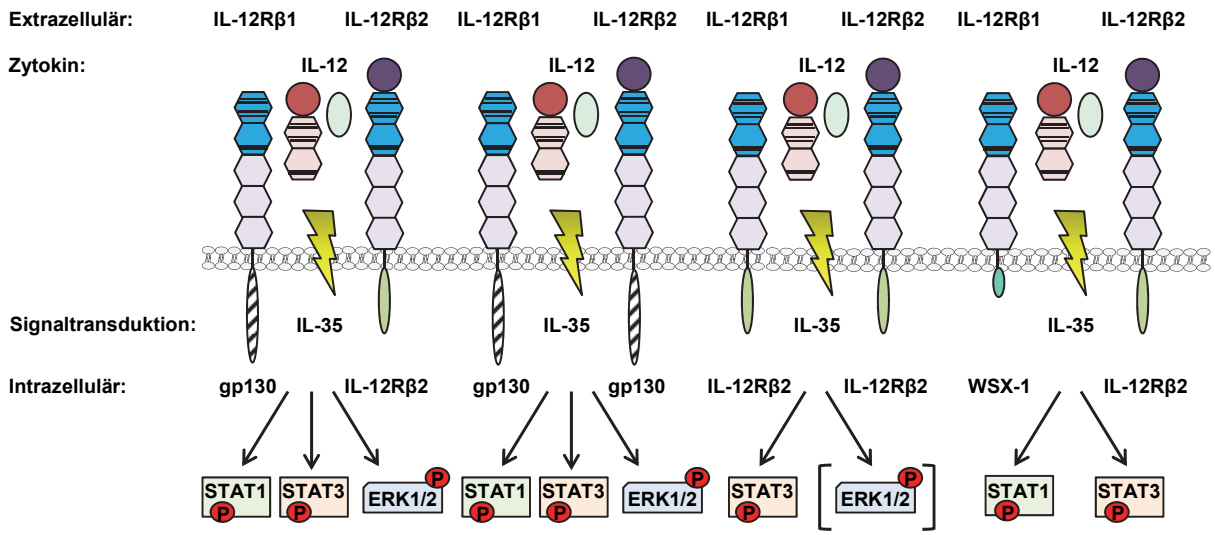


Abbildung 15: Chimäre Rezeptoren simulieren die IL-35 Signaltransduktion. Die Herstellung chimärer Zytokinrezeptoren ermöglicht eine detaillierte Untersuchung zur IL-35 Rezeptorzusammensetzung und Signaltransduktion in Ba/F3-gp130 Zellen. Alle intrazellulären Rezeptorkomplexe bestehend aus gp130:IL-12Rβ2, gp130:gp130, IL-12Rβ2:IL-12Rβ2 und WSX-1:IL-12Rβ2 sind biologisch aktiv. Die intrazelluläre Rezeptorzusammensetzung aus gp130:IL-12Rβ2 und gp130:gp130 initiiert die Phosphorylierung von STAT1/STAT3 Molekülen und von ERK1/2. Die Homodimerisierung der IL-12Rβ2 Rezeptoren resultiert in einer Aktivierung von STAT3 und schwacher Phosphorylierung von ERK1/2 (durch eckige Klammern symbolisiert). Der WSX-1:IL-12Rβ2 Komplex vermittelt ausschließlich die Aktivierung von STAT1/STAT3 Molekülen, aber nicht die von ERK1/2 [68].

7.3.2. Der Rezeptorkomplex aus IL-23R und gp130 ist biologisch aktiv und könnte über IL-39 signalisieren

Kürzlich wurde entdeckt, dass die von aktiven B-Zellen sezernierten Untereinheiten p19 und EBI3 miteinander interagieren und postuliert, dass die Signaltransduktion nach deren Bindung an die Rezeptoren gp130 und IL-23R erfolgt [59]. Dieses Zytokin erhielt den Namen IL-39 und scheint eine pro-entzündliche Rolle in diversen Autoimmunkrankheiten zu spielen [59, 387]. Dennoch wird vermutet, dass IL-39 auch entzündungshemmende Wirkungen hat [77]. Es wurde beobachtet, dass Keratinozyten die Heterodimerbildung der IL-39 Untereinheiten förderten. Dadurch wurden Entzündungsreaktionen inhibiert und Wundheilung initiiert [388].

Die Generierung von aussagekräftigen Ergebnissen zur IL-39 Signaltransdukion ist problematisch, da wie auch bei IL-35 kein biologisch aktives, rekombinantes Protein erhältlich ist. Die Interaktion zwischen p19 und EBI3 konnte lediglich in Zellkulturüberständen mittels Immunpräzipitation nachgewiesen werden [59]. Um die biologische Aktivität des postulierten IL-39 Rezeptorkomplexes zu analysieren, wurden in Publikation 3 (s. Kapitel 5) erneut chimäre Rezeptoren hergestellt, die eine synthetische IL-39 Signaltransduktion induzierten [68]. Hierbei

wurde die ICD des IL-23R und gp130 an die extrazelluläre Domäne des IL-12Rβ1 bzw. IL-12Rβ2 fusioniert, sodass eine mögliche Signaltransduktion durch IL-12 ausgelöst werden konnte. In Ba/F3-gp130 Zellen, die beide chimären Rezeptoren exprimierten, erfolgte nach Stimulation mit IL-12 eine Phosphorylierung von STAT1, STAT3 und ERK1/2. Des Weiteren wurde eine Erhöhung der Zellviabilität nach Rezeptorkomplexbildung beobachtet [68]. In der Literatur wurden ähnliche Effekte hinsichtlich der IL-39 Signaltransduktion beschrieben. Wang *et al.* 2016 demonstrierten, dass IL-39 nach Bindung an IL-23R und gp130 ebenfalls die Signalwege STAT1 und STAT3 in B-Zellen aktivierte [59]. Somit decken sich diese Resultate mit den Beobachtungen, die in Publikation 3 (s. Kapitel 5) mittels chimärer Rezeptoren erzielt wurden.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde die ICD des gp130 Rezeptors mit der extrazellulären Domäne des IL-12Rβ1 fusioniert und zusammen mit dem natürlichen IL-23R in Ba/F3-gp130 Zellen exprimiert. Nach IL-23 Stimulation zeigte sich eine zelluläre Proliferation und die Aktivierung von STAT3 und ERK1/2, jedoch nur ein schwaches STAT1 Signal [68]. Dieses Ergebnis ist auf die unterschiedliche extrazelluläre Anordnung der Rezeptoren zurückzuführen. Wie bereits bei der Epo Rezeptordimerisierung demonstriert, ist sowohl die extrazelluläre-, als auch die intrazelluläre Domäne für die Signalstärke verantwortlich [349]. Da bei der SyCyR-Technologie, hinsichtlich der Zytokinsignaltransduktion, keine veränderten Effekte im Vergleich zum natürlichen System beobachtet wurden, ist dieses System für detaillierte Analysen der Signalwege empfehlenswerter. Zusammenfassend wurde in Publikation 3 (s. Kapitel 5) gezeigt, dass der chimäre IL-23R:gp130 Komplex biologisch aktiv ist [68].

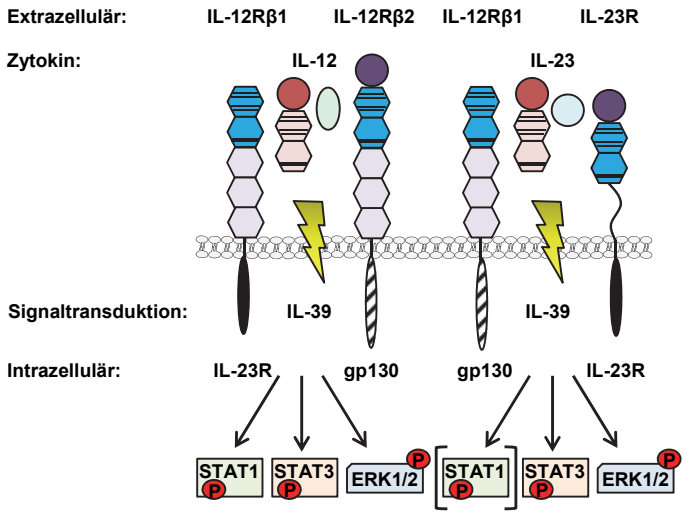


Abbildung 16: Untersuchung zur Rezeptorzusammensetzung und Signaltransduktion von IL-39. Chimäre Rezeptoren ermöglichen eine Imitierung der IL-39 Signalweiterleitung in Ba/F3-gp130 Zellen. Der intrazelluläre Rezeptorkomplex bestehend aus IL-23R:gp130 ist biologisch aktiv und induziert die Phosphorylierung von STAT1/STAT3 und ERK1/2. Die extrazelluläre-, als auch die intrazelluläre-Anordnung der Rezeptordomäne beeinflusst die Signalstärke [68]. Die eckigen Klammern symbolisieren ein schwaches Signal dieses Moleküls.

7.3.3. Entdeckung zwei zusätzlicher Rezeptorkomplexe der IL-12-Familie

Mit synthetischen Rezeptoren können nicht nur bereits bekannte Zytokinrezeptorkomplexe und deren Signaltransduktionen imitiert werden, sondern es besteht die Möglichkeit, auch neuartige Rezeptorzusammensetzungen zu analysieren. Durch die Kombination des IL-12Rβ1 mit dem Fusionsrezeptor, bestehend aus einer extrazellulären IL-12Rβ2 oder IL-23R Domäne und dem intrazellulärem Teil des gp130 Rezeptors, konnte im Rahmen der Publikation 3 (s. Kapitel 5) ein neuer, biologisch aktiver Rezeptorkomplex identifiziert werden [68]. Nach Stimulation mit IL-12 bzw. IL-23 wurde in Ba/F3-gp130 Zellen, die sowohl den IL-12Rβ1 als auch den jeweiligen chimären gp130 Rezeptor exprimierten, eine zelluläre Proliferation und Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 beobachtet. Somit konnte in beiden Fällen die biologische Aktivität des synthetischen IL-12Rβ1:gp130 Komplexes bestätigt werden [68]. Dieser Komplex könnte durch die Bindung des Zytokins IL-Y aktiviert werden. IL-Y ist aus den Untereinheiten p28 und p40 aufgebaut, dessen Existenz bisher nur auf synthetischer Ebene gezeigt werden konnte [389]. Durch Verwendung der p28/p40-kodierenden cDNA wurde an prädiabetischen Mäusen der entzündungshemmende Effekt von IL-Y demonstriert [389]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass IL-Y in der Lage ist, STAT3 über einen Signalweg zu aktivieren, an dem auch WSX-1 beteiligt ist [77, 389]. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass IL-Y über die Rezeptoren WSX-1 und IL-12Rβ1 signalisiert [77]. Da dieser Rezeptorkomplex in Publikation 3 (s Kapitel 5) nicht

untersucht wurde, kann keine Aussage über dessen Funktionalität getätigt werden. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass die Rezeptorzusammensetzung von IL-Y ebenfalls wie bei IL-35 unkonventionell ist.

Zuletzt wurde in Publikation 3 (s. Kapitel 5) auch die biologische Aktivität des IL-12Rβ2:IL-23R Komplexes mittels chimärer Rezeptoren bestätigt. Durch Heterodimerisierung beider Rezeptoren wurde neben zellulärer Proliferation auch die Phosphorylierung von STAT1/STAT3 und ERK1/2 induziert [68]. Der Rezeptorkomplex IL-12Rβ2:IL-23R scheint durch ein bisher unbekanntes Zytokin (IL-Z1) aktiviert zu werden. Die generierten Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Signalweiterleitung ebenfalls über den nicht untersuchten WSX-1:IL-23R Komplex, durch Bindung eines ungeklärten Zytokins IL-Z2, ablaufen könnte.

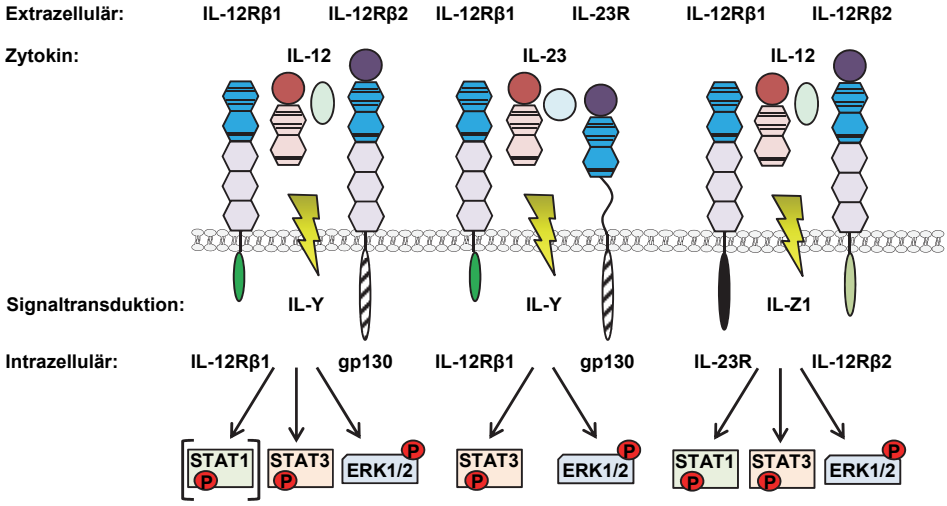


Abbildung 17: Zusätzliche biologisch aktive Rezeptorkomplexe der IL-12-Familie. Chimäre Rezeptoren ermöglichen die Analyse neuartiger Rezeptorkombinationen. Der intrazelluläre Komplex aus IL-12Rβ1:gp130 vermittelt die Aktivierung von STAT3 und ERK1/2. Je nach Zusammensetzung der extrazellulären Rezeptordomänen wird außerdem ein schwaches STAT1 Signal initiiert (symbolisiert durch eckige Klammern). Es ist naheliegend, dass der IL-12Rβ1:gp130 Komplex durch das kürzlich entdeckte Zytokin IL-Y aktiviert wird. Ebenfalls führt die Heterodimerisierung der Rezeptoren mit extrazellulären IL-23R- und IL-12Rβ2-Domänen zur Phosphorylierung von STAT1/STAT3 und ERK1/2. Ein Zytokin, welches den IL-23R:IL-12Rβ2-Komplex aktiviert, konnte bislang nicht entdeckt werden und erhält die Bezeichnung IL-Z1 [68].

Die Herstellung chimärer Rezeptoren stellt ein gutes Werkzeug zur Untersuchung der Rezeptorzusammensetzung und Signalwege von Zytokinen dar. Problematisch ist jedoch die *in vivo* Anwendbarkeit der chimären Rezeptoren, da die Liganden eine Kreuzreaktivität mit natürlichen Rezeptoren aufweisen. Um die neu entdeckten Rezeptorkomplexe *in vivo* zu studieren, würde sich die SyCyR-Technologie eignen. Damit könnte eine hintergrundfreie und zellspezifische Aktivierung der Rezeptoren erreicht werden.

8. Zusammenfassung

Die Familie der IL-6/IL-12-Zytokine steuert zelluläre Prozesse, wodurch die Aktivität des Immunsystems maßgeblich kontrolliert wird. Ihre Biologie ist bekanntlich von äußerst komplexer Natur. Eine Fehlregulation des Zytokinnetzwerks kann zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen, akuten/chronischen Entzündungen und Krebs führen. Neben IL-6 zählt auch IL-23 zu den pro-entzündlichen Zytokinen. Somit stellt es ebenfalls einen vielversprechenden therapeutischen Angriffspunkt dar, um Entzündungsreaktionen bei diversen Erkrankungen zu hemmen. Aktives IL-23 entsteht aus der Interaktion zwischen der α-Untereinheit p19 und der β-Untereinheit p40. Die IL-23 Signalweiterleitung erfolgt über die Rezeptorketten IL-12Rβ1 und IL-23R. Die Rezeptordimerisierung führt zur Transphosphorylierung der assoziierten Kinasen mit anschließender Aktivierung der JAK/STAT, MAPK und PI3K Signalwege.

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit der *in vivo* Charakterisierung der intrazellulären Signalwege des IL-23 Rezeptorkomplexes nach einer myokardialen Ischämie mit Reperfusion (I/R). Im Verlauf einer myokardialen Ischämie steuern Zytokine die Entzündungsreaktionen und beeinflussen das Remodeling des Herzens. Die Wirkung von IL-6 wurde weitestgehend auf den kardialen Umbau des ischämischen Gewebes in eine bindegewebshaltige Narbe gezeigt. Die Biologie des pro-entzündlichen Zytokins IL-23 bei kardialer Ischämie ist jedoch komplex. Vorausgehende Studien an Mäusen zeigten die essentielle Rolle von IL-23p19 im Myokardinfarkt, jedoch mit widersprüchlichen Ergebnissen. Untersuchungen zum Einfluss der einzelnen Signalwege des IL-23-Rezeptorkomplexes auf das Remodeling des Herzens fehlten. Aus diesem Anlass wurden im Rahmen der Arbeit neuartige IL-23-*signaling*-defiziente Mäuse untersucht. Mit ihrer Hilfe konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der Signalwege des IL-23 Rezeptorkomplexes keine Auswirkung auf den Heilungsprozess nach Ischämie und bis zu vier Wochen Reperfusion hatte. Darüber hinaus resultierte die therapeutische Behandlung nach I/R mit IL-23 ebenfalls in keiner signifikanten Verbesserung des myokardialen Remodelings. Das Zytokin IL-23 und seine Signalwege spielen somit keine Schlüsselrolle bei Myokardinfarkt.

Für detaillierte Analysen zur Zytokinsignaltransduktion werden Werkzeuge benötigt, mit deren Hilfe die Signalwege der Zytokine spezifisch und hintergrundfrei an- und ausgeschaltet werden können. Im zweiten Teil der Arbeit wurden *Synthetic Cytokine Receptors* (SyCyRs)

mittels einer im Rahmen dieser Dissertation entwickelten Methodik generiert. Letztere macht das Phänokopieren einer natürlichen Zytokinsignalweiterleitung möglich. Darüber hinaus ermöglichte die SyCyR-Technologie den Beweis für die Bildung biologisch aktiver IL-23R Homodimere und kann zur STAT3-Transphosphorylierung genutzt werden. Die *in vivo* Anwendbarkeit des SyCyR-Systems wurde demonstriert, indem eine zelltypspezifische und hintergrundfeie SyCyR-IL-6/IL-11 Signaltransduktion in Mäusen induziert wurde. Diese neuartige Technologie eignet sich für die Untersuchung von zelltypspezifischen Rezeptoraktivierungen in vielen Anwendungsbereichen.

Die neu entdeckten Zytokine IL-35 und IL-39, zusammengesetzt aus den Untereinheiten p35 und EBI3 bzw. p19 und EBI3, sind Mitglieder der IL-12-Familie. Über ihre Signalwege und Wirkungsweisen ist wenig bekannt. Die Rezeptorkomplexe und nachgeschalteten Signalkomponenten dieser Zytokine wurden im dritten Teil dieser Arbeit mittels synthetischer Biologie analysiert. Hierfür wurden chimäre Rezeptoren hergestellt und die biologische Aktivität der postulierten Rezeptorkomplexe, nämlich IL-12Rβ2:gp130, IL-12Rβ2:IL-12Rβ2, gp130:gp130, IL-12Rβ2:WSX-1 für IL-35 und IL-23R:gp130 für IL-39, bestätigt. Alle untersuchten Zytokinrezeptorkomplexe induzierten zudem konventionelle STAT Aktivierungsmuster. Im Laufe der Untersuchungen wurden weitere synthetische Rezeptorkombinationen entdeckt, die ebenfalls biologisch aktiv waren und noch nicht beschrieben wurden: gp130:IL-12Rβ1 und IL-23R:IL-12Rβ2. Diese Studie zeigt, dass die extrazellulären Rezeptordomänen der IL-6- und IL-12-Familie austauschbar sind und dadurch eine Analyse der Zytokinsignalwege ermöglicht wird.

9. Summary

IL-6/IL-12-like cytokines are responsible for the control of cellular processes which is of crucial importance for the immune system. Their biology is highly complex. Dysregulation of the cytokine network is proven to influence the development of autoimmune diseases, acute/chronic inflammation and cancer. In addition to IL-6, IL-23 also belongs to pro-inflammatory cytokines and represents a therapeutic target for inhibiting inflammatory response in various diseases. Active IL-23 is formed by the interaction between the α-subunit p19 and the β-subunit p40. The receptor chains IL-12Rβ1 and IL-23R are responsible for the IL-23 signal transduction. Receptor dimerization leads to trans-phosphorylation of the associated kinases and subsequent activation of JAK/STAT, MAPK and PI3K signaling pathways.

The first part of this thesis deals with the *in vivo* characterization of the IL-23 receptor intracellular signaling pathways after myocardial ischemia and reperfusion (I/R). During myocardial ischemia, cytokines control inflammatory responses and affect cardiac remodeling. The effect of IL-6 on myocardial infarction has been clearly demonstrated. However, the exact function of the pro-inflammatory cytokine IL-23 is still under discussion. Previous studies in mice reported the essential role of IL-23p19 in myocardial infarction, but the results were contradictory. Investigations on the influence of individual signaling pathways of the IL-23 receptor complex on remodeling of ischemic heart are unavailable. Using novel IL-23-signaling-deficient mice, it was shown that lack of IL-23R-signaling pathways had no effect on the healing process after ischemia and up to four weeks of reperfusion. In addition, therapeutic treatment with IL-23 also did not result in any significant improvement of cardiac function after I/R. Thus, the cytokine IL-23 and its signaling pathways did not play a key role in the development of I/R-injury.

For detailed analysis of the cytokine signal transduction pathways, the development of switchable tools allowing their specific and background-free activation is of invaluable importance. In the second part of the thesis, Synthetic Cytokine Receptors (SyCyRs) were generated using a technology developed in the course of this work and allowing to phenotype natural cytokine signal transduction. In this way, an evidence for the formation of biologically active IL-23R homodimers was provided and STAT3 trans-phosphorylation enabled. The *in vivo* applicability of the SyCyR system has been successfully demonstrated by inducing cell-type specific and background-free SyCyR-IL-6/IL-11 signal transduction in mice. In a nutshell, this

novel technology makes possible to study cell-type specific receptor activation in a widespread area.

The newly discovered cytokines IL-35 and IL-39, composed of p35 and EBI3 respectively p19 and EBI3 subunits, are members of the IL-12 cytokines family. Little is known about their signaling pathways and effects. In the third part of the presented work, synthetic biology enabled the analysis of receptor complexes and downstream signaling components of these cytokines. For this purpose, chimeric receptors were generated and the biological activity of the postulated receptor complexes, namely IL-12Rβ2:gp130, IL-12Rβ2:IL-12Rβ2, gp130:gp130, IL-12Rβ2:WSX-1 for IL-35 and IL-23R:gp130 for IL-39, was confirmed. Every investigated cytokine receptor complex induced conventional STAT activation patterns. Furthermore, so far undiscovered synthetic receptor combinations were accessed and their biological activity proven: gp130:IL-12Rβ1 and IL-23R:IL-12Rβ2. This study demonstrates that extracellular receptor domains of IL-6 and IL-12 cytokines family are interchangeable, allowing analysis of cytokine signaling pathways.

10. Literatur

[1]Wong, ND, Moran, AE, The U.S. prevention of cardiovascular disease guidelines and implications for implementation in LMIC, 2014, *Global Heart*, 9, 445-455.

[2]Statistisches Bundesamt Wiesbaden, Gestorbene nach ausgewählten Todesursachen, 2015, https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/EckdatenTU.html (accessed 31. Juli 2018).

[3]Statistisches Bundesamt Wiesbaden, Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen, 2015, https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HerzKreislaufErkrankungen.html (accessed 31. Juli 2018).

[4]Dawber, TR, Meadors, GF, Moore, FE, Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham study, 1951, *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 41, 279-286.

[5]Chapman, JM, Goerke, LS, Dixon, W, Loveland, DB, Phillips, E, Measuring the risk of coronary heart disease in adult population groups. The clinical status of a population group in Los Angeles under observation for two to three years, 1957, *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 47, 33-42.

[6]Keys, A, Taylor, HL, Blackburn, H, Brozek, J, Anderson, JT, Simonson, E, Coronary hearth disease among minnesota business and professional men followed fifteen years, 1963, *Circulation*, 28, 381-395.

[7]Matheus, ASdM, Tannus, LRM, Cobas, RA, Palma, CCS, Negrato, CA, Gomes, MdB, Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update, 2013, *International Journal of Hypertension*, 2013, 15.

[8]Yusuf, S, Hawken, S, Ounpuu, S, Dans, T, Avezum, A, Lanas, F, McQueen, M, Budaj, A, Pais, P, Varigos, J, Lisheng, L, Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the interheart study): case-control study, 2004, *Lancet*, 364, 937-952.

[9]Frostegård, J, Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease, 2013, *BMC Medicine*, 11, 117-117.

[10]Go, AS, Chertow, GM, Fan, D, McCulloch, CE, Hsu, CY, Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization, 2004, *New England Journal of Medicine*, 351, 1296-1305.

[11]Prasad, DS, Kabir, Z, Dash, AK, Das, BC, Cardiovascular risk factors in developing countries: a review of clinico-epidemiological evidence, 2010, *CVD Prevention and Control*, 5, 115-123.

[12]Dixon, DL, Trankle, C, Buckley, L, Parod, E, Carbone, S, Van Tassell, BW, Abbate, A, A review of PCSK9 inhibition and its effects beyond LDL receptors, 2016, *Journal of Clinical Lipidology*, 10, 1073-1080.

[13]Stein, EA, Honarpour, N, Wasserman, SM, Xu, F, Scott, R, Raal, FJ, Effect of the proprotein convertase subtilisin/kexin 9 monoclonal antibody, AMG 145, in homozygous familial hypercholesterolemia, 2013, *Circulation*, 128, 2113-2120.

[14]Zhang, X-L, Zhu, Q-Q, Zhu, L, Chen, J-Z, Chen, Q-H, Li, G-N, Xie, J, Kang, L-N, Xu, B, Safety and efficacy of anti-PCSK9 antibodies: a meta-analysis of 25 randomized, controlled trials, 2015, *BMC Medicine*, 13, 123.

[15]Dinarello, CA, Simon, A, Van der Meer, JW, Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases, 2012, *Nature Reviews Drug Discovery*, 11, 633-652.

[16]Buckley, LF, Abbate, A, Interleukin-1 blockade in cardiovascular diseases: from bench to bedside, 2018, *BioDrugs*, 32, 111-118.
[17]Thygesen, K, Alpert, JS, Jaffe, AS, Simoons, ML, Chaitman, BR, White, HD, Katus, HA, Lindahl, B, Morrow, DA, Clemmensen, PM, Johanson, P, Hod, H, Underwood, R, Bax, JJ, Bonow, RO, Pinto, F, Gibbons, RJ, Fox, KA, Atar, D, Newby, LK, Galvani, M, Hamm, CW, Uretsky, BF, Steg, PG, Wijns, W, Bassand, JP, Menasche, P, Ravkilde, J, Ohman, EM, Antman, EM, Wallentin, LC, Armstrong, PW, Simoons, ML, Januzzi, JL, Nieminen, MS, Gheorghiade, M, Filippatos, G, Luepker, RV, Fortmann, SP, Rosamond, WD, Levy, D, Wood, D, Smith, SC, Hu, D, Lopez-Sendon, JL, Robertson, RM, Weaver, D, Tendera, M, Bove, AA, Parkhomenko, AN, Vasilieva, EJ, Mendis, S, Third universal definition of myocardial infarction, 2012, *Circulation*, 126, 2020-2035.
[18]Moran, AE, Oliver, JT, Mirzaie, M, Forouzanfar, MH, Chilov, M, Anderson, L, Morrison, JL, Khan, A, Zhang, N, Haynes, N, Tran, J, Murphy, A, DeGennaro, V, Roth, G, Zhao, D, Peer, N, Pichon-Riviere, A, Rubinstein, A, Pogosova, N, Prabhakaran, D, Naghavi, M, Ezzati, M, Mensah, GA, Assessing the global burden of ischemic heart disease: part 1: methods for a systematic review of the global epidemiology of ischemic heart disease in 1990 and 2010, 2012, *Global Heart*, 7, 315-329.
[19]Jennings, RB, Ganote, CE, Structural changes in myocardium during acute ischemia, 1974, *Circulation Research*, 35 Suppl 3, 156-172.
[20]Ibanez, B, Heusch, G, Ovize, M, Van de Werf, F, Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury, 2015, *Journal of the American College of Cardiology*, 65, 1454-1471.
[21]Holland, RP, Brooks, H, The QRS complex during myocardial ischemia. An experimental analysis in the porcine heart, 1976, *Journal of Clinical Investigation*, 57, 541-550.
[22]Jaffe, AS, Babuin, L, Apple, FS, Biomarkers in acute cardiac disease: the present and the future, 2006, *Journal of the American College of Cardiology*, 48, 1-11.
[23]Korosoglou, G, Labadze, N, Hansen, A, Selter, C, Giannitsis, E, Katus, H, Kuecherer, H, Usefulness of real-time myocardial perfusion imaging in the evaluation of patients with first time chest pain, 2004, *American Journal of Cardiology*, 94, 1225-1231.
[24]Lima, JA, Myocardial viability assessment by contrast-enhanced magnetic resonance imaging, 2003, *Journal of the American College of Cardiology*, 42, 902-904.
[25]Arai, AE, The cardiac magnetic resonance (CMR) approach to assessing myocardial viability, 2011, *Journal of Nuclear Cardiology*, 18, 1095-1102.
[26]Flögel, U, Ding, Z, Hardung, H, Jander, S, Reichmann, G, Jacoby, C, Schubert, R, Schrader, J, In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging, 2008, *Circulation*, 118, 140-148.
[27]Flögel, U, Laussmann, T, Gödecke, A, Abanador, N, Schäfers, M, Fingas, C, Metzger, S, Levkau, B, Jacoby, C, Schrader, J, Lack of myoglobin causes a switch in cardiac substrate selection, 2005, *Circulation Research*, 96, e68-75.
[28]Okuyan, H, Hzal, F, Tacoy, G, Timurkaynak, T, Angiographic evaluation of the radial artery diameter in patients who underwent coronary angiography or coronary intervention, 2013, *Journal of Invasive Cardiology*, 25, 353-357.
[29]Louvard, Y, Lefèvre, T, Morice, MC, Percutaneous coronary intervention for bifurcation coronary disease, 2004, *Heart*, 90, 713-722.
[30]Grüntzig, A, Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis, 1978, *Lancet*, 311, 263.
[31]Yellon, DM, Hausenloy, DJ, Myocardial reperfusion injury, 2007, *New England Journal of Medicine*, 357, 1121-1135.

[32]Braunwald, E, Kloner, RA, Myocardial reperfusion: a double-edged sword?, 1985, *Journal of Clinical Investigation*, 76, 1713-1719.
[33]Jennings, RB, Sommers, HM, Smyth, GA, Flack, HA, Linn, H, Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog, 1960, *Archives of Pathology*, 70, 68-78.
[34]Hearse, DJ, Humphrey, SM, Chain, EB, Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release, 1973, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 5, 395-407.
[35]Zweier, JL, Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury, 1988, *Journal of Biological Chemistry*, 263, 1353-1357.
[36]Piper, HM, Garcia-Dorado, D, Ovize, M, A fresh look at reperfusion injury, 1998, *Cardiovascular Research*, 38, 291-300.
[37]Lemasters, JJ, Bond, JM, Chacon, E, Harper, IS, Kaplan, SH, Ohata, H, Trollinger, DR, Herman, B, Cascio, WE, The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes, 1996, *Experientia Supplementum*, 76, 99-114.
[38]Vinten-Johansen, J, Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury, 2004, *Cardiovascular Research*, 61, 481-497.
[39]Filippatos, G, Parissis, JT, Adamopoulos, S, Kardaras, F, Chemokines in cardiovascular remodeling: clinical and therapeutic implications, 2003, *Current Molecular Medicine*, 3, 139-147.
[40]Heinrich, PC, Behrmann, I, Müller-Newen, G, Schaper, F, Graeve, L, Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/JAK/STAT pathway, 1998, *Biochemical Journal*, 334, 297-314.
[41]Belladonna, ML, Renauld, JC, Bianchi, R, Vacca, C, Fallarino, F, Orabona, C, Fioretti, MC, Grohmann, U, Puccetti, P, IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells, 2002, *Journal of Immunology*, 168, 5448-5454.
[42]Tisoncik, JR, Korth, MJ, Simmons, CP, Farrar, J, Martin, TR, Katze, MG, Into the eye of the cytokine storm, 2012, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76, 16-32.
[43]Niclas, HR, Guidebook to Cytokines and their Receptors, 1995, Oxford University Press, Oxford.
[44]Collison, LW, Vignali, DAA, Interleukin-35: odd one out or part of the family?, 2008, *Immunological Reviews*, 226, 248-262.
[45]Vignali, DAA, Kuchroo, VK, IL-12 family cytokines: immunological playmakers, 2012, *Nature Immunology*, 13, 722-728.
[46]Mus, AM, Cornelissen, F, Asmawidjaja, PS, van Hamburg, JP, Boon, L, Hendriks, RW, Lubberts, E, Interleukin-23 promotes Th17 differentiation by inhibiting T-bet and FoxP3 and is required for elevation of interleukin-22, but not interleukin-21, in autoimmune experimental arthritis, 2010, *Arthritis & Rheumatism*, 62, 1043-1050.
[47]O'Shea, JJ, Paul, WE, Regulation of T(H)1 differentiation - controlling the controllers, 2002, *Nature Immunology*, 3, 506-508.
[48]Cox, JH, Kljavin, NM, Ramamoorthi, N, Diehl, L, Batten, M, Ghilardi, N, IL-27 promotes T cell-dependent colitis through multiple mechanisms, 2011, *Journal of Experimental Medicine*, 208, 115-123.
[49]Guzzo, C, Ayer, A, Basta, S, Banfield, BW, Gee, K, IL-27 enhances LPS-induced proinflammatory cytokine production via upregulation of TLR4 expression and signaling in human monocytes, 2012, *Journal of Immunology*, 188, 864-873.

[50]Bosmann, M, Ward, PA, Modulation of inflammation by interleukin-27, 2013, *Journal of Leukocyte Biology*, 94, 1159-1165.
[51]Fitzgerald, DC, Fonseca-Kelly, Z, Cullimore, ML, Safabakhsh, P, Saris, CJM, Zhang, G-X, Rostami, A, Independent and inter-dependent immunoregulatory effects of IL-27, IFN-β and IL-10 in the suppression of human Th17 cells and murine EAE, 2013, *Journal of Immunology*, 190, 3225-3234.
[52]Laroni, A, Gandhi, R, Beynon, V, Weiner, HL, IL-27 imparts immunoregulatory function to human NK cell subsets, 2011, *Plos One*, 6, e26173.
[53]Lucas, S, Ghilardi, N, Li, J, de Sauvage, FJ, IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naïve $CD4^+$ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms, 2003, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 15047-15052.
[54]Chaturvedi, V, Collison, LW, Guy, CS, Workman, CJ, Vignali, DAA, Human regulatory T cells require interleukin-35 to mediate suppression and infectious tolerance, 2011, *Journal of Immunology*, 186, 6661-6666.
[55]Collison, LW, Chaturvedi, V, Henderson, AL, Giacomin, PR, Guy, C, Bankoti, J, Finkelstein, D, Forbes, K, Workman, CJ, Brown, SA, Rehg, JE, Jones, ML, Ni, H-T, Artis, D, Turk, MJ, Vignali, DAA, IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population, 2010, *Nature Immunology*, 11, 1093.
[56]Collison, LW, Workman, CJ, Kuo, TT, Boyd, K, Wang, Y, Vignali, KM, Cross, R, Sehy, D, Blumberg, RS, Vignali, DA, The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function, 2007, *Nature*, 450, 566-569.
[57]Bettini, M, Castellaw, AH, Lennon, GP, Burton, AR, Vignali, DA, Prevention of autoimmune diabetes by ectopic pancreatic beta-cell expression of interleukin-35, 2012, *Diabetes*, 61, 1519-1526.
[58]Niedbala, W, Wei, XQ, Cai, B, Hueber, AJ, Leung, BP, McInnes, IB, Liew, FY, IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells, 2007, *European Journal of Immunology*, 37, 3021-3029.
[59]Wang, X, Wei, Y, Xiao, H, Liu, X, Zhang, Y, Han, G, Chen, G, Hou, C, Ma, N, Shen, B, Li, Y, Egwuagu, CE, Wang, R, A novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in Lupus-like mice, 2016, *European Journal of Immunology*, 46, 1343-1350.
[60]Trinchieri, G, Pflanz, S, Kastelein, RA, The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses, 2003, *Immunity*, 19, 641-644.
[61]Trinchieri, G, Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity, 2003, *Nature Reviews Immunology*, 3, 133.
[62]Wolf, SF, Temple, PA, Kobayashi, M, Young, D, Dicig, M, Lowe, L, Dzialo, R, Fitz, L, Ferenz, C, Hewick, RM, Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells, 1991, *Journal of Immunology*, 146, 3074-3081.
[63]Oppmann, B, Lesley, R, Blom, B, Timans, JC, Xu, Y, Hunte, B, Vega, F, Yu, N, Wang, J, Singh, K, Zonin, F, Vaisberg, E, Churakova, T, Liu, M-r, Gorman, D, Wagner, J, Zurawski, S, Liu, Y-J, Abrams, JS, Moore, KW, Rennick, D, de Waal-Malefyt, R, Hannum, C, Bazan, JF, Kastelein, RA, Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12, 2000, *Immunity*, 13, 715-725.
[64]Aparicio-Siegmund, S, Moll, JM, Lokau, J, Grusdat, M, Schröder, J, Plöhn, S, Rose-John, S, Grötzinger, J, Lang, PA, Scheller, J, Garbers, C, Recombinant p35 from bacteria can form interleukin (IL-)12, but not IL-35, 2014, *Plos One*, 9, e107990.

[65]Pflanz, S, Timans, JC, Cheung, J, Rosales, R, Kanzler, H, Gilbert, J, Hibbert, L, Churakova, T, Travis, M, Vaisberg, E, Blumenschein, WM, Mattson, JD, Wagner, JL, To, W, Zurawski, S, McClanahan, TK, Gorman, DM, Bazan, JF, de Waal Malefyt, R, Rennick, D, Kastelein, RA, IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells, 2002, *Immunity*, 16, 779-790.

[66]Devergne, O, Birkenbach, M, Kieff, E, Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin, 1997, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 12041-12046.

[67]Jones, LL, Chaturvedi, V, Uyttenhove, C, Van Snick, J, Vignali, DA, Distinct subunit pairing criteria within the heterodimeric IL-12 cytokine family, 2012, *Molecular Immunology*, 51, 234-244.

[68]Floss, DM, Schönberg, M, Franke, M, Horstmeier, FC, Engelowski, E, Schneider, A, Rosenfeldt, EM, Scheller, J, IL-6/IL-12 cytokine receptor shuffling of extra- and intracellular domains reveals canonical STAT activation via synthetic IL-35 and IL-39 signaling, 2017, *Scientific Reports*, 7, 15172.

[69]Jones, LL, Vignali, DAA, Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily, 2011, *Immunologic research*, 51, 5-14.

[70]Presky, DH, Yang, H, Minetti, LJ, Chua, AO, Nabavi, N, Wu, CY, Gately, MK, Gubler, U, A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits, 1996, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 14002-14007.

[71]Chua, AO, Chizzonite, R, Desai, BB, Truitt, TP, Nunes, P, Minetti, LJ, Warrier, RR, Presky, DH, Levine, JF, Gately, MK, Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130, 1994, *Journal of Immunology*, 153, 128.

[72]Parham, C, Chirica, M, Timans, J, Vaisberg, E, Travis, M, Cheung, J, Pflanz, S, Zhang, R, Singh, KP, Vega, F, To, W, Wagner, J, O'Farrell, A-M, McClanahan, T, Zurawski, S, Hannum, C, Gorman, D, Rennick, DM, Kastelein, RA, de Waal Malefyt, R, Moore, KW, A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rβ1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R, 2002, *Journal of Immunology*, 168, 5699.

[73]Pflanz, S, Hibbert, L, Mattson, J, Rosales, R, Vaisberg, E, Bazan, JF, Phillips, JH, McClanahan, TK, de Waal Malefyt, R, Kastelein, RA, WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27, 2004, *Journal of Immunology*, 172, 2225.

[74]Garbers, C, Hermanns, HM, Schaper, F, Müller-Newen, G, Grötzinger, J, Rose-John, S, Scheller, J, Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines, 2012, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 23, 85-97.

[75]Collison, LW, Delgoffe, GM, Guy, CS, Vignali, KM, Chaturvedi, V, Fairweather, D, Satoskar, AR, Garcia, KC, Hunter, CA, Drake, CG, Murray, PJ, Vignali, DA, The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional, 2012, *Nature Immunology*, 13, 290-299.

[76]Li, X, Mai, J, Virtue, A, Yin, Y, Gong, R, Sha, X, Gutchigian, S, Frisch, A, Hodge, I, Jiang, X, Wang, H, Yang, X-F, IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine — A new system of categorizing anti-inflammatory cytokines, 2012, *Plos One*, 7, e33628.

[77]Hasegawa, H, Mizoguchi, I, Chiba, Y, Ohashi, M, Xu, M, Yoshimoto, T, Expanding diversity in molecular structures and functions of the IL-6/IL-12 heterodimeric cytokine family, 2016, *Frontiers in Immunology*, 7, 479.

[78]Taga, T, Kishimoto, T, Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines, 1997, *Annual Review of Immunology*, 15, 797-819.
[79]Hunter, CA, New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions, 2005, *Nature Reviews Immunology*, 5, 521-531.
[80]Levy, DE, Darnell, JE, Jr., Stats: transcriptional control and biological impact, 2002, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, 651-662.
[81]Bacon, CM, McVicar, DW, Ortaldo, JR, Rees, RC, O'Shea, JJ, Johnston, JA, Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL- 12, 1995, *Journal of Experimental Medicine*, 181, 399-404.
[82]Thierfelder, WE, van Deursen, JM, Yamamoto, K, Tripp, RA, Sarawar, SR, Carson, RT, Sangster, MY, Vignali, DA, Doherty, PC, Grosveld, GC, Ihle, JN, Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells, 1996, *Nature*, 382, 171-174.
[83]Kaplan, MH, Sun, YL, Hoey, T, Grusby, MJ, Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice, 1996, *Nature*, 382, 174-177.
[84]Jacobson, NG, Szabo, SJ, Weber-Nordt, RM, Zhong, Z, Schreiber, RD, Darnell, JE, Jr., Murphy, KM, Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4, 1995, *Journal of Experimental Medicine*, 181, 1755-1762.
[85]Gollob, JA, Murphy, EA, Mahajan, S, Schnipper, CP, Ritz, J, Frank, DA, Altered interleukin-12 responsiveness in Th1 and Th2 cells is associated with the differential activation of STAT5 and STAT1, 1998, *Blood*, 91, 1341-1354.
[86]Floss, DM, Klöcker, T, Schröder, J, Lamertz, L, Mrotzek, S, Strobl, B, Hermanns, H, Scheller, J, Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor β1 and interleukin 23 receptor to Janus kinases, 2016, *Molecular Biology of the Cell*, 27, 2301-2316.
[87]Kamiya, S, Owaki, T, Morishima, N, Fukai, F, Mizuguchi, J, Yoshimoto, T, An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4+ T cells, 2004, *Journal of Immunology*, 173, 3871.
[88]Sun, L, He, C, Nair, L, Yeung, J, Egwuagu, CE, Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease, 2015, *Cytokine*, 75, 249-255.
[89]Wang, R-X, Yu, C-R, Dambuza, IM, Mahdi, RM, Dolinska, M, Sergeey, YV, Wingfield, PT, Kim, S-H, Egwuagu, CE, Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress CNS autoimmune disease, 2014, *Nature Medicine*, 20, 633-641.
[90]Langrish, CL, Chen, Y, Blumenschein, WM, Mattson, J, Basham, B, Sedgwick, JD, McClanahan, T, Kastelein, RA, Cua, DJ, IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation, 2005, *Journal of Experimental Medicine*, 201, 233-240.
[91]Roses, RE, Xu, S, Xu, M, Koldovsky, U, Koski, G, Czerniecki, BJ, Differential production of IL-23 and IL-12 by myeloid-derived dendritic cells in response to TLR agonists, 2008, *Journal of Immunology*, 181, 5120.
[92]Abraham, C, Cho, JH, IL-23 and autoimmunity: new insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease, 2009, *Annual Review of Medicine*, 60, 97-110.
[93]Schröder, J, Moll, JM, Baran, P, Grötzinger, J, Scheller, J, Floss, DM, Non-canonical interleukin 23 receptor complex assembly: p40 protein recruits interleukin 12 receptor β1 via site II and induces p19/interleukin 23 receptor interaction via site III, 2015, *Journal of Biological Chemistry*, 290, 359-370.
[94]Chua, AO, Wilkinson, VL, Presky, DH, Gubler, U, Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component, 1995, *Journal of Immunology*, 155, 4286-4294.

[95]Murakami, M, Narazaki, M, Hibi, M, Yawata, H, Yasukawa, K, Hamaguchi, M, Taga, T, Kishimoto, T, Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family, 1991, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 11349-11353.
[96]Ihle, JN, Kerr, IM, Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily, 1995, *Trends in Genetics*, 11, 69-74.
[97]Hummel, TM, Ackfeld, T, Schonberg, M, Ciupka, G, Schulz, F, Oberdoerster, A, Grotzinger, J, Scheller, J, Floss, DM, Synthetic deletion of the interleukin 23 receptor (IL-23R) stalk region led to autonomous IL-23R homodimerization and activation, 2017, *Molecular and Cellular Biology*, 37.
[98]Engelowski, E, Schneider, A, Franke, M, Xu, H, Clemen, R, Lang, A, Baran, P, Binsch, C, Knebel, B, Al-Hasani, H, Moll, JM, Floß, DM, Lang, PA, Scheller, J, Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands, 2018, *Nature Communications*, 9, 2034.
[99]Floss, DM, Schroder, J, Franke, M, Scheller, J, Insights into IL-23 biology: from structure to function, 2015, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 26, 569-578.
[100]Feng, J, Witthuhn, BA, Matsuda, T, Kohlhuber, F, Kerr, IM, Ihle, JN, Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop, 1997, *Molecular and Cellular Biology*, 17, 2497-2501.
[101]Gauzzi, MC, Velazquez, L, McKendry, R, Mogensen, KE, Fellous, M, Pellegrini, S, Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase, 1996, *Journal of Biological Chemistry*, 271, 20494-20500.
[102]Pellegrini, S, Dusanter-Fourt, I, The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs), 1997, *European Journal of Biochemistry*, 248, 615-633.
[103]Watford, WT, Hissong, BD, Bream, JH, Kanno, Y, Muul, L, O'Shea, JJ, Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4, 2004, *Immunological Reviews*, 202, 139-156.
[104]Darnell, JE, Jr., Kerr, IM, Stark, GR, JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins, 1994, *Science*, 264, 1415-1421.
[105]Ortmann, RA, Cheng, T, Visconti, R, Frucht, DM, O'Shea, JJ, Janus kinases and signal transducers and activators of transcription: their roles in cytokine signaling, development and immunoregulation, 2000, *Arthritis Research*, 2, 16-32.
[106]Aggarwal, S, Ghilardi, N, Xie, MH, de Sauvage, FJ, Gurney, AL, Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17, 2003, *Journal of Biological Chemistry*, 278, 1910-1914.
[107]Frazer, LC, Scurlock, AM, Zurenski, MA, Riley, MM, Mintus, M, Pociask, DA, Sullivan, JE, Andrews, CW, Darville, T, IL-23 induces IL-22 and IL-17 production in response to Chlamydia muridarum genital tract infection, but the absence of these cytokines does not influence disease pathogenesis, 2013, *American Journal of Reproductive Immunology*, 70, 10.1111/aji.12171.
[108]Halwani, R, Sultana, A, Vazquez-Tello, A, Jamhawi, A, Al-Masri, AA, Al-Muhsen, S, Th-17 regulatory cytokines IL-21, IL-23, and IL-6 enhance neutrophil production of IL-17 cytokines during asthma, 2017, *Journal of Asthma*, 54, 893-904.
[109]Floss, DM, Mrotzek, S, Klöcker, T, Schröder, J, Grötzinger, J, Rose-John, S, Scheller, J, Identification of canonical tyrosine-dependent and non-canonical tyrosine-independent

STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor, 2013, *Journal of Biological Chemistry*, 288, 19386-19400.
[110]Croker, BA, Krebs, DL, Zhang, JG, Wormald, S, Willson, TA, Stanley, EG, Robb, L, Greenhalgh, CJ, Forster, I, Clausen, BE, Nicola, NA, Metcalf, D, Hilton, DJ, Roberts, AW, Alexander, WS, SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo, 2003, *Nature Immunology*, 4, 540-545.
[111]Cho, M-L, Kang, J-W, Moon, Y-M, Nam, H-J, Jhun, J-Y, Heo, S-B, Jin, H-T, Min, S-Y, Ju, J-H, Park, K-S, Cho, Y-G, Yoon, C-H, Park, S-H, Sung, Y-C, Kim, H-Y, STAT3 and NF-κB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice, 2006, *Journal of Immunology*, 176, 5652.
[112]Cantley, LC, The phosphoinositide 3-kinase pathway, 2002, *Science*, 296, 1655-1657.
[113]Lieberman, LA, Cardillo, F, Owyang, AM, Rennick, DM, Cua, DJ, Kastelein, RA, Hunter, CA, IL-23 provides a limited mechanism of resistance to acute toxoplasmosis in the absence of IL-12, 2004, *Journal of Immunology*, 173, 1887-1893.
[114]Quan, J-H, Chu, J-Q, Kwon, J, Choi, I-W, Ismail, HAHA, Zhou, W, Cha, G-H, Zhou, Y, Yuk, J-M, Jo, E-K, Lee, Y-H, Intracellular networks of the PI3K/AKT and MAPK pathways for regulating toxoplasma gondii-induced IL-23 and IL-12 production in human THP-1 cells, 2015, *Plos One*, 10, e0141550.
[115]Yi, P, Liang, Y, Yuan, D, Jie, Z, Kwota, Z, Cong, Y, Sun, J, PI3K/mTOR-dependent IL-22 production modulates polyfunctional T cell responses in viral hepatitis, 2016, *Journal of Immunology*, 196, 196.112.
[116]Hacker, H, Karin, M, Regulation and function of IKK and IKK-related kinases, 2006, *Science Signaling*, 2006, re13.
[117]Grohmann, U, Belladonna, ML, Bianchi, R, Orabona, C, Ayroldi, E, Fioretti, MC, Puccetti, P, IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production, 1998, *Immunity*, 9, 315-323.
[118]Xia, L, Tian, D, Huang, W, Zhu, H, Wang, J, Zhang, Y, Hu, H, Nie, Y, Fan, D, Wu, K, Upregulation of IL-23 expression in patients with chronic hepatitis B is mediated by the HBx/ERK/NF-κB pathway, 2012, *Journal of Immunology*, 188, 753.
[119]Mise-Omata, S, Kuroda, E, Niikura, J, Yamashita, U, Obata, Y, Doi, TS, A proximal kappaB site in the IL-23 p19 promoter is responsible for RelA- and c-Rel-dependent transcription, 2007, *Journal of Immunology*, 179, 6596-6603.
[120]Carmody, RJ, Ruan, Q, Liou, H-C, Chen, YH, Essential roles of c-Rel in TLR-induced IL-23 p19 gene expression in dendritic cells, 2007, *Journal of Immunology*, 178, 186.
[121]Becker, C, Wirtz, S, Ma, X, Blessing, M, Galle, PR, Neurath, MF, Regulation of IL-12 p40 promoter activity in primary human monocytes: roles of NF-kappaB, CCAAT/enhancer-binding protein beta, and PU.1 and identification of a novel repressor element (GA-12) that responds to IL-4 and prostaglandin E(2), 2001, *Journal of Immunology*, 167, 2608-2618.
[122]Bogoyevitch, MA, Court, NW, Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8, 2004, *Cellular Signaling*, 16, 1345-1354.
[123]Balmanno, K, Cook, SJ, Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells, 1999, *Oncogene*, 18, 3085-3097.
[124]Chen, Z, Gibson, TB, Robinson, F, Silvestro, L, Pearson, G, Xu, B, Wright, A, Vanderbilt, C, Cobb, MH, MAP kinases, 2001, *Chemical Reviews*, 101, 2449-2476.

[125]Platanias, LC, Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies, 2003, *Blood*, 101, 4667-4679.
[126]di Mari, JF, Davis, R, Safirstein, RL, MAPK activation determines renal epithelial cell survival during oxidative injury, 1999, *American Journal of Physiology*, 277, F195-203.
[127]Iverson, C, Larson, G, Lai, C, Yeh, LT, Dadson, C, Weingarten, P, Appleby, T, Vo, T, Maderna, A, Vernier, JM, Hamatake, R, Miner, JN, Quart, B, RDEA119/BAY 869766: a potent, selective, allosteric inhibitor of MEK1/2 for the treatment of cancer, 2009, *Cancer Research*, 69, 6839-6847.
[128]Brereton, CF, Sutton, CE, Lalor, SJ, Lavelle, EC, Mills, KH, Inhibition of ERK MAPK suppresses IL-23- and IL-1-driven IL-17 production and attenuates autoimmune disease, 2009, *Journal of Immunology*, 183, 1715-1723.
[129]Park, SY, Kim, HY, Lee, HR, Baek, SH, Kim, CD, AB0055 Rho a protein and ERK/JNK pathways regulate IL-23 production by TLR2 in synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis, 2013, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 72, A802.
[130]Engelowski, E, Modares, NF, Gorressen, S, Bouvain, P, Semmler, D, Alter, C, Ding, Z, Flögel, U, Schrader, J, Xu, H, Lang, PA, Fischer, J, Floss, DM, Scheller, J, IL-23R signaling plays no role in myocardial infarction, 2018, *Scientific Reports*, 8, 17078.
[131]Di Cesare, A, Di Meglio, P, Nestle, FO, The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis, 2009, *Journal of Investigative Dermatology*, 129, 1339-1350.
[132]Uckun, FM, Dibirdik, I, Smith, R, Tuel-Ahlgren, L, Chandan-Langlie, M, Schieven, GL, Waddick, KG, Hanson, M, Ledbetter, JA, Interleukin 7 receptor ligation stimulates tyrosine phosphorylation, inositol phospholipid turnover, and clonal proliferation of human B-cell precursors, 1991, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 3589-3593.
[133]Miyajima, A, Kitamura, T, Harada, N, Yokota, T, Arai, K, Cytokine receptors and signal transduction, 1992, *Annual Review of Immunology*, 10, 295-331.
[134]Funakoshi-Tago, M, Pelletier, S, Matsuda, T, Parganas, E, Ihle, JN, Receptor specific downregulation of cytokine signaling by autophosphorylation in the FERM domain of Jak2, 2006, *The EMBO Journal*, 25, 4763-4772.
[135]Wells, JA, de Vos, AM, Hematopoietic receptor complexes, 1996, *Annual Review of Biochemistry*, 65, 609-634.
[136]Cacalano, NA, Migone, TS, Bazan, F, Hanson, EP, Chen, M, Candotti, F, O'Shea, JJ, Johnston, JA, Autosomal SCID caused by a point mutation in the N-terminus of JAK3: mapping of the JAK3-receptor interaction domain, 1999, *The EMBO Journal*, 18, 1549-1558.
[137]Yamaguchi, R, Sakamoto, A, Yamamoto, T, Narahara, S, Sugiuchi, H, Yamaguchi, Y, Differential regulation of IL-23 production in M1 macrophages by TIR8/SIGIRR through TLR4- or TLR7/8-mediated signaling, 2017, *Cytokine*, 99, 310-315.
[138]Bettelli, E, Oukka, M, Kuchroo, VK, T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity, 2007, *Nature Immunology*, 8, 345-350.
[139]Croxford, AL, Mair, F, Becher, B, IL-23: one cytokine in control of autoimmunity, 2012, *European Journal of Immunology*, 42, 2263-2273.
[140]Chognard, G, Bellemare, L, Pelletier, AN, Dominguez-Punaro, MC, Beauchamp, C, Guyon, MJ, Charron, G, Morin, N, Sivanesan, D, Kuchroo, V, Xavier, R, Michnick, SW, Chemtob, S, Rioux, JD, Lesage, S, The dichotomous pattern of IL-12r and IL-23R expression elucidates the role of IL-12 and IL-23 in inflammation, 2014, *Plos One*, 9, e89092.
[141]Cua, DJ, Sherlock, J, Chen, Y, Murphy, CA, Joyce, B, Seymour, B, Lucian, L, To, W, Kwan, S, Churakova, T, Zurawski, S, Wiekowski, M, Lira, SA, Gorman, D, Kastelein, RA,

Sedgwick, JD, Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain, 2003, *Nature*, 421, 744.
[142]Kastelein, RA, Hunter, CA, Cua, DJ, Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation, 2007, *Annual Review Immunology*, 25, 221-242.
[143]Parkin, J, Cohen, B, An overview of the immune system, 2001, *Lancet*, 357, 1777-1789.
[144]Bettelli, E, Carrier, Y, Gao, W, Korn, T, Strom, TB, Oukka, M, Weiner, HL, Kuchroo, VK, Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells, 2006, *Nature*, 441, 235-238.
[145]Mangan, PR, Harrington, LE, O'Quinn, DB, Helms, WS, Bullard, DC, Elson, CO, Hatton, RD, Wahl, SM, Schoeb, TR, Weaver, CT, Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage, 2006, *Nature*, 441, 231-234.
[146]Veldhoen, M, Hocking, RJ, Atkins, CJ, Locksley, RM, Stockinger, B, TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells, 2006, *Immunity*, 24, 179-189.
[147]Yang, XO, Panopoulos, AD, Nurieva, R, Chang, SH, Wang, D, Watowich, SS, Dong, C, STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells, 2007, *Journal of Biological Chemistry*, 282, 9358-9363.
[148]Durant, L, Watford, WT, Ramos, HL, Laurence, A, Vahedi, G, Wei, L, Takahashi, H, Sun, HW, Kanno, Y, Powrie, F, O'Shea, JJ, Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis, 2010, *Immunity*, 32, 605-615.
[149]Zuniga, LA, Jain, R, Haines, C, Cua, DJ, Th17 cell development: from the cradle to the grave, 2013, *Immunological Reviews*, 252, 78-88.
[150]Zhou, L, Lopes, JE, Chong, MM, Ivanov, II, Min, R, Victora, GD, Shen, Y, Du, J, Rubtsov, YP, Rudensky, AY, Ziegler, SF, Littman, DR, TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function, 2008, *Nature*, 453, 236-240.
[151]Ivanov, II, Zhou, L, Littman, DR, Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation, 2007, *Seminars in Immunology*, 19, 409-417.
[152]Liang, SC, Tan, XY, Luxenberg, DP, Karim, R, Dunussi-Joannopoulos, K, Collins, M, Fouser, LA, Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides, 2006, *Journal of Experimental Medicine*, 203, 2271-2279.
[153]Zheng, Y, Danilenko, DM, Valdez, P, Kasman, I, Eastham-Anderson, J, Wu, J, Ouyang, W, Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis, 2006, *Nature*, 445, 648.
[154]McGeachy, MJ, Bak-Jensen, KS, Chen, Y, Tato, CM, Blumenschein, W, McClanahan, T, Cua, DJ, TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology, 2007, *Nature Immunology*, 8, 1390-1397.
[155]Stritesky, GL, Yeh, N, Kaplan, MH, IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage, 2008, *Journal of Immunology*, 181, 5948-5955.
[156]Zhou, L, Ivanov, II, Spolski, R, Min, R, Shenderov, K, Egawa, T, Levy, DE, Leonard, WJ, Littman, DR, IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways, 2007, *Nature Immunology*, 8, 967-974.
[157]Chackerian, AA, Chen, SJ, Brodie, SJ, Mattson, JD, McClanahan, TK, Kastelein, RA, Bowman, EP, Neutralization or absence of the interleukin-23 pathway does not compromise immunity to mycobacterial infection, 2006, *Infection and Immunity*, 74, 6092-6099.

[158]Chen, Y, Langrish, CL, McKenzie, B, Joyce-Shaikh, B, Stumhofer, JS, McClanahan, T, Blumenschein, W, Churakovsa, T, Low, J, Presta, L, Hunter, CA, Kastelein, RA, Cua, DJ, Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis, 2006, *Journal of Clinical Investigation*, 116, 1317-1326.
[159]Gaffen, SL, Jain, R, Garg, AV, Cua, DJ, IL-23-IL-17 immune axis: discovery, mechanistic understanding, and clinical testing, 2014, *Nature Reviews Immunology*, 14, 585-600.
[160]Murugaiyan, G, Saha, B, Protumor vs antitumor functions of IL-17, 2009, *Journal of Immunology*, 183, 4169.
[161]Liao, C, Yu, ZB, Meng, G, Wang, L, Liu, QY, Chen, LT, Feng, SS, Tu, HB, Li, YF, Bai, L, Association between Th17-related cytokines and risk of non-small cell lung cancer among patients with or without chronic obstructive pulmonary disease, 2015, *Cancer*, 121 Suppl 17, 3122-3129.
[162]Tang, C, Chen, S, Qian, H, Huang, W, Interleukin-23: as a drug target for autoimmune inflammatory diseases, 2012, *Immunology*, 135, 112-124.
[163]Ngiow, SF, Teng, MW, Smyth, MJ, A balance of interleukin-12 and -23 in cancer, 2013, *Trends in Immunology*, 34, 548-555.
[164]Tang, C, Iwakura, Y, IL-23 in colitis: targeting the progenitors, 2012, *Immunity*, 37, 957-959.
[165]Murphy, CA, Langrish, CL, Chen, Y, Blumenschein, W, McClanahan, T, Kastelein, RA, Sedgwick, JD, Cua, DJ, Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation, 2003, *Journal of Experimental Medicine*, 198, 1951-1957.
[166]Wiekowski, MT, Leach, MW, Evans, EW, Sullivan, L, Chen, SC, Vassileva, G, Bazan, JF, Gorman, DM, Kastelein, RA, Narula, S, Lira, SA, Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death, 2001, *Journal of Immunology*, 166, 7563-7570.
[167]Broberg, EK, Setala, N, Eralinna, JP, Salmi, AA, Roytta, M, Hukkanen, V, Herpes simplex virus type 1 infection induces upregulation of interleukin-23 (p19) mRNA expression in trigeminal ganglia of BALB/c mice, 2002, *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 22, 641-651.
[168]Schmidt, C, Giese, T, Ludwig, B, Mueller-Molaian, I, Marth, T, Zeuzem, S, Meuer, SC, Stallmach, A, Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis, 2005, *Inflammatory Bowel Diseases*, 11, 16-23.
[169]Sato, K, Suematsu, A, Okamoto, K, Yamaguchi, A, Morishita, Y, Kadono, Y, Tanaka, S, Kodama, T, Akira, S, Iwakura, Y, Cua, DJ, Takayanagi, H, Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction, 2006, *Journal of Experimental Medicine*, 203, 2673-2682.
[170]Vaknin-Dembinsky, A, Balashov, K, Weiner, HL, IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production, 2006, *Journal of Immunology*, 176, 7768-7774.
[171]Zhang, JY, Zhang, Z, Lin, F, Zou, ZS, Xu, RN, Jin, L, Fu, JL, Shi, F, Shi, M, Wang, HF, Wang, FS, Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B, 2010, *Hepatology*, 51, 81-91.
[172]Wu, W, Li, J, Chen, F, Zhu, H, Peng, G, Chen, Z, Circulating Th17 cells frequency is associated with the disease progression in HBV infected patients, 2010, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 25, 750-757.

[173]Ge, J, Wang, K, Meng, QH, Qi, ZX, Meng, FL, Fan, YC, Implication of Th17 and Th1 cells in patients with chronic active hepatitis B, 2010, *Journal of Clinical Immunology*, 30, 60-67.
[174]Smyth, MJ, Thia, KY, Street, SE, Cretney, E, Trapani, JA, Taniguchi, M, Kawano, T, Pelikan, SB, Crowe, NY, Godfrey, DI, Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells, 2000, *Journal of Experimental Medicine*, 191, 661-668.
[175]Teng, MW, Andrews, DM, McLaughlin, N, von Scheidt, B, Ngiow, SF, Moller, A, Hill, GR, Iwakura, Y, Oft, M, Smyth, MJ, IL-23 suppresses innate immune response independently of IL-17A during carcinogenesis and metastasis, 2010, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 8328-8333.
[176]Stanilov, N, Miteva, L, Mintchev, N, Stanilova, S, High expression of Foxp3, IL-23p19 and survivin mRNA in colorectal carcinoma, 2009, *International Journal of Colorectal Disease*, 24, 151-157.
[177]Chen, J, Lu, Y, Zhang, H, Ding, Y, Ren, C, Hua, Z, Zhou, Y, Deng, B, Jin, G, Hu, Z, Xu, Y, Shen, H, A nonsynonymous polymorphism in IL23R gene is associated with risk of gastric cancer in a Chinese population, 2010, *Molecular Carcinogenesis*, 49, 862-868.
[178]Ni, B, Chen, S, Xie, H, Ma, H, Functional polymorphisms in interleukin-23 receptor and susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma in Chinese population, 2014, *Plos One*, 9, e89111.
[179]Zhou, S, Ruan, Y, Yu, H, Chen, Y, Yao, Y, Ma, Y, Gao, Y, Functional IL-23R rs10889677 genetic polymorphism and risk of multiple solid tumors: a meta-analysis, 2013, *Plos One*, 8, e80627-e80627.
[180]Hollis-Moffatt, JE, Merriman, ME, Rodger, RA, Rowley, KA, Chapman, PT, Dalbeth, N, Gow, PJ, Harrison, AA, Highton, J, Jones, PB, O'Donnell, JL, Stamp, LK, Merriman, TR, Evidence for association of an interleukin 23 receptor variant independent of the R381Q variant with rheumatoid arthritis, 2009, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68, 1340-1344.
[181]Cummings, JR, Ahmad, T, Geremia, A, Beckly, J, Cooney, R, Hancock, L, Pathan, S, Guo, C, Cardon, LR, Jewell, DP, Contribution of the novel inflammatory bowel disease gene IL23R to disease susceptibility and phenotype, 2007, *Inflammatory Bowel Diseases*, 13, 1063-1068.
[182]Ling, P, Gately, MK, Gubler, U, Stern, AS, Lin, P, Hollfelder, K, Su, C, Pan, YC, Hakimi, J, Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity, 1995, *Journal of Immunology*, 154, 116-127.
[183]Wang, X, Wilkinson, VL, Podlaski, FJ, Wu, C, Stern, AS, Presky, DH, Magram, J, Characterization of mouse interleukin-12 p40 homodimer binding to the interleukin-12 receptor subunits, 1999, *European Journal of Immunology*, 29, 2007-2013.
[184]Mattner, F, Fischer, S, Guckes, S, Jin, S, Kaulen, H, Schmitt, E, Rude, E, Germann, T, The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer, 1993, *European Journal of Immunology*, 23, 2202-2208.
[185]Gillessen, S, Carvajal, D, Ling, P, Podlaski, FJ, Stremlo, DL, Familletti, PC, Gubler, U, Presky, DH, Stern, AS, Gately, MK, Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist, 1995, *European Journal of Immunology*, 25, 200-206.
[186]Benson, JM, Sachs, CW, Treacy, G, Zhou, H, Pendley, CE, Brodmerkel, CM, Shankar, G, Mascelli, MA, Therapeutic targeting of the IL-12/23 pathways: generation and characterization of ustekinumab, 2011, *Nature Biotechnology*, 29, 615-624.
[187]Gandhi, M, Alwawi, E, Gordon, KB, Anti-p40 antibodies ustekinumab and briakinumab: blockade of interleukin-12 and interleukin-23 in the treatment of psoriasis, 2010, *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 29, 48-52.

[188]Lima, XT, Abuabara, K, Kimball, AB, Lima, HC, Briakinumab, 2009, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9, 1107-1113.
[189]Blauvelt, A, Papp, KA, Griffiths, CEM, Randazzo, B, Wasfi, Y, Shen, Y-K, Li, S, Kimball, AB, Efficacy and safety of guselkumab, an anti-interleukin-23 monoclonal antibody, compared with adalimumab for the continuous treatment of patients with moderate to severe psoriasis: results from the phase III, double-blinded, placebo- and active comparator–controlled VOYAGE 1 trial, 2017, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 76, 405-417.
[190]Gorressen, S, Stern, M, van de Sandt, AM, Cortese-Krott, MM, Ohlig, J, Rassaf, T, Gödecke, A, Fischer, JW, Heusch, G, Merx, MW, Kelm, M, Circulating NOS3 modulates left ventricular remodeling following reperfused myocardial infarction, 2015, *Plos One*, 10, e0120961.
[191]Cleutjens, JP, Verluyten, MJ, Smiths, JF, Daemen, MJ, Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart, 1995, *American Journal of Pathology*, 147, 325-338.
[192]Ma, Y, Halade, GV, Lindsey, ML, Extracellular matrix and fibroblast communication following myocardial infarction, 2012, *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 5, 848-857.
[193]Marchant, D, Boyd, J, Lin, D, Granville, D, Garmaroudi, F, McManus, B, Inflammation in myocardial diseases, 2012, *Circulation Research*, 110, 126-144.
[194]Fontes, J, Rose, N, Čiháková, D, The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure, 2015, *Cytokine*, 74, 62-68.
[195]Zhang, J-R, Pang, D-D, Tong, Q, Liu, X, Su, D-F, Dai, S-M, Different modulatory effects of IL-17, IL-22, and IL-23 on osteoblast differentiation, 2017, *Mediators of Inflammation*, 2017, 5950395.
[196]Negoro, S, Kunisada, K, Fujio, Y, Funamoto, M, Darville, MI, Eizirik, DL, Osugi, T, Izumi, M, Oshima, Y, Nakaoka, Y, Hirota, H, Kishimoto, T, Yamauchi-Takihara, K, Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase, 2001, *Circulation*, 104, 979-981.
[197]Hilfiker-Kleiner, D, Hilfiker, A, Fuchs, M, Kaminski, K, Schaefer, A, Schieffer, B, Hillmer, A, Schmiedl, A, Ding, Z, Podewski, E, Podewski, E, Poli, V, Schneider, MD, Schulz, R, Park, JK, Wollert, KC, Drexler, H, Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury, 2004, *Circulation Research*, 95, 187-195.
[198]Jacoby, JJ, Kalinowski, A, Liu, MG, Zhang, SS, Gao, Q, Chai, GX, Ji, L, Iwamoto, Y, Li, E, Schneider, M, Russell, KS, Fu, XY, Cardiomyocyte-restricted knockout of STAT3 results in higher sensitivity to inflammation, cardiac fibrosis, and heart failure with advanced age, 2003, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 12929-12934.
[199]Das, A, Salloum, FN, Durrant, D, Ockaili, R, Kukreja, RC, Rapamycin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through JAK2-STAT3 signaling pathway, 2012, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 53, 858-869.
[200]Xu, X, Chen, H, Zhu, X, Ma, Y, Liu, Q, Xue, Y, Chu, H, Wu, W, Wang, J, Zou, H, S100A9 promotes human lung fibroblast cells activation through receptor for advanced glycation end-product-mediated extracellular-regulated kinase 1/2, mitogen-activated protein-kinase and nuclear factor-κB-dependent pathways, 2013, *Clinical and Experimental Immunology*, 173, 523-535.

[201]Fang, F, Li, D, Pan, H, Chen, D, Qi, L, Zhang, R, Sun, H, Luteolin inhibits apoptosis and improves cardiomyocyte contractile function through the PI3K/AKT pathway in simulated ischemia/reperfusion, 2011, *Pharmacology*, 88, 149-158.
[202]Feng, W, Li, W, Liu, W, Wang, F, Li, Y, Yan, W, IL-17 induces myocardial fibrosis and enhances RANKL/OPG and MMP/TIMP signaling in isoproterenol-induced heart failure, 2009, *Experimental and Molecular Pathology*, 87, 212-218.
[203]Li, N, Bian, H, Zhang, J, Li, X, Ji, X, Zhang, Y, The Th17/Treg imbalance exists in patients with heart failure with normal ejection fraction and heart failure with reduced ejection fraction, 2010, *Clinica Chimica Acta*, 411, 1963-1968.
[204]Yamaoka-Tojo, M, Tojo, T, Inomata, T, Machida, Y, Osada, K, Izumi, T, Circulating levels of interleukin 18 reflect etiologies of heart failure: Th1/Th2 cytokine imbalance exaggerates the pathophysiology of advanced heart failure, 2002, *Journal of Cardiac Failure*, 8, 21-27.
[205]Liao, YH, Xia, N, Zhou, SF, Tang, TT, Yan, XX, Lv, BJ, Nie, SF, Wang, J, Iwakura, Y, Xiao, H, Yuan, J, Jevallee, H, Wei, F, Shi, GP, Cheng, X, Interleukin-17A contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration, 2012, *Journal of the American College of Cardiology*, 59, 420-429.
[206]Baldeviano, GC, Barin, JG, Talor, MV, Srinivasan, S, Bedja, D, Zheng, D, Gabrielson, K, Iwakura, Y, Rose, NR, Cihakova, D, Interleukin-17A is dispensable for myocarditis but essential for the progression to dilated cardiomyopathy, 2010, *Circulation Research*, 106, 1646-1655.
[207]Erbel, C, Chen, L, Bea, F, Wangler, S, Celik, S, Lasitschka, F, Wang, Y, Bockler, D, Katus, HA, Dengler, TJ, Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice, 2009, *Journal of Immunology*, 183, 8167-8175.
[208]Long, Q, Liao, Y-H, Xie, Y, Liang, W, Cheng, X, Yuan, J, Yu, M, Coxsackievirus B3 directly induced Th17 cell differentiation by inhibiting Nup98 expression in patients with acute viral myocarditis, 2016, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, 171.
[209]Savvatis, K, Pappritz, K, Becher, PM, Lindner, D, Zietsch, C, Volk, HD, Westermann, D, Schultheiss, HP, Tschope, C, Interleukin-23 deficiency leads to impaired wound healing and adverse prognosis after myocardial infarction, 2014, *Circulation: Heart Failure*, 7, 161-171.
[210]Yan, X, Shichita, T, Katsumata, Y, Matsuhashi, T, Ito, H, Ito, K, Anzai, A, Endo, J, Tamura, Y, Kimura, K, Fujita, J, Shinmura, K, Shen, W, Yoshimura, A, Fukuda, K, Sano, M, Deleterious effect of the IL-23/IL-17A axis and gammadeltaT cells on left ventricular remodeling after myocardial infarction, 2012, *Journal of the American Heart Association*, 1, e004408.
[211]Liao, Y, Hu, X, Guo, X, Zhang, B, Xu, W, Jiang, H, Promoting effects of IL-23 on myocardial ischemia and reperfusion are associated with increased expression of IL-17A and upregulation of the JAK2-STAT3 signaling pathway, 2017, *Molecular Medicine Reports*, 16, 9309-9316.
[212]Taga, T, Gp130, a shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuropoietic cytokines, 1996, *Journal of Neurochemistry*, 67, 1-10.
[213]Pennica, D, Wood, WI, Chien, KR, Cardiotrophin-1: a multifunctional cytokine that signals via LIF receptor-gp 130 dependent pathways, 1996, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 7, 81-91.
[214]Hibi, M, Murakami, M, Saito, M, Hirano, T, Taga, T, Kishimoto, T, Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130, 1990, *Cell*, 63, 1149-1157.

[215]Pflanz, S, Kurth, I, Grotzinger, J, Heinrich, PC, Muller-Newen, G, Two different epitopes of the signal transducer gp130 sequentially cooperate on IL-6-induced receptor activation, 2000, *Journal of Immunology*, 165, 7042-7049.
[216]Kamimura, D, Ishihara, K, Hirano, T, IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model, 2003, *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 149, 1-38.
[217]Fasnacht, N, Muller, W, Conditional gp130 deficient mouse mutants, 2008, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19, 379-384.
[218]Heinrich, PC, Behrmann, I, Haan, S, Hermanns, HM, Muller-Newen, G, Schaper, F, Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation, 2003, *Biochemical Journal*, 374, 1-20.
[219]Stahl, N, Boulton, TG, Farruggella, T, Ip, NY, Davis, S, Witthuhn, BA, Quelle, FW, Silvennoinen, O, Barbieri, G, Pellegrini, S, et al., Association and activation of JAK-TYK kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components, 1994, *Science*, 263, 92-95.
[220]Lutticken, C, Wegenka, UM, Yuan, J, Buschmann, J, Schindler, C, Ziemiecki, A, Harpur, AG, Wilks, AF, Yasukawa, K, Taga, T, et al., Association of transcription factor APRF and protein kinase JAK1 with the interleukin-6 signal transducer gp130, 1994, *Science*, 263, 89-92.
[221]Ward, LD, Hammacher, A, Howlett, GJ, Matthews, JM, Fabri, L, Moritz, RL, Nice, EC, Weinstock, J, Simpson, RJ, Influence of interleukin-6 (IL-6) dimerization on formation of the high affinity hexameric IL-6·receptor complex, 1996, *Journal of Biological Chemistry*, 271, 20138-20144.
[222]Ward, LD, Howlett, GJ, Discolo, G, Yasukawa, K, Hammacher, A, Moritz, RL, Simpson, RJ, High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130, 1994, *Journal of Biological Chemistry*, 269, 23286-23289.
[223]Howlett, M, Menheniott, TR, Judd, LM, Giraud, AS, Cytokine signalling via gp130 in gastric cancer, 2009, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793, 1623-1633.
[224]Hemmann, U, Gerhartz, C, Heesel, B, Sasse, J, Kurapkat, G, Grotzinger, J, Wollmer, A, Zhong, Z, Darnell, JE, Jr., Graeve, L, Heinrich, PC, Horn, F, Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation, 1996, *Journal of Biological Chemistry*, 271, 12999-13007.
[225]Silver, JS, Hunter, CA, Gp130 at the nexus of inflammation, autoimmunity, and cancer, 2010, *Journal of Leukocyte Biology*, 88, 1145-1156.
[226]Fuhrer, DK, Yang, YC, Complex formation of JAK2 with PP2A, P13K, and Yes in response to the hematopoietic cytokine interleukin-11, 1996, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 224, 289-296.
[227]Lehmann, U, Schmitz, J, Weissenbach, M, Sobota, RM, Hortner, M, Friederichs, K, Behrmann, I, Tsiaris, W, Sasaki, A, Schneider-Mergener, J, Yoshimura, A, Neel, BG, Heinrich, PC, Schaper, F, SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130, 2003, *Journal of Biological Chemistry*, 278, 661-671.
[228]Schaper, F, Gendo, C, Eck, M, Schmitz, J, Grimm, C, Anhuf, D, Kerr, IM, Heinrich, PC, Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression, 1998, *Biochemical Journal*, 335 (Pt 3), 557-565.

[229]Fischer, P, Lehmann, U, Sobota, RM, Schmitz, J, Niemand, C, Linnemann, S, Haan, S, Behrmann, I, Yoshimura, A, Johnston, JA, Müller-Newen, G, Heinrich, PC, Schaper, F, The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitization of interleukin-6 signalling, 2004, *Biochemical Journal*, 378, 449-460.
[230]Eulenfeld, R, Dittrich, A, Khouri, C, Müller, PJ, Mütze, B, Wolf, A, Schaper, F, Interleukin-6 signalling: more than JAKs and STATs, 2012, *European Journal of Cell Biology*, 91, 486-495.
[231]Negahdaripour, M, Nezafat, N, Ghasemi, Y, A panoramic review and in silico analysis of IL-11 structure and function, 2016, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 32, 41-61.
[232]Boulton, TG, Zhong, Z, Wen, Z, Darnell, JE, Jr., Stahl, N, Yancopoulos, GD, STAT3 activation by cytokines utilizing gp130 and related transducers involves a secondary modification requiring an H7-sensitive kinase, 1995, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 6915-6919.
[233]Eklund, CM, Proinflammatory cytokines in CRP baseline regulation, 2009, *Advances in Clinical Chemistry*, 48, 111-136.
[234]Drucker, C, Gewiese, J, Malchow, S, Scheller, J, Rose-John, S, Impact of interleukin-6 classic- and trans-signaling on liver damage and regeneration, 2010, *Journal of Autoimmunity*, 34, 29-37.
[235]Fattori, E, Cappelletti, M, Costa, P, Sellitto, C, Cantoni, L, Carelli, M, Faggioni, R, Fantuzzi, G, Ghezzi, P, Poli, V, Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice, 1994, *Journal of Experimental Medicine*, 180, 1243-1250.
[236]Pilati, C, Zucman-Rossi, J, Mutations leading to constitutive active gp130/JAK1/STAT3 pathway, 2015, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 26, 499-506.
[237]Rebouissou, S, Amessou, M, Couchy, G, Poussin, K, Imbeaud, S, Pilati, C, Izard, T, Balabaud, C, Bioulac-Sage, P, Zucman-Rossi, J, Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours, 2009, *Nature*, 457, 200-204.
[238]Cherqui, D, Rahmouni, A, Charlotte, F, Boulahdour, H, Metreau, JM, Meignan, M, Fagniez, PL, Zafrani, ES, Mathieu, D, Dhumeaux, D, Management of focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma in young women: a series of 41 patients with clinical, radiological, and pathological correlations, 1995, *Hepatology*, 22, 1674-1681.
[239]Bioulac-Sage, P, Rebouissou, S, Thomas, C, Blanc, JF, Saric, J, Sa Cunha, A, Rullier, A, Cubel, G, Couchy, G, Imbeaud, S, Balabaud, C, Zucman-Rossi, J, Hepatocellular adenoma subtype classification using molecular markers and immunohistochemistry, 2007, *Hepatology*, 46, 740-748.
[240]Poussin, K, Pilati, C, Couchy, G, Calderaro, J, Bioulac-Sage, P, Bacq, Y, Paradis, V, Leteurtre, E, Sturm, N, Ramos, J, Guettier, C, Bardier-Dupas, A, Boulai, A, Wendum, D, Selves, J, Izard, T, Nault, J-C, Zucman-Rossi, J, Biochemical and functional analyses of gp130 mutants unveil JAK1 as a novel therapeutic target in human inflammatory hepatocellular adenoma, 2013, *Oncoimmunology*, 2, e27090.
[241]Koskela, HL, Eldfors, S, Ellonen, P, van Adrichem, AJ, Kuusanmaki, H, Andersson, EI, Lagstrom, S, Clemente, MJ, Olson, T, Jalkanen, SE, Majumder, MM, Almusa, H, Edgren, H, Lepisto, M, Mattila, P, Guinta, K, Koistinen, P, Kuittinen, T, Penttinen, K, Parsons, A, Knowles, J, Saarela, J, Wennerberg, K, Kallioniemi, O, Porkka, K, Loughran, TP, Jr., Heckman, CA, Maciejewski, JP, Mustjoki, S, Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia, 2012, *New England Journal of Medicine*, 366, 1905-1913.

[242]Rajala, HL, Porkka, K, Maciejewski, JP, Loughran, TP, Jr., Mustjoki, S, Uncovering the pathogenesis of large granular lymphocytic leukemia-novel STAT3 and STAT5b mutations, 2014, *Annals of Medicine*, 46, 114-122.
[243]Kan, Z, Zheng, H, Liu, X, Li, S, Barber, TD, Gong, Z, Gao, H, Hao, K, Willard, MD, Xu, J, Hauptschein, R, Rejto, PA, Fernandez, J, Wang, G, Zhang, Q, Wang, B, Chen, R, Wang, J, Lee, NP, Zhou, W, Lin, Z, Peng, Z, Yi, K, Chen, S, Li, L, Fan, X, Yang, J, Ye, R, Ju, J, Wang, K, Estrella, H, Deng, S, Wei, P, Qiu, M, Wulur, IH, Liu, J, Ehsani, ME, Zhang, C, Loboda, A, Sung, WK, Aggarwal, A, Poon, RT, Fan, ST, Wang, J, Hardwick, J, Reinhard, C, Dai, H, Li, Y, Luk, JM, Mao, M, Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma, 2013, *Genome Research*, 23, 1422-1433.
[244]Xie, HJ, Bae, HJ, Noh, JH, Eun, JW, Kim, JK, Jung, KH, Ryu, JC, Ahn, YM, Kim, SY, Lee, SH, Yoo, NJ, Lee, JY, Park, WS, Nam, SW, Mutational analysis of JAK1 gene in human hepatocellular carcinoma, 2009, *Neoplasma*, 56, 136-140.
[245]Jeong, EG, Kim, MS, Nam, HK, Min, CK, Lee, S, Chung, YJ, Yoo, NJ, Lee, SH, Somatic mutations of JAK1 and JAK3 in acute leukemias and solid cancers, 2008, *Clinical Cancer Research*, 14, 3716-3721.
[246]Stuhlmann-Laeisz, C, Lang, S, Chalaris, A, Krzysztof, P, Enge, S, Eichler, J, Klingmüller, U, Samuel, M, Ernst, M, Rose-John, S, Scheller, J, Forced dimerization of gp130 leads to constitutive STAT3 activation, cytokine-independent growth, and blockade of differentiation of embryonic stem cells, 2006, *Molecular Biology of the Cell*, 17, 2986-2995.
[247]Suthaus, J, Tillmann, A, Lorenzen, I, Bulanova, E, Rose-John, S, Scheller, J, Forced homo- and heterodimerization of all gp130-type receptor complexes leads to constitutive ligand-independent signaling and cytokine-independent growth, 2010, *Molecular Biology of the Cell*, 21, 2797-2807.
[248]Lamertz, L, Floss, DM, Scheller, J, Combined deletion of the fibronectin-type III domains and the stalk region results in ligand-independent, constitutive activation of the Interleukin 6 signal-transducing receptor gp130, 2018, *Cytokine*, 110, 428-434.
[249]Patel, N, Herrman, JM, Timans, JC, Kastelein, RA, Functional replacement of cytokine receptor extracellular domains by leucine zippers, 1996, *Journal of Biological Chemistry*, 271, 30386-30391.
[250]Porcar, M, Pereto, J, Nature versus design: synthetic biology or how to build a biological non-machine, 2016, *Integrative Biology*, 8, 451-455.
[251]Chakravarti, D, Wong, WW, Synthetic biology in cellular immunotherapy, 2015, *Trends in Biotechnology*, 33, 449-461.
[252]Adam, N, Rabe, B, Suthaus, J, Grotzinger, J, Rose-John, S, Scheller, J, Unraveling viral interleukin-6 binding to gp130 and activation of STAT-signaling pathways independently of the interleukin-6 receptor, 2009, *Journal of Virology*, 83, 5117-5126.
[253]Sommer, J, Effenberger, T, Volpi, E, Waetzig, GH, Bernhardt, M, Suthaus, J, Garbers, C, Rose-John, S, Floss, DM, Scheller, J, Constitutively active mutant gp130 receptor protein from inflammatory hepatocellular adenoma is inhibited by an anti-gp130 antibody that specifically neutralizes interleukin 11 signaling, 2012, *Journal of Biological Chemistry*, 287, 13743-13751.
[254]Spencer, DM, Wandless, TJ, Schreiber, SL, Crabtree, GR, Controlling signal transduction with synthetic ligands, 1993, *Science*, 262, 1019-1024.
[255]Moraga, I, Spangler, JB, Mendoza, JL, Gakovic, M, Wehrman, TS, Krutzik, P, Garcia, KC, Synthekines are surrogate cytokine and growth factor agonists that compel signaling through non-natural receptor dimers, 2017, *eLife*, 6, e22882.

[256]Janda, CY, Dang, LT, You, C, Chang, J, de Lau, W, Zhong, ZA, Yan, KS, Marecic, O, Siepe, D, Li, X, Moody, JD, Williams, BO, Clevers, H, Piehler, J, Baker, D, Kuo, CJ, Garcia, KC, Surrogate Wnt agonists that phenocopy canonical Wnt and β-catenin signalling, 2017, *Nature*, 545, 234.
[257]Firor, AE, Jares, A, Ma, Y, From humble beginnings to success in the clinic: Chimeric antigen receptor-modified T-cells and implications for immunotherapy, 2015, *Experimental Biology and Medicine*, 240, 1087-1098.
[258]Kohn, DB, Dotti, G, Brentjens, R, Savoldo, B, Jensen, M, Cooper, LJN, June, CH, Rosenberg, S, Sadelain, M, Heslop, HE, CARs on track in the clinic: workshop of the blood and marrow transplant clinical trials network subcommittee on cell and gene therapy Washington DC, 18 May 2010, 2011, *Molecular Therapy*, 19, 432-438.
[259]Kitamura, T, Koshino, Y, Shibata, F, Oki, T, Nakajima, H, Nosaka, T, Kumagai, H, Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics, 2003, *Experimental Hematology*, 31, 1007-1014.
[260]Rossig, C, Brenner, MK, Genetic modification of T lymphocytes for adoptive immunotherapy, 2004, *Molecular Therapy*, 10, 5-18.
[261]Dotti, G, Heslop, HE, Current status of genetic modification of T cells for cancer treatment, 2005, *Cytotherapy*, 7, 262-272.
[262]Biagi, E, Marin, V, Giordano Attianese, GM, Dander, E, D'Amico, G, Biondi, A, Chimeric T-cell receptors: new challenges for targeted immunotherapy in hematologic malignancies, 2007, *Haematologica*, 92, 381-388.
[263]Kloss, CC, Condomines, M, Cartellieri, M, Bachmann, M, Sadelain, M, Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells, 2013, *Nature Biotechnology*, 31, 71-75.
[264]Krause, A, Guo, HF, Latouche, JB, Tan, C, Cheung, NK, Sadelain, M, Antigen-dependent CD28 signaling selectively enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes, 1998, *Journal of Experimental Medicine*, 188, 619-626.
[265]Prosser, ME, Brown, CE, Shami, AF, Forman, SJ, Jensen, MC, Tumor PD-L1 co-stimulates primary human CD8(+) cytotoxic T cells modified to express a PD1:CD28 chimeric receptor, 2012, *Molecular Immunology*, 51, 263-272.
[266]Roybal, KT, Rupp, LJ, Morsut, L, Walker, WJ, McNally, KA, Park, JS, Lim, WA, Precision tumor recognition by T cells with combinatorial antigen-sensing circuits, 2016, *Cell*, 164, 770-779.
[267]Fedorov, VD, Themeli, M, Sadelain, M, PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses, 2013, *Science Translational Medicine*, 5, 215ra172.
[268]Magee, MS, Snook, AE, Challenges to chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy for cancer, 2014, *Discovery Medicine*, 18, 265-271.
[269]Han, X, Cinay, GE, Zhao, Y, Guo, Y, Zhang, X, Wang, P, Adnectin-based design of chimeric antigen receptor for T cell engineering, 2017, *Molecular Therapy*, 25, 2466-2476.
[270]Jang, M, Yew, PY, Deep sequencing of T-cell and B-cell receptors with next-generation DNA sequencers, 2015, Immunopharmacogenomics, 3-25.
[271]Bannas, P, Hambach, J, Koch-Nolte, F, Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics, 2017, *Frontiers in Immunology*, 8, 1603.

[272]Buss, NAPS, Henderson, SJ, McFarlane, M, Shenton, JM, de Haan, L, Monoclonal antibody therapeutics: history and future, 2012, *Current Opinion in Pharmacology*, 12, 615-622.
[273]Helma, J, Cardoso, MC, Muyldermans, S, Leonhardt, H, Nanobodies and recombinant binders in cell biology, 2015, *Journal of Cell Biology*, 209, 633.
[274]Andreakos, E, Taylor, PC, Feldmann, M, Monoclonal antibodies in immune and inflammatory diseases, 2002, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 615-620.
[275]Christian, BA, Lin, TS, Antibody therapy for chronic lymphocytic leukemia, 2008, *Seminars in Hematology*, 45, 95-103.
[276]Busse, W, Corren, J, Lanier, BQ, McAlary, M, Fowler-Taylor, A, Cioppa, GD, van As, A, Gupta, N, Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma, 2001, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108, 184-190.
[277]Brown, SL, Greene, MH, Gershon, SK, Edwards, ET, Braun, MM, Tumor necrosis factor antagonist therapy and lymphoma development: twenty-six cases reported to the food and drug administration, 2002, *Arthritis & Rheumatism*, 46, 3151-3158.
[278]Lipman, NS, Jackson, LR, Trudel, LJ, Weis-Garcia, F, Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources, 2005, *ILAR Journal*, 46, 258-268.
[279]Olafsen, T, Wu, AM, Antibody vectors for imaging, 2010, *Seminars in Nuclear Medicine*, 40, 167-181.
[280]Steeland, S, Vandenbroucke, RE, Libert, C, Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies, 2016, *Drug Discovery Today*, 21, 1076-1113.
[281]Hamers-Casterman, C, Atarhouch, T, Muyldermans, S, Robinson, G, Hamers, C, Songa, EB, Bendahman, N, Hamers, R, Naturally occurring antibodies devoid of light chains, 1993, *Nature*, 363, 446-448.
[282]Wesolowski, J, Alzogaray, V, Reyelt, J, Unger, M, Juarez, K, Urrutia, M, Cauerhff, A, Danquah, W, Rissiek, B, Scheuplein, F, Schwarz, N, Adriouch, S, Boyer, O, Seman, M, Licea, A, Serreze, DV, Goldbaum, FA, Haag, F, Koch-Nolte, F, Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity, 2009, *Medical Microbiology and Immunology*, 198, 157-174.
[283]Bannas, P, Lenz, A, Kunick, V, Fumey, W, Rissiek, B, Schmid, J, Haag, F, Leingärtner, A, Trepel, M, Adam, G, Koch-Nolte, F, Validation of nanobody and antibody based in vivo tumor xenograft NIRF-imaging experiments in mice using ex vivo flow cytometry and microscopy, 2015, *Journal of Visualized Experiments*, 52462.
[284]Els Conrath, K, Lauwereys, M, Wyns, L, Muyldermans, S, Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs, 2001, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 7346-7350.
[285]Dumoulin, M, Last, AM, Desmyter, A, Decanniere, K, Canet, D, Larsson, G, Spencer, A, Archer, DB, Sasse, J, Muyldermans, S, Wyns, L, Redfield, C, Matagne, A, Robinson, CV, Dobson, CM, A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme, 2003, *Nature*, 424, 783-788.
[286]Bannas, P, Well, L, Lenz, A, Rissiek, B, Haag, F, Schmid, J, Hochgrafe, K, Trepel, M, Adam, G, Ittrich, H, Koch-Nolte, F, In vivo near-infrared fluorescence targeting of T cells: comparison of nanobodies and conventional monoclonal antibodies, 2014, *Contrast Media & Molecular Imaging*, 9, 135-142.

[287]Steeland, S, Puimege, L, Vandenbroucke, RE, Van Hauwermeiren, F, Haustraete, J, Devoogdt, N, Hulpiau, P, Leroux-Roels, G, Laukens, D, Meuleman, P, De Vos, M, Libert, C, Generation and characterization of small single domain antibodies inhibiting human tumor necrosis factor receptor 1, 2015, *Journal of Biological Chemistry*, 290, 4022-4037.

[288]Riazi, A, Strong, PCR, Coleman, R, Chen, W, Hirama, T, van Faassen, H, Henry, M, Logan, SM, Szymanski, CM, MacKenzie, R, Ghahroudi, MA, Pentavalent single-domain antibodies reduce campylobacter jejuni motility and colonization in chickens, 2013, *Plos One*, 8, e83928.

[289]Pant, N, Hultberg, A, Zhao, Y, Svensson, L, Pan-Hammarstrom, Q, Johansen, K, Pouwels, PH, Ruggeri, FM, Hermans, P, Frenken, L, Boren, T, Marcotte, H, Hammarstrom, L, Lactobacilli expressing variable domain of llama heavy-chain antibody fragments (lactobodies) confer protection against rotavirus-induced diarrhea, 2006, *Journal of Infectious Diseases*, 194, 1580-1588.

[290]Rasmussen, SGF, Choi, H-J, Fung, JJ, Pardon, E, Casarosa, P, Chae, PS, DeVree, BT, Rosenbaum, DM, Thian, FS, Kobilka, TS, Schnapp, A, Konetzki, I, Sunahara, RK, Gellman, SH, Pautsch, A, Steyaert, J, Weis, WI, Kobilka, BK, Structure of a nanobody-stabilized active state of the β2 adrenoceptor, 2011, *Nature*, 469, 175.

[291]Klooster, R, Maassen, BT, Stam, JC, Hermans, PW, Ten Haaft, MR, Detmers, FJ, de Haard, HJ, Post, JA, Theo Verrips, C, Improved anti-IgG and HSA affinity ligands: clinical application of VHH antibody technology, 2007, *Journal of Immunological Methods*, 324, 1-12.

[292]Schut, MH, Pepers, BA, Klooster, R, van der Maarel, SM, el Khatabi, M, Verrips, T, den Dunnen, JT, van Ommen, G-JB, van Roon-Mom, WMC, Selection and characterization of llama single domain antibodies against N-terminal huntingtin, 2015, *Neurological Sciences*, 36, 429-434.

[293]Zhu, M, Gong, X, Hu, Y, Ou, W, Wan, Y, Streptavidin-biotin-based directional double Nanobody sandwich ELISA for clinical rapid and sensitive detection of influenza H5N1, 2014, *Journal of Translational Medicine*, 12, 352.

[294]Vaneycken, I, Devoogdt, N, Van Gassen, N, Vincke, C, Xavier, C, Wernery, U, Muyldermans, S, Lahoutte, T, Caveliers, V, Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer, 2011, *FASEB Journal*, 25, 2433-2446.

[295]Huang, L, Gainkam, LO, Caveliers, V, Vanhove, C, Keyaerts, M, De Baetselier, P, Bossuyt, A, Revets, H, Lahoutte, T, SPECT imaging with 99mTc-labeled EGFR-specific nanobody for in vivo monitoring of EGFR expression, 2008, *Molecular Imaging and Biology*, 10, 167-175.

[296]Vandenbroucke, K, de Haard, H, Beirnaert, E, Dreier, T, Lauwereys, M, Huyck, L, Van Huysse, J, Demetter, P, Steidler, L, Remaut, E, Cuvelier, C, Rottiers, P, Orally administered L. lactis secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis, 2010, *Mucosal Immunology*, 3, 49-56.

[297]Wang, Y, Fan, Z, Shao, L, Kong, X, Hou, X, Tian, D, Sun, Y, Xiao, Y, Yu, L, Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications, 2016, *International Journal of Nanomedicine*, 11, 3287-3303.

[298]Rothbauer, U, Zolghadr, K, Muyldermans, S, Schepers, A, Cardoso, MC, Leonhardt, H, A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins, 2008, *Molecular & Cellular Proteomics*, 7, 282-289.

[299]Fridy, PC, Li, Y, Keegan, S, Thompson, MK, Nudelman, I, Scheid, JF, Oeffinger, M, Nussenzweig, MC, Fenyö, D, Chait, BT, Rout, MP, A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires, 2014, *Nature Methods*, 11, 1253-1260.

[300]Kirchhofer, A, Helma, J, Schmidthals, K, Frauer, C, Cui, S, Karcher, A, Pellis, M, Muyldermans, S, Casas-Delucchi, CS, Cardoso, MC, Leonhardt, H, Hopfner, KP, Rothbauer, U, Modulation of protein properties in living cells using nanobodies, 2010, *Nature Structural & Molecular Biology*, 17, 133-138.
[301]Herce, HD, Deng, W, Helma, J, Leonhardt, H, Cardoso, MC, Visualization and targeted disruption of protein interactions in living cells, 2013, *Nature Communications*, 4, 2660.
[302]Kunzl, F, Fruholz, S, Fassler, F, Li, B, Pimpl, P, Receptor-mediated sorting of soluble vacuolar proteins ends at the trans-Golgi network/early endosome, 2016, *Nature Plants*, 2, 16017.
[303]Ries, J, Kaplan, C, Platonova, E, Eghlidi, H, Ewers, H, A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies, 2012, *Nature Methods*, 9, 582-584.
[304]Roybal, KT, Williams, JZ, Morsut, L, Rupp, LJ, Kolinko, I, Choe, JH, Walker, WJ, McNally, KA, Lim, WA, Engineering T cells with customized therapeutic response programs using synthetic Notch receptors, 2016, *Cell*, 167, 419-432.e416.
[305]Gordon, WR, Zimmerman, B, He, L, Miles, LJ, Huang, J, Tiyanont, K, McArthur, DG, Aster, JC, Perrimon, N, Loparo, JJ, Blacklow, SC, Mechanical allostery: evidence for a force requirement in the proteolytic activation of Notch, 2015, *Developmental Cell*, 33, 729-736.
[306]Potter, CJ, Tasic, B, Russler, EV, Liang, L, Luo, L, The Q system: a repressible binary system for transgene expression, lineage tracing, and mosaic analysis, 2010, *Cell*, 141, 536-548.
[307]He, L, Huang, J, Perrimon, N, Development of an optimized synthetic Notch receptor as an in vivo cell-cell contact sensor, 2017, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, 5467-5472.
[308]Scheller, J, Floss, DM, LAng, PA, Engelowski, E, Xu, H, Franke, M, Schneider, A, Synthetic signalling constructs and its use, 06.04.2018, H-H-U Düsseldorf, EP18166111.7 (*pending*).
[309]Kubala, MH, Kovtun, O, Alexandrov, K, Collins, BM, Structural and thermodynamic analysis of the GFP:GFP-nanobody complex, 2010, *Protein Science*, 19, 2389-2401.
[310]Choudhary, MM, France, TJ, Teknos, TN, Kumar, P, Interleukin-6 role in head and neck squamous cell carcinoma progression, 2016, *World Journal of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery*, 2, 90-97.
[311]Grossman, RM, Krueger, J, Yourish, D, Granelli-Piperno, A, Murphy, DP, May, LT, Kupper, TS, Sehgal, PB, Gottlieb, AB, Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes, 1989, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 6367-6371.
[312]Lee, E, Trepicchio, WL, Oestreicher, JL, Pittman, D, Wang, F, Chamian, F, Dhodapkar, M, Krueger, JG, Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris, 2004, *Journal of Experimental Medicine*, 199, 125-130.
[313]Nagahama, KY, Togo, S, Holz, O, Magnussen, H, Liu, X, Seyama, K, Takahashi, K, Rennard, SI, Oncostatin M modulates fibroblast function via signal transducers and activators of transcription proteins–3, 2013, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 49, 582-591.
[314]Shimozato, O, Ugai, S-i, Chiyo, M, Takenobu, H, Nagakawa, H, Wada, A, Kawamura, K, Yamamoto, H, Tagawa, M, The secreted form of the p40 subunit of interleukin (IL)-12 inhibits IL-23 functions and abrogates IL-23-mediated antitumour effects, 2006, *Immunology*, 117, 22-28.

[315]Chen, Z, Tato, CM, Muul, L, Laurence, A, O'Shea, JJ, Distinct regulation of IL-17 in human helper T lymphocytes, 2007, *Arthritis & Rheumatism*, 56, 2936-2946.
[316]Marchant, DJ, Boyd, JH, Lin, DC, Granville, DJ, Garmaroudi, FS, McManus, BM, Inflammation in myocardial diseases, 2012, *Circulation Research*, 110, 126-144.
[317]Ridker, PM, Everett, BM, Thuren, T, MacFadyen, JG, Chang, WH, Ballantyne, C, Fonseca, F, Nicolau, J, Koenig, W, Anker, SD, Kastelein, JJP, Cornel, JH, Pais, P, Pella, D, Genest, J, Cifkova, R, Lorenzatti, A, Forster, T, Kobalava, Z, Vida-Simiti, L, Flather, M, Shimokawa, H, Ogawa, H, Dellborg, M, Rossi, PRF, Troquay, RPT, Libby, P, Glynn, RJ, Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease, 2017, *New England Journal of Medicine*, 377, 1119-1131.
[318]Noll, J, Helk, E, Fehling, H, Bernin, H, Marggraff, C, Jacobs, T, Huber, S, Pelczar, P, Ernst, T, Ittrich, H, Otto, B, Mittrücker, H-W, Hölscher, C, Tacke, F, Bruchhaus, I, Tannich, E, Lotter, H, IL-23 prevents IL-13-dependent tissue repair associated with Ly6Clo monocytes in Entamoeba histolytica-induced liver damage, 2016, *Journal of Hepatology*, 64, 1147-1157.
[319]Webber, J, Jenkins, RH, Meran, S, Phillips, A, Steadman, R, Modulation of TGFβ1-dependent myofibroblast differentiation by hyaluronan, 2009, *American Journal of Pathology*, 175, 148-160.
[320]Gabbiani, G, The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases, 2003, *Journal of Pathology*, 200, 500-503.
[321]Desmoulière, A, Darby, IA, Gabbiani, G, Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis, 2003, *Laboratory Investigation*, 83, 1689.
[322]Tomasek, JJ, Gabbiani, G, Hinz, B, Chaponnier, C, Brown, RA, Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling, 2002, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, 349-363.
[323]Jenkins, RH, Thomas, GJ, Williams, JD, Steadman, R, Myofibroblastic differentiation leads to hyaluronan accumulation through reduced ryaluronan turnover, 2004, *Journal of Biological Chemistry*, 279, 41453-41460.
[324]Lewis, A, Steadman, R, Manley, P, Craig, K, de la Motte, C, Hascall, V, Phillips, AO, Diabetic nephropathy, inflammation, hyaluronan and interstitial fibrosis, 2008, *Histology and Histopathology*, 23, 731-739.
[325]Lewington, AJ, Padanilam, BJ, Martin, DR, Hammerman, MR, Expression of CD44 in kidney after acute ischemic injury in rats, 2000, *American Journal of Physiology*, 278, R247-254.
[326]Li, WX, Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling, 2008, *Trends in Cell Biology*, 18, 545-551.
[327]Reliene, R, Schiestl, RH, Differences in animal housing facilities and diet may affect study outcomes-a plea for inclusion of such information in publications, 2006, *DNA Repair*, 5, 651-653.
[328]Hu, X, Ma, R, Lu, J, Zhang, K, Xu, W, Jiang, H, Da, Y, IL-23 promotes myocardial I/R injury by increasing the inflammatory responses and oxidative stress reactions, 2016, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38, 2163-2172.
[329]Kroemer, G, Galluzzi, L, Vandenabeele, P, Abrams, J, Alnemri, ES, Baehrecke, EH, Blagosklonny, MV, El-Deiry, WS, Golstein, P, Green, DR, Hengartner, M, Knight, RA, Kumar, S, Lipton, SA, Malorni, W, Nunez, G, Peter, ME, Tschopp, J, Yuan, J, Piacentini, M, Zhivotovsky, B, Melino, G, Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009, 2009, *Cell Death & Differentiation*, 16, 3-11.

[330]Palacios, R, Steinmetz, M, IL-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo, 1985, *Cell*, 41, 727-734.
[331]Berger, S, Lowe, P, Tesar, M, Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: applications and challenges, 2015, *Monoclonal Antibodies*, 7, 456-460.
[332]Jafari, R, Zolbanin, NM, Rafatpanah, H, Majidi, J, Kazemi, T, Fc-fusion proteins in therapy: an updated view, 2017, *Current Medicinal Chemistry*, 24, 1228-1237.
[333]Scheller, J, Garbers, C, Rose-John, S, Interleukin-6: From basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities, 2014, *Seminars in Immunology*, 26, 2-12.
[334]Huang, C, Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MIMETIBODY technology, 2009, *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 692-699.
[335]Jazayeri, JA, Carroll, GJ, Fc-based cytokines: prospects for engineering superior therapeutics, 2008, *BioDrugs*, 22, 11-26.
[336]Czajkowsky, DM, Hu, J, Shao, Z, Pleass, RJ, Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives, 2012, *EMBO Molecular Medicine*, 4, 1015-1028.
[337]Carter, PJ, Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective, 2011, *Experimental Cell Research*, 317, 1261-1269.
[338]Kaiga, T, Sato, M, Kaneda, H, Iwakura, Y, Takayama, T, Tahara, H, Systemic administration of IL-23 induces potent antitumor immunity primarily mediated through Th1-type response in association with the endogenously expressed IL-12, 2007, *Journal of Immunology*, 178, 7571-7580.
[339]Ellenbroek, B, Youn, J, Rodent models in neuroscience research: is it a rat race?, 2016, *Disease Models & Mechanisms*, 9, 1079-1087.
[340]Iranpour, R, Mohammadizadeh, M, Nazem-Sadati, SS, Comparison of two phototherapy methods (prophylactic vs therapeutic) for management of hyperbilirubinemia in very low birth weight newborns, 2011, *Iranian Journal of Pediatrics*, 21, 425-430.
[341]Broughton, SE, Hercus, TR, Lopez, AF, Parker, MW, Cytokine receptor activation at the cell surface, 2012, *Current Opinion in Structural Biology*, 22, 350-359.
[342]Baldo, BA, Side effects of cytokines approved for therapy, 2014, *Drug Safety*, 37, 921-943.
[343]Efimov, GA, Kruglov, AA, Khlopchatnikova, ZV, Rozov, FN, Mokhonov, VV, Rose-John, S, Scheller, J, Gordon, S, Stacey, M, Drutskaya, MS, Tillib, SV, Nedospasov, SA, Cell-type-restricted anti-cytokine therapy: TNF inhibition from one pathogenic source, 2016, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 3006-3011.
[344]Okabe, M, Ikawa, M, Kominami, K, Nakanishi, T, Nishimune, Y, 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells, 1997, *FEBS Letters*, 407, 313-319.
[345]Fink, D, Wohrer, S, Pfeffer, M, Tombe, T, Ong, CJ, Sorensen, PHB, Ubiquitous expression of the monomeric red fluorescent protein mcherry in transgenic mice, 2010, *Genesis*, 48, 723-729.
[346]Fang, J, Qian, JJ, Yi, S, Harding, TC, Tu, GH, VanRoey, M, Jooss, K, Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide, 2005, *Nature Biotechnology*, 23, 584-590.
[347]Noh, SM, Sathyamurthy, M, Lee, GM, Development of recombinant Chinese hamster ovary cell lines for therapeutic protein production, 2013, *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2, 391-397.
[348]Schornack, S, Fuchs, R, Huitema, E, Rothbauer, U, Lipka, V, Kamoun, S, Protein mislocalization in plant cells using a GFP-binding chromobody, 2009, *Plant Journal*, 60, 744-754.

[349]Kim, AR, Ulirsch, JC, Wilmes, S, Unal, E, Moraga, I, Karakukcu, M, Yuan, D, Kazerounian, S, Abdulhay, NJ, King, DS, Gupta, N, Gabriel, SB, Lander, ES, Patiroglu, T, Ozcan, A, Ozdemir, MA, Garcia, KC, Piehler, J, Gazda, HT, Klein, DE, Sankaran, VG, Functional selectivity in cytokine signaling revealed through a pathogenic EPO mutation, 2017, *Cell*, 168, 1053-1064.e1015.
[350]Li, J, Zhang, L, Zhang, J, Wei, Y, Li, K, Huang, L, Zhang, S, Gao, B, Wang, X, Lin, P, Interleukin 23 regulates proliferation of lung cancer cells in a concentration-dependent way in association with the interleukin-23 receptor, 2013, *Carcinogenesis*, 34, 658-666.
[351]Petermann, F, Rothhammer, V, Claussen, MC, Haas, JD, Blanco, LR, Heink, S, Prinz, I, Hemmer, B, Kuchroo, VK, Oukka, M, Korn, T, Gammadelta T cells enhance autoimmunity by restraining regulatory T cell responses via an interleukin-23-dependent mechanism, 2010, *Immunity*, 33, 351-363.
[352]Zhang, M, Cai, ZR, Zhang, B, Cai, X, Li, W, Guo, Z, Ma, L, Functional polymorphisms in interleukin-23 receptor and susceptibility to coronary artery disease, 2014, *DNA and Cell Biology*, 33, 891-897.
[353]Yin, T, Taga, T, Tsang, ML, Yasukawa, K, Kishimoto, T, Yang, YC, Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11-mediated signal transduction, 1993, *Journal of Immunology*, 151, 2555-2561.
[354]Murakami, M, Hibi, M, Nakagawa, N, Nakagawa, T, Yasukawa, K, Yamanishi, K, Taga, T, Kishimoto, T, IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase, 1993, *Science*, 260, 1808-1810.
[355]Nandurkar, HH, Hilton, DJ, Nathan, P, Willson, T, Nicola, N, Begley, CG, The human IL-11 receptor requires gp130 for signalling: demonstration by molecular cloning of the receptor, 1996, *Oncogene*, 12, 585-593.
[356]Lokau, J, Garbers, C, The length of the interleukin-11 receptor stalk determines its capacity for classic signaling, 2018, *Journal of Biological Chemistry*, 293, 6398-6409.
[357]Bromberg, J, STAT proteins and oncogenesis, 2002, *Journal of Clinical Investigation*, 109, 1139-1142.
[358]Liu, F, Song, Y, Liu, D, Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA, 1999, *Gene Therapy*, 6, 1258-1266.
[359]Zhang, G, Budker, V, Wolff, JA, High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA, 1999, *Human Gene Therapy*, 10, 1735-1737.
[360]Vire, B, David, A, Wiestner, A, TOSO, the Fcmicro receptor, is highly expressed on chronic lymphocytic leukemia B cells, internalizes upon IgM binding, shuttles to the lysosome, and is downregulated in response to TLR activation, 2011, *Journal of Immunology*, 187, 4040-4050.
[361]Heinrich, PC, Behrmann, I, Muller-Newen, G, Schaper, F, Graeve, L, Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway, 1998, *Biochemical Journal*, 334 (Pt 2), 297-314.
[362]Thiel, S, Dahmen, H, Martens, A, Müller-Newen, G, Schaper, F, Heinrich, PC, Graeve, L, Constitutive internalization and association with adaptor protein-2 of the interleukin-6 signal transducer gp130, 1998, *FEBS Letters*, 441, 231-234.
[363]Thiel, S, Behrmann, I, Dittrich, E, Muys, L, Tavernier, J, Wijdenes, J, Heinrich, PC, Graeve, L, Internalization of the interleukin 6 signal transducer gp130 does not require activation of the Jak/STAT pathway, 1998, *Biochemical Journal*, 330, 47-54.

[364]Schobitz, B, Pezeshki, G, Pohl, T, Hemmann, U, Heinrich, PC, Holsboer, F, Reul, JM, Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor augments central effects of IL-6 in vivo, 1995, *FASEB Journal*, 9, 659-664.
[365]Kelly, JD, Haldeman, BA, Grant, FJ, Murray, MJ, Seifert, RA, Bowen-Pope, DF, Cooper, JA, Kazlauskas, A, Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit trans-phosphorylation, 1991, *Journal of Biological Chemistry*, 266, 8987-8992.
[366]Lai, C-C, Henningson, C, DiMaio, D, Bovine papillomavirus E5 protein induces oligomerization and trans-phosphorylation of the platelet-derived growth factor β receptor, 1998, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 15241-15246.
[367]Li, Z, Mei, Y, Liu, X, Zhou, M, Neuregulin-1 only induces trans-phosphorylation between ErbB receptor heterodimer partners, 2007, *Cell Signal*, 19, 466-471.
[368]Luwor, RB, Zhu, HJ, Walker, F, Vitali, AA, Perera, RM, Burgess, AW, Scott, AM, Johns, TG, The tumor-specific de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes cells survival and heterodimerizes with the wild-type EGFR, 2004, *Oncogene*, 23, 6095-6104.
[369]Qian, X, Dougall, WC, Fei, Z, Greene, MI, Intermolecular association and trans-phosphorylation of different neu-kinase forms permit SH2-dependent signaling and oncogenic transformation, 1995, *Oncogene*, 10, 211-219.
[370]Pawson, T, Protein modules and signalling networks, 1995, *Nature*, 373, 573-580.
[371]Yamanaka, Y, Nakajima, K, Fukada, T, Hibi, M, Hirano, T, Differentiation and growth arrest signals are generated through the cytoplasmic region of gp130 that is essential for Stat3 activation, 1996, *The EMBO Journal*, 15, 1557-1565.
[372]Velazquez, L, Mogensen, KE, Barbieri, G, Fellous, M, Uze, G, Pellegrini, S, Distinct domains of the protein tyrosine kinase tyk2 required for binding of interferon-alpha/beta and for signal transduction, 1995, *Journal of Biological Chemistry*, 270, 3327-3334.
[373]Richter, MF, Dumenil, G, Uze, G, Fellous, M, Pellegrini, S, Specific contribution of TYK2 JH regions to the binding and the expression of the interferon alpha/beta receptor component IFNAR1, 1998, *Journal of Biological Chemistry*, 273, 24723-24729.
[374]Li, Z, Gakovic, M, Ragimbeau, J, Eloranta, ML, Ronnblom, L, Michel, F, Pellegrini, S, Two rare disease-associated TYK2 variants are catalytically impaired but signaling competent, 2013, *Journal of Immunology*, 190, 2335-2344.
[375]Murray, PJ, The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration, 2007, *Journal of Immunology*, 178, 2623-2629.
[376]Wang, X, Lupardus, P, Laporte, SL, Garcia, KC, Structural biology of shared cytokine receptors, 2009, *Annual Review of Immunology*, 27, 29-60.
[377]Miliotou, NA, Papadopoulou, CL, CAR T-cell therapy: a new era in cancer immunotherapy, 2018, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 19, 5-18.
[378]Zhang, C, Liu, J, Zhong, JF, Zhang, X, Engineering CAR-T cells, 2017, *Biomarker research*, 5, 22-22.
[379]Lee, DW, Gardner, R, Porter, DL, Louis, CU, Ahmed, N, Jensen, M, Grupp, SA, Mackall, CL, Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome, 2014, *Blood*, 124, 188-195.
[380]Richards, RM, Sotillo, E, Majzner, RG, CAR T cell therapy for neuroblastoma, 2018, *Frontiers in Immunology*, 9, 2380-2380.

[381]Wirtz, S, Billmeier, U, McHedlidze, T, Blumberg, RS, Neurath, MF, Interleukin-35 mediates mucosal immune responses that protect against T-cell-dependent colitis, 2011, *Gastroenterology*, 141, 1875-1886.
[382]Fischer, M, Goldschmitt, J, Peschel, C, Brakenhoff, JP, Kallen, KJ, Wollmer, A, Grotzinger, J, Rose-John, S, I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion, 1997, *Nature Biotechnology*, 15, 142-145.
[383]Koch, M, May, U, Kuhns, S, Drechsler, H, Adam, N, Hattermann, K, Wirtz, S, Rose-John, S, Scheller, J, Interleukin 27 induces differentiation of neural C6-precursor cells into astrocytes, 2007, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364, 483-487.
[384]Lieschke, GJ, Rao, PK, Gately, MK, Mulligan, RC, Bioactive murine and human interleukin-12 fusion proteins which retain antitumor activity in vivo, 1997, *Nature Biotechnology*, 15, 35-40.
[385]Owaki, T, Asakawa, M, Morishima, N, Mizoguchi, I, Fukai, F, Takeda, K, Mizuguchi, J, Yoshimoto, T, STAT3 is indispensable to IL-27-mediated cell proliferation but not to IL-27-induced Th1 differentiation and suppression of proinflammatory cytokine production, 2008, *Journal of Immunology*, 180, 2903-2911.
[386]Costa-Pereira, AP, Tininini, S, Strobl, B, Alonzi, T, Schlaak, JF, Is'harc, H, Gesualdo, I, Newman, SJ, Kerr, IM, Poli, V, Mutational switch of an IL-6 response to an interferon-γ-like response, 2002, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 8043-8047.
[387]Wang, X, Liu, X, Zhang, Y, Wang, Z, Zhu, G, Han, G, Chen, G, Hou, C, Wang, T, Ma, N, Shen, B, Li, Y, Xiao, H, Wang, R, Interleukin (IL)-39 [IL-23p19/Epstein-Barr virus-induced 3 (Ebi3)] induces differentiation/expansion of neutrophils in lupus-prone mice, 2016, *Clinical and Experimental Immunology*, 186, 144-156.
[388]Ramnath, D, Tunny, K, Hohenhaus, DM, Pitts, CM, Bergot, AS, Hogarth, PM, Hamilton, JA, Kapetanovic, R, Sturm, RA, Scholz, GM, Sweet, MJ, TLR3 drives IRF6-dependent IL-23p19 expression and p19/EBI3 heterodimer formation in keratinocytes, 2015, *Immunology & Cell Biology*, 93, 771-779.
[389]Flores, RR, Kim, E, Zhou, L, Yang, C, Zhao, J, Gambotto, A, Robbins, PD, IL-Y, a synthetic member of the IL-12 cytokine family, suppresses the development of type 1 diabetes in NOD mice, 2015, *European Journal of Immunology*, 45, 3114-3125.

11. Lebenslauf

Persönliches

Name	**Erika Engelowski**
Geburtsdatum	06. Januar 1990
Geburtsort	Borowski (Russland)
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

Studium und Ausbildung

01/2016 – 12/2018 **Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf**

Promotion im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II

- Promotionsbetreuer: Prof. Dr. Jürgen Scheller
- Thema: Design synthetischer Zytokinrezeptoren für Interleukin-6- und Interleukin-23-artige Zytokine und Analyse der Rolle von Interleukin-23 in kardialer Ischämie

10/2013 – 12/2015 **Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf**

Masterstudiengang Biochemie

- Betreuer: Prof. Dr. Jürgen Scheller
- Thema: Charakterisierung von Interleukin 23 in kardialer Ischämie

10/2010 – 08/2013 **Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf**

Bachelorstudiengang Biochemie

- Betreuer: Prof. Dr. Jürgen Scheller
- Thema: Untersuchung des Einflusses des Interleukin-6 Rezeptors auf den Verlauf einer akuten DSS Colitis

Publikationsliste

Engelowski, E, Fazel Modares, N, Gorressen, S, Bouvain, P, Semmler, D, Alter, C, Ding, Z, Flögel, U, Schrader, J, Xu, H, Lang, PA, Fischer, J, Floss, DM, Scheller, J, IL-23R signaling plays no role in myocardial infarction, 2018, *Scientific Reports*, 8, 17078.

Engelowski, E, Schneider, A, Franke, M, Xu, H, Clemen, R, Lang, A, Baran, P, Binsch, C, Knebel, B, Al-Hasani, H, Moll, JM, Floß, DM, Lang, PA, Scheller, J, Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands, 2018, *Nature Communications*, 9, 2034.

Floss, DM, Schönberg, M, Franke, M, Horstmeier, FC, **Engelowski, E**, Schneider, A, Rosenfeldt, EM, Scheller, J, IL-6/IL-12 Cytokine Receptor Shuffling of Extra- and Intracellular Domains Reveals Canonical STAT Activation via Synthetic IL-35 and IL-39 Signaling, 2017, *Scientific Reports*, 7, 15172.

Sommer, J, **Engelowski, E**, Baran, P, Garbers, C, Floss, DM, Scheller, J, Interleukin-6, but not the interleukin-6 receptor plays a role in recovery from dextran sodium sulfate-induced colitis, 2014, *International Journal of Molecular Medicine*, 34, 651-660.

Patente

European Patent (Application Number: EP18166111.1): “Synthetic signalling constructs and its use”, registriert am 06 April 2018

Auszeichnungen

Sidney & Joan Pestka Graduate Award (International Cytokine & Interferon Society)

Präsentationen

10/2018	International Cytokine and Interferon Society (ICIS), **Vortrag**
03/2018	Heinrich-Heine-University, SFB 1116 “CAVAD 2018”, **Poster-Präsentation**
11/2016	Heinrich-Heine-University, SFB 1116 Symposium “Master Switches in Cardiac Ischemia”, **Poster-Präsentation**
04/2016	Heinrich-Heine-University, SFB 1116 Symposium “Methods in Cardiovascular Research”, **Vortrag**

Sonstiges

Ehrenamtliche Tätigkeit	Unterricht für Kinder und Jugendliche in Zusammenarbeit mit der Diakonie in Ratingen-West
Zusatzqualifikation	Sachkenntnis nach § 5 der Chemikalien-Verbotsverordnung Fachkenntnis nach § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes Versuchstierkunde-Aufbaukurs (FELASA-C-Richtlinien)

12. Danksagung

Als Erstes möchte ich mich vom ganzen Herzen bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II bedanken. Insbesondere gilt mein Dank für die ausgezeichnete Betreuung, seine außerordentliche Unterstützung, die konstruktiven Gespräche und Diskussionen, sowie das entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Flögel möchte ich für die Übernahme des Korreferats danken und für die Unterstützung bei den MRI-Messungen und -Analysen.

Bedanken möchte ich mich zudem bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung der Promotion im Rahmen der Förderung des Sonderforschungsbereichs 1116.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Doreen M. Floss und Dr. Manuel Franke, die durch ihr Engagement und Fachwissen einen großen Beitrag zum Gelingen diese Arbeit geleistet haben. Danke für die konstruktiven Gespräche und die tolle Zusammenarbeit.

Ein großer Dank gilt Artur Schneider für seine großartige Mitwirkung am SyCyR-Projekt, während seiner medizinischen Doktorarbeit. Was er in seiner kurzen Zeit für das Projekt geleistet hat liegt weit über all dem, was man von einem medizinischen Doktoranden erwarten darf. Sein Fachwissen und seine Kompetenz beeindruckten mich immer wieder aufs Neue.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Kooperationspartnern bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, darunter Dr. Simone Gorressen und Dominik Semmler für die konstruktiven Diskussionen, die Hilfestellung bei diversen Fragen und Einarbeitung in das Ischämie/Reperfusionsmodell und Echokardiographie, Herrn Dr. Zhaoping Ding für die Durchführung der Ischämie am offenen Thorax, Herrn Pascal Bouvin für die MRI-Messungen und -Analysen sowie Herrn Dr. Haifeng Xu für die Durchführung der hydrodynamischen Injektion an Mäusen im Rahmen des SyCyR-Projekts und die Hilfsbereitschaft.

Ebenfalls ein riesiger Dank geht an Herrn Prof. Dr. Philipp A. Lang für die Unterstützung, den fachlichen Austausch, seine großartigen Ideen und sein stetiges Glaube an dem Erfolg des SyCyR-Projekts.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich außerdem beim gesamten Institut für Biochemie und Molekularbiologie II. Danke für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre und die tollen Erlebnisse, die ich mit euch teilen durfte! Ein großes Dankeschön an Larissa Lamertz, Paul Baran, Nastaran Fazel Modares, Robin Polz und Sofie Moßner. Es hat sehr viel Spaß gemacht, mit euch zu arbeiten und danke dafür, dass ihr mich oft zum Lachen gebracht habt. Ein weiterer Dank geht an PhD Jens Moll, Dr. Alexander Lang, Marcus Kuchner, Oliver Krumbach, Mohammad Akbarzadeh, Marcel Buchholzer und Laura Bergmann für die gute Zusammenarbeit. Einen herzlichen Dank vor allem an Petra Oprée-Jemeric für ihre umwerfende Art und Weise im Umgang mit allen Arbeitskollegen. Ich habe dich sehr in mein Herz geschlossen!

Darüber hinaus geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. Reza Ahmadian und Herrn Dr. Roland Piekorz für die konstruktiven Gespräche, Unterstützung beim Gelingen der Promotion und das offene Ohr für arbeitsbezogene Themen.

Abschließend geht mein ganz besonderer Dank an meine Familie, die mich bei der Promotion unterstützt hat und in allen Lebenssituationen zur Seite stand.

13. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass die hier vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmitteln und Quellen unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ verfasst wurde. Alle Zitate sind gemäß § 6 Abs. 7 MAPO kenntlich gemacht. Diese Dissertation wurde in der hier vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Bisher wurden von mir keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, Dezember 2018

_____

Erika Engelowski