

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

Leiter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller

Funktionelle Charakterisierung der IL-23 Rezeptor *stalk* Region

Dissertation

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

vorgelegt von
Theresa ACKFELD
(2020)

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller

Zweitgutachter: Prof. Dr. Stork

"This is water, this is water."

David Foster Wallace (1962-2008)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht unter dem Titel:

Synthetic Deletion of the Interleukin 23 Receptor (IL-23R) Stalk Region Led to Autonomous IL-23R Homodimerization and Activation.

Hummel TM, Ackfeld T, Schönberg M, Ciupka G, Schulz F, Oberdoerster A, Grötzinger J, Scheller J, Floss DM. (Mol Cell Biol. 2017 Aug 11;37(17). pii: e00014-17. doi: 10.1128/MCB.00014-17. Print 2017 Sep 1.)

Human and Murine Interleukin 23 Receptors Are Novel Substrates for A Disintegrin and Metalloproteases ADAM10 and ADAM17.

Franke M, Schröder J, Monhasery N, Ackfeld T, Hummel TM, Rabe B, Garbers C, Becker-Pauly C, Floss DM, Scheller J. (J Biol Chem. 2016 May 13;291(20):10551-61. doi: 10.1074/jbc.M115.710541. Epub 2016 Mar 9.)

Inhalte dieser Arbeit wurden auf dem Symposium der Medical Research School der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2016 vorgestellt.

Zusammenfassung

Das Immunsystem reagiert auf intrinsische und extrinsische Stimulation durch Aktivierung spezifischer Effektorzellen einschließlich lymphoider T- und B-Zellen. Um die Kommunikation zwischen den Effektorzellen sicherzustellen, dienen Zytokine, Interferone und Chemokine als Botenstoffe. Das proinflammatorische Zytokin Interleukin 23 (IL-23) ist ein Mitglied der IL-12-Familie von Zytokinen, die durch eine heterodimere Struktur von Zytokinen und Rezeptoren gekennzeichnet ist. IL-23 besteht aus der β -Untereinheit p40, die auch von IL-12 zur Bildung seines heterodimeren Komplexes verwendet wird und der α -Untereinheit p19. Über Disulfidbrücken verbunden bilden beide Untereinheiten das immunologisch wirksame Zytokin IL-23. Antigen-präsentierende Zellen setzen das IL-23 Zytokin frei und es bindet anschließend seinen heterodimeren Rezeptorkomplex. Dieser Rezeptorkomplex wird durch die Rezeptorketten IL-12R β 1 und IL-23-Rezeptor (IL-23R) gebildet. IL-23 ist an der Regulation von T-Helferzellen beteiligt. Studien zeigten, dass IL-23 und sein Rezeptor an der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten wie Morbus Crohn, rheumatoider Arthritis und Multipler Sklerose (MS) beteiligt sind. Die Charakterisierung des IL-23-Rezeptorkomplexes bietet eine vielversprechende Basis für die Entwicklung von Therapiestrategien gegen diese Autoimmunkrankheiten.

Ein Schlüsselaspekt der vorgestellten Arbeit ist die Charakterisierung der IL-23R *stalk* Region. Der IL-23R besteht aus einer N-terminalen immunoglobulinähnlichen Domäne, zwei Fibronectin-ähnlichen Domänen, gefolgt von einer 37 Aminosäuren langen humanen bzw. einer 36 Aminosäuren langen murinen *stalk* Region, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne. Deletionsvarianten von murinen und humanen IL-23R wurden kloniert, in Ba/F3-Zellen transduziert und die biologische Aktivität anschließend untersucht. Die biologische Aktivität wurde durch Quantifizierung der Proliferationskapazität von transduzierten Ba/F3-Zellen sowie durch Nachweis der intrazellulären Aktivierung des Jak/STAT-Signalwegs gemessen.

Geringe Deletionen des murinen, allerdings nicht des humanen IL-23R *stalk*, führten zu einer Unempfindlichkeit des Rezeptors gegenüber IL-23. Eine uneingeschränkte Signaltransduktion des murinen Rezeptors erforderte eine minimale *stalk*-Länge von 26 Aminosäuren (AS).

Die vollständige Deletion des humanen IL-23R *stalk* sowie die erweiterte Deletion des murinen *stalks*, einschließlich der 20 AS-langen Duplikation in der Zytokinbindungsdomäne 3, führten zu einer Liganden-unabhängigen, autonomen Rezeptoraktivierung. Diese Rezeptoraktivierung wurde durch STAT3-Phosphorylierung vermittelt und die Zellproliferation konnte nachgewiesen werden. Die Zytokinbindung wurde jedoch durch die Deletion der Rezeptor-*stalk*-Region nicht beeinflusst, wie anhand von Co-Immunopräzipitationsstudien gezeigt wurde. Die Zytokin-unabhängige Autoaktivierung der Zellen wurde vermutlich durch IL-23R Homodimere vermittelt und ist IL-12R β 1-unabhängig. Die Homodimerisierung wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht, sondern diente als Grundlage weiterer Untersuchungen.

Summary

The immune system responds to intrinsic and extrinsic stimulation by activating specific effector cells including lymphoid T and B cells. In order to ensure communication between the effector cells, cytokines, interferons and chemokines serve as messengers. The proinflammatory cytokine interleukin 23 (IL-23) is a member of the IL-12 family of cytokines, which is characterized by a heterodimeric structure of cytokines and receptors. IL-23 consists of the β subunit p40 which is also used by IL-12 to form its heterodimeric complex, and the α subunit p19. Connected via disulfide bridges, both subunits form the immunologically effective cytokine IL-23. Antigen-presenting cells release the IL-23 cytokine and it subsequently binds its heterodimeric receptor complex. This receptor complex is formed by the β -receptor chains IL-12R β 1 and IL-23 receptor (IL-23R). IL-23 is involved in the regulation of T helper cells and is thus involved in the development of autoimmune diseases such as Crohn's Disease, Rheumatoid Arthritis and Multiple Sclerosis (MS). The characterization of the IL-23 receptor complex offers a promising basis in the development of therapeutic strategies against these autoimmune diseases.

Key aspect of the presented study is the characterization of the IL-23R-*stalk* region. The IL-23R consists of an N-terminal immunoglobulin-like domain, two fibronectin-like domains, followed by a 37 amino acid long human or a 36 amino acid long murine *stalk* region, a transmembrane domain and an intracellular domain. Deletion variants of both murine and human IL-23R were cloned, transduced into Ba/F3 cells, and biological activity was examined. Biological activity of IL-23R was assessed by quantifying the proliferation capacity of transduced Ba/F3 cells, as well as demonstrating intracellular activation of The Jak/STAT pathway.

Minor deletions of the murine but not the human IL-23R *stalk* caused unresponsiveness of the receptor to its cytokine. Unrestricted signal transduction of the murine receptor requires a minimal stalk length of 26 amino acids. Complete deletion of the human IL-23R *stalk*, as well as the extended deletion of the murine *stalk*, including the 20 amino acid long duplication in the cytokine-binding domain 3, led to a ligand independent, autonomous receptor activation. This receptor activation was mediated by STAT3 phosphorylation and cell proliferation could be detected. However, cytokine binding was unaffected by deletion of the receptor *stalk* region as demonstrated by co-immunoprecipitation studies. The cytokine independent autoactivation of the cells was presumably mediated by IL-23R homodimers and was IL-12R β 1-independent. The IL-23R homodimerization was not further investigated in this work but was the basis of further investigations.

Abkürzungsverzeichnis

AK Antikörper	IP Immunopräzipitation
APC Antigenpräsentierende Zellen	JAK Januskinase
AS Aminosäure	MAPK Mitogen-Activated Protein Kinase
BCA Bicichoninsäure	mIL-23R WT mIL-23R Wildtyp
CBD <i>Cytokine Binding Domain</i>	MS Multiple Sklerose
CBM <i>Cytokine Binding Module</i>	NKZ Natürliche Killer Zellen
CIA Collagen-Induced Arthritis	PAGE Polyacrylamidgelelektrophorese
DC Dendritic Cells	PBS <i>Phosphate-Buffered-Saline</i>
DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium	PCR Polymerasekettenreaktion
dNTP Desoxynukleosid-Triphosphat	PI3K Phosphoinositid-3-Kinase
EBI3 Epstein-Barr-Virus-Induced-Gene 3	PP Proteinpräzipitation
EDTA Ethylendiamintetraacetat	pSTAT <i>phosphorylierte Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
FCS fetales Kälberserum	RNase Ribonuklease
GATA-3 Glutamyl Aminotransferase- Untereinheit A-3	rpm <i>rounds per minute</i>
GWAS Genome-Wide Association Studies	RT Raumtemperatur
h Stunden	SDS <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
HIL-23 Hyper-IL-23	SH2 <i>Scr homology 2</i>
HIL-6 Hyper-IL-6	SNP Single nucleotide polymorphism
IFN Interferon	SOCS <i>Suppressor of Cytokine Signaling</i>
IL-12 Interleukin-12	SOE-PCR <i>Splicing by Overlap Extension Polymerase Chain Reaction</i>
IL-12R β 1 Interleukin 12 Rezeptor beta 1	STAT <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
IL-1ra Interleukin-1 Rezeptor Antagonist	TBS-T <i>Tris Buffered Saline with Tween20</i>
IL-23 Interleukin-23	T _{fh} folliculäre T-Helferzellen
IL-23R Interleukin-23 Rezeptor	
IL-6R IL-6 Rezeptor	
IL Interleukin	

TGF- β *Transforming Growth Factor- β*

T_H-Zellen T-Helferzellen

TNF Tumornekrosefaktor

T_{reg} regulatorische T Helferzellen

TYK 2 Tyrosinkinase 2

UE Untereinheiten

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Zytokine - Mediatoren des Immunsystems	1
1.2	Die Zytokine der IL-12 Familie	2
1.3	Der IL-23 Rezeptorkomplex	6
1.4	Die IL-23 vermittelte Signaltransduktion	8
1.5	Die Bedeutung von IL-23 im Immunsystem	11
1.6	Ziele der Arbeit.....	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Material	16
2.1.1	<i>Zellen</i>	16
2.1.2	<i>Chemikalien, Reagenzien und Kits</i>	17
2.1.3	<i>Puffer und Lösungen</i>	21
2.1.4	<i>Medien und Antibiotika</i>	24
2.1.5	<i>Zytokine</i>	25
2.1.6	<i>Antikörper (AK)</i>	25
2.1.7	<i>Oligonukleotid-Primer</i>	27
2.1.8	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	28
2.1.9	<i>Geräte</i>	29
2.1.10	<i>Plasmide</i>	31
2.1.11	<i>Softwares und Datenbanken</i>	32
2.2	Methoden	32
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	32
2.2.2	Zellbiologische Methoden	39
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	43
3	Ergebnisse.....	47

3.1	Die Deletion des murinen IL-23R <i>stalks</i> führt zu einer Zytokin-unabhängigen Aktivierung des Rezeptors.....	47
3.1.1	Generierung stabiler muriner Ba/F3-gp130 Zelllinien	47
3.1.2	Nachweis der biologischen Aktivität der generierten murinen Ba/F3-gp130-IL-23R-Deletionsvarianten	51
3.2	Die ligandenunabhängige, autonome IL-23R Aktivierung ist unabhängig von dem murinen IL-12R β 1	55
3.2.1	Erzeugung stabiler muriner Ba/F3-gp130-mIL-23R-Zelllinien.....	55
3.2.2	Analyse der biologischen Aktivität der Co-Rezeptor defizienten Ba/F3-gp130-mIL-23R Zellen	56
3.3	Die Deletionen innerhalb des murinen IL-23R <i>stalk</i> nehmen keinen Einfluss auf das Zytokinbindungsverhalten	59
3.4	Die Deletion des humanen IL-23R <i>stalks</i> führt zu einer Zytokin-unabhängigen IL-23R-Aktivierung.....	61
3.4.1	Klonierung der Expressionsvektoren verschiedener IL-23R-Varianten ..	61
3.4.2	Expression der humanen IL-23-Rezeptorvarianten in COS-7-Zellen	68
3.4.3	Generierung stabiler Ba/F3-Zelllinien mit verschiedenen humanen IL-23R <i>stalk</i> und WT Varianten	69
3.4.4	Analyse der biologischen Aktivität der humanen Rezeptorvarianten auf transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen	75
3.4.5	Analyse der biologischen Aktivität von Ba/F3-gp130-hIL-23R-Zellen ohne Co-Rezeptor IL-12R β 1	80
3.5	Untersuchung von murin-humanen Expressionsvarianten	83
4	Diskussion	86
4.1	Warum sollte der IL-23R analysiert werden?	86
4.2	Inwiefern beeinflusst die Länge des <i>stalk</i> die biologische Aktivität?	87
4.3	Beeinflusst die Länge des <i>stalk</i> die Oberflächenexpression?	90
4.4	Beeinflusst die Duplikatur die biologische Aktivität?	90
4.5	Ist ausschließlich der <i>stalk</i> für die Ergebnisse verantwortlich?	92

4.6	Prolin gegen Leucin- beeinflusst der SNP die Rezeptorfunktion?	93
4.7	IL-12R β 1 – Welche Rolle spielt der Co-Rezeptor bei der autonomen Rezeptoraktivierung?.....	94
4.8	Welche Relevanz haben die Ergebnisse dieser Forschung für die Klinik?	96
5	Schlussfolgerungen	99
6	Abbildungsverzeichnis	100
7	Tabellenverzeichnis	102
8	Literatur- und Quellenverzeichnis	103
9	Anhang	114

1 Einleitung

1.1 Zytokine - Mediatoren des Immunsystems

Zytokine sind interzelluläre Signalmoleküle, die eine Vielzahl biologisch relevanter Antworten in spezifischen Zielzellen induzieren. Sie nehmen eine zentrale Rolle bei der Kommunikation, der Differenzierung und der Proliferation von Zellen ein und sind als Botenstoffe an vielen Immunprozessen beteiligt. Dabei können sie pro- oder antiinflammatorische Funktionen übernehmen. Die Art der Immunantwort determiniert welche Zytokine produziert werden und ob die Antwort zytotoxisch, humoral, zellvermittelt oder allergisch ist (1). Zytokine unterteilen sich in die folgenden vier Gruppen: Interferone (IFN), Interleukine (IL), Wachstumsfaktoren und Chemokine.

Zu den von Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) ausgeschütteten Zytokinen zählen der Tumornekrosefaktor (TNF) und eine Vielzahl von Interleukinen (IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, IL-27, IL-32) (1). Die APCs reagieren auf Pathogene und vermitteln über ihre Zytokinausschüttung eine Aktivierung des spezifischen Immunsystems. Zu den APCs zählen Zellen, die Pathogene prozessieren und deren Antigene den Zellen der spezifischen Immunabwehr, den sogenannten T Helferzellen, über MHC-II-Komplexe präsentieren. Welche Art der zellvermittelten Immunantwort ausgelöst wird, hängt dabei von den ausgeschütteten Zytokinen ab. Interleukine sind eine Zytokin-Gruppe immunmodulierender Proteine, die eine große Bandbreite an Zell- und Gewebsantworten induzieren. Diese Zellantwort generieren sie durch die hochaffine Bindung an ihre auf der Zelloberfläche der Zielzellen exprimierten Rezeptoren. Interleukine wirken parakrin oder autokrin auf ihre Zielzellen und induzieren spezifische Signalkaskaden. Sie beeinflussen somit Wachstum, Differenzierung und Aktivierung von immunologischen Prozessen. Eine Einteilung der Zytokine fällt aufgrund der überlappenden Funktionen und Eigenschaften schwer, kann aber anhand ihrer Wirkungsweise erfolgen (1).

Die zytotoxische Immunität, die sich vor allem gegen Virusinfektionen und neoplastische Zellen richtet, wird unter anderem durch IL-11 und Interferone vermittelt (1). Die T_H2-Zell-vermittelte humorale Immunität und damit die B-Zell Antikörper-Produktion, wird über die Interleukine IL-7, IL-11, IL-21 und Mitglieder der TNF-Familie induziert (1). Für die zelluläre, über T_H1- und T_H17-Zellen vermittelte Immunität wichtig sind eine Reihe von Interleukinen (IL-2, IL-16, IL-17, IL-34) sowie Interferon- γ (IFN- γ) (1).

Von den proinflammatorischen Zytokinen werden die entzündungshemmenden antiinflammatorischen Zytokine unterschieden. Zu ihnen zählen IL-1 Rezeptor

Antagonist (*IL-1ra*), Transforming Growth Factor- β (TGF- β) und Mitglieder der IL-10-Familie (1).

Zytokine werden anhand ihrer Kristallstruktur klassifiziert. Dabei wird zwischen Klasse I und Klasse II Proteinen unterschieden. Klasse I Zytokine teilen den gleichen strukturellen Aufbau, bestehend aus vier eng gepackten α -Helix-Bündeln, die in einer *up-up-down-down* Orientierung angelegt sind. Klasse II Zytokine sind hingegen in ähnlichen Bündel-Helices aufgebaut, enthalten aber 6 oder 7 gestapelte Helices (2). Interessanterweise wurde diese Topologie nur bei Mediator-Proteinen wie Interleukinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren gefunden (3). Die Klasse I Zytokine werden weiterhin in lang-Ketten- und kurz-Ketten-Zytokine unterteilt (4). Eine gesonderte Rolle nehmen das IL-17A und seine Homologen ein. Diese sind nicht mit den anderen Zytokinen verwandt und weisen strukturelle Unterschiede, wie die von Hymowitz und Mitarbeitern charakterisierte Cystein-Knoten-Faltung auf, die ein strukturelles Merkmal von eigenständigen Wachstumsfaktoren ist (5, 6).

Binden Zytokine an ihren Rezeptor, kommt es innerhalb der Zielzelle zu einer Aktivierung von spezifischen Signalkaskaden. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Aktivierung intrazellulärer Januskinasen (JAK), gefolgt von der Phosphorylierung der *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT). Dieser sogenannte JAK/STAT-Signalweg sorgt für eine unmittelbare Signalweiterleitung in den Nukleus (7).

Interleukine sind wichtige Mediatoren physiologischer Immunantworten, aber auch kritisch bei der Entstehung von immunassoziierten Erkrankungen, wie Krebs, Autoimmunerkrankungen, Neoplasien sowie akuten und chronischen Entzündungsreaktionen beteiligt (8). All dies macht Zytokine zu einem wichtigen Aspekt bei der Entwicklung von therapeutischen Ansätzen dieser Erkrankungen.

1.2 Die Zytokine der IL-12 Familie

Basierend auf ihren Sequenzhomologien, den Ähnlichkeiten der Rezeptorketten sowie funktionalen Eigenschaften werden Interleukine in verschiedene Gruppen eingeteilt, die zum Teil überlappende Mitglieder aufweisen (9, 10). Zu der IL-12 Familie gehören die pro- und antiinflammatorischen heterodimeren Zytokine IL-12, IL-23, IL-27, IL-35 und IL-39 (10, 11). Diese Familie ist hauptverantwortlich für die Entwicklung von T-Zellen und ist durch einen Austausch der Zytokin- und Zytokinrezeptor-Untereinheiten (UE) charakterisiert (12).

Im Gegensatz zu den Zytokinen der IL-6 Familie, die als Einzeluntereinheiten sezerniert werden, bilden die Mitglieder der IL-12 Familie heterodimere Komplexe, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit. Die α -Untereinheiten *p19*, *p28* und *p35* haben strukturell Homologien zu den IL-6 artigen Zytokinen. Diese vier α -Untereinheiten können innerhalb der IL-12 Familie an zwei verschiedene β -Untereinheiten binden, *p40* und *EBI3*, die strukturelle Gemeinsamkeiten mit löslichen Rezeptoren der IL-6 Familie haben (12, 13).

Der genaue Aufbau der Zytokine und Zytokin-Rezeptoren der IL-12-Familie ist Abbildung 1 zu entnehmen.

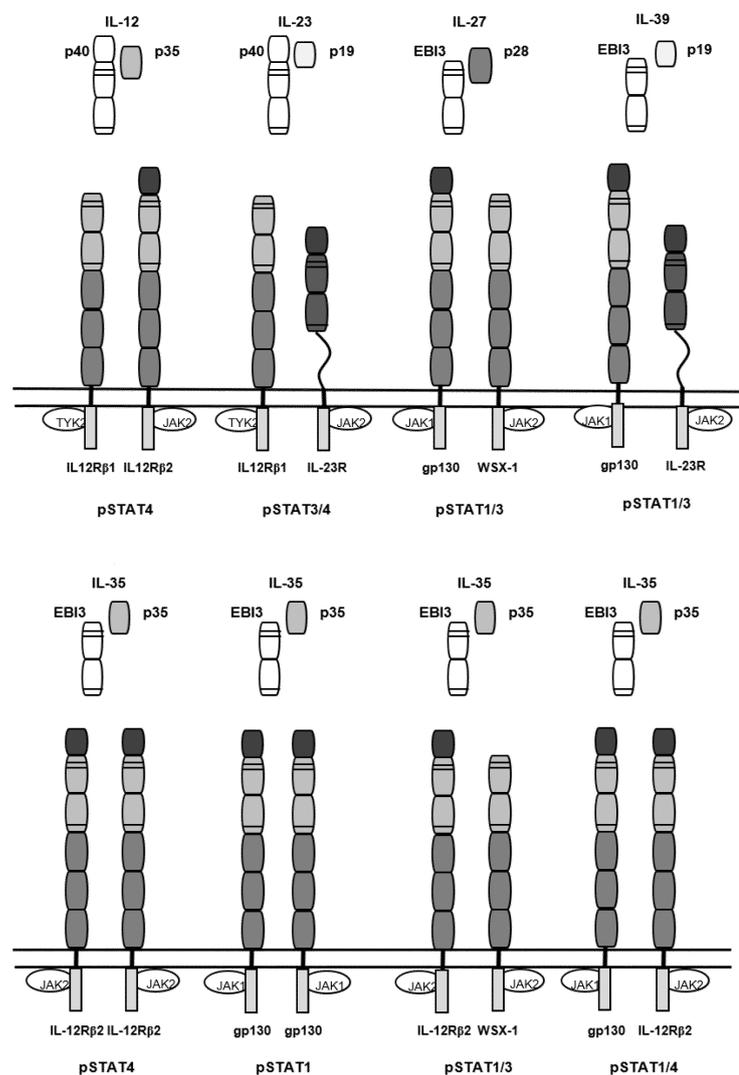


Abbildung 1: Die Zytokine der IL-12 Familie

Zu der IL-12 Familie zählen die heterodimeren Zytokine IL-12, IL-23, IL-27, IL-35 sowie IL-39. Die Zytokine bestehen jeweils aus einer α - und einer β -Untereinheit. IL-12 ist ein Heterodimer aus der *p35*-UE und der *p40*-UE. Nach Bindung von IL-12 an seinen Rezeptorkomplex, bestehend aus IL-12R β 1 und

IL-12R β 2 wird STAT4 aktiviert. IL-23 besteht aus den Untereinheiten *p19* sowie *p40* und wirkt über den Heterodimerkomplex aus IL-12R β 1/IL-23R hauptsächlich auf die Aktivierung von STAT3. IL-27, bestehend aus der *p28*-UE und *EBI3*, vermittelt die Signaltransduktion über den heterodimeren Rezeptorkomplex aus gp130 und WSX-1, wobei überwiegend STAT1 sowie STAT3 aktiviert werden. IL-39 besteht aus den Untereinheiten EBI3 und p19 und wirkt über einen gp130/IL-23R Komplex. Eine einzigartige Stellung innerhalb der IL-12 Familie nimmt IL-35 ein, welches sich aus den Untereinheiten *p35* und *EBI3* zusammensetzt und über vier verschiedene Rezeptorkombinationen wirken kann. Der IL-12R β 1 Homodimerkomplex induziert eine STAT4-Aktivierung. Der gp130 Homodimerkomplex aktiviert STAT1. Der IL-12R β 2/WSX-1 Heterodimerkomplex aktiviert STAT1 sowie STAT3. Der gp130/IL-12R β 2 Heterodimerkomplex aktiviert STAT1 sowie STAT4. Welche STAT Proteine aktiviert werden, hängt von dem bindenden Zytokin sowie dem Rezeptorkomplex ab. Der intrazelluläre Teil der Rezeptorkette ist mit den Januskinasen assoziiert und beeinflusst die Transkription verschiedener Zielgene über den Januskinase-Signal Transducers and Activators of Transcription-Signalweg (JAK/STAT-Signalweg) (10,11, 26).

Die Mitglieder der IL-12 Familie unterscheiden sich, trotz ihres ähnlichen Aufbaus, in ihrer Funktion innerhalb des Immunsystems. IL-12, IL-23 und IL-27 werden durch aktivierte Antigenpräsentierende Zellen wie Dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen ausgeschüttet (14). Die Zytokine können dabei unabhängig voneinander wirken oder synergistisch die T_H1 Zell-Antwort und die IFN- γ Produktion von T-Zellen induzieren (15).

Der Namensgeber der Familie, IL-12, ist ein Heterodimer, das aus den Untereinheiten *p35* und *p40* besteht (16). Dieses Zytokin wird durch IFN- γ -Stimulation ausgeschüttet, durch IL-4-Stimulation inhibiert und fördert die Differenzierung sowie Proliferation von T_H1 Zellen (17). IL-23 besteht ebenfalls als Heterodimer aus der IL-12 Untereinheit *p40* und der spezifischen *p19* Untereinheit (14). Ähnlich wie IL-12, kann es die Differenzierung und Proliferation von T_H1-Zellen induzieren, spielt aber vor allem in der Entwicklung und der Aufrechterhaltung von T_H17-Zellen eine übergeordnete Rolle (14, 18). 2006 konnten McKenzie und Mitarbeiter zeigen, dass die proinflammatorischen Funktionen von IL-23 hauptsächlich über die IL-17-produzierenden T_H17-Zellen vermittelt werden (19). Drei Jahre später bestätigten McGeachy und Mitarbeiter, dass der IL-23R essentiell für die endgültige Differenzierung der T_H17-Zellen ist (20). Neuere Studien von Gaffen und Mitarbeitern zeigten, dass IL-23 sowohl für die T_H-Zelldifferenzierung als auch für die inflammatorische Funktion der Zellen notwendig ist (21). IL-27 verknüpft die Zytokinfamilien IL-6 und IL-12 miteinander, indem es neben WSX-1 auch gp130 zur Signaltransduktion benötigt. IL-27 besteht aus den Untereinheiten *p28* und dem *Epstein-Barr-Virus-Induced-Gene 3 (EBI3)*. Die

Untereinheiten werden nach mikrobieller und inflammatorischer Stimulation durch APCs produziert (22). IL-27 ist ein frühes Zytokin der aktivierten APCs und führt zu einer schnellen klonalen Vermehrung von naiven CD4⁺ T-Zellen, nicht aber von CD4⁺ T-Gedächtniszellen (22). IL-27 übernimmt vor allem immunoregulatorische Aufgaben innerhalb der IL-12 Familie und ist damit weniger proinflammatorisch als etwa IL-12 bzw. IL-23 und wirkt innerhalb der Limitierung der Intensität und Dauer der adaptiven Immunantwort (23).

IL-35 wurde 2007 von Collison und Mitarbeitern beschrieben und besteht aus den Untereinheiten *EBI3* sowie der IL-12 α -Untereinheit *p35*. Das Zytokin ist in regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), nicht aber in ruhenden oder aktivierten T-Effektorzellen nachweisbar. IL-35 wird von T_{reg} produziert und fördert eine maximale suppressive Immunaktivität (24). Dieses Zytokin ist ebenfalls ein interfamiliäres Zytokin, das die IL-12 und IL-6 Zytokinfamilien miteinander verbindet (10).

Die Untereinheiten von IL-23 und IL-12 sind im Gegensatz zu IL-27 und IL-35 über Disulfidbrücken miteinander verbunden (16, 25, 26).

Auch die Rezeptoren der IL-12 Familie bilden einen Heterodimerkomplex (vgl. Abbildung 1). Der IL-12 Rezeptorkomplex besteht aus dem IL-12R β 1 und dem IL-12R β 2. Nach Zytokinbindung erfolgt die Heterodimerisierung der Rezeptorketten mit anschließender Signaltransduktion in den Kern (27). Da die Rezeptorketten wie viele Zytokinrezeptoren keine Kinaseaktivität besitzen, sind sie mit den zytoplasmatischen Januskinasen 1, 2, 3 oder der Tyrosinkinase 2 (TYK 2) assoziiert (28-30). Welche STAT-Proteine rekrutiert werden, hängt dabei von dem Zytokin und der angesprochenen Rezeptorkette ab. Die IL-23 vermittelte STAT4-Aktivierung ist im Vergleich zu den IL-12 abhängigen Signalwegen geringer ausgeprägt (30). IL-23 induziert als DNA-Bindungskomplex hauptsächlich STAT3 (31), wohingegen IL-12 überwiegend STAT4 induziert (30). IL-27 bindet an den in der IL-12 Familie einzigartigen IL-27 Rezeptor, WSX-1 und den IL-6-Co-Rezeptor gp130 (32). IL-35 induziert die Signaltransduktion seiner Zielzelle zum einen über den Heterodimerkomplex, bestehend aus gp130 und IL-12R β 2. IL-35 kann ebenfalls über eine Homodimerisierung des IL-12R β 2 oder des gp130 wirken (33). Zusätzlich kann die IL-35 abhängige Signaltransduktion über IL-12R β 2 und WSX-1 erfolgen (24, 33, 34). Das erst kürzlich identifizierte IL-39 besteht aus den Untereinheiten *EBI3* und *p19* und wirkt über einen gp130/IL-23R Komplex. Es wird von aktivierten B-Zellen produziert und hat proinflammatorische Funktionen (11).

11q1.3 kodiert (8 Exons und 7 Introns). Die humane cDNA von *p19* hat 70%ige strukturelle Übereinstimmung mit der cDNA von murinem *p19* und zeigt außerdem Ähnlichkeit mit der *p35* Untereinheit des IL-12 (25). Abbildung 2B stellt die AS-Sequenzen des murinen und humanen IL-23 Rezeptors gegenüber. Die *p40* Untereinheit besteht aus drei Domänen D1, D2, D3. Die D1 Domäne weist eine S-Typ-Immunglobulinfaltung auf und interagiert gemeinsam mit D2 mit der D1- und D2-Domäne der β -Rezeptorkette (25, 37, 40). Schröder und Mitarbeiter konnten im Jahre 2015 zeigen, dass die Zytokin-Rezeptorinteraktion von IL-23 nicht dem vermuteten *site* I, II, III Paradigma, sondern dem I III Paradigma folgt. Dabei ist die Interaktion von IL-23 mit dem IL-12R β 1 unabhängig von der *site* II der *p19* Untereinheit. Die Bindung von IL-23 an das *Cytokine Binding Module* (CBM) von IL-12R β 1 wird stattdessen über die Domänen 1 und 2 der *p40*-UE und über die entsprechende *site* II AS des IL-12R β 1 vermittelt. *p19* interagiert über die *site* I mit der *p40* UE und über die *site* III mit dem IL-23R (38). Dies konnte 2018 durch Bloch und Mitarbeiter bestätigt werden (41).

Der IL-23 Rezeptor ist ein glykosyliertes 69,0 kDa (murin 70,7 kDa) Typ-I-Membranprotein mit drei extrazellulären Domänen, einer 37 AS langen (murin 36 AS), bisher uncharakterisierten *stalk* Region, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne. Der genaue Aufbau ist Abbildung 2A zu entnehmen. Der IL-23R besitzt eine N-terminale Immunglobulin-ähnliche-Domäne (D1), gefolgt von der Zytokinbindedomäne. Die Domäne D3 enthält darüber hinaus eine, dem konservierten Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS)-Motiv ähnliche Sequenz: das WQPWS Motiv (30). Die WSXWS-Sequenz dient der effektiven Rezeptorfaltung und damit der korrekten Zytokinbindung (42). Der IL-23R ist ein Mitglied der hämatopoetischen Zytokinrezeptorfamilie IL-12 und hat Gemeinsamkeiten mit dem IL-12R β 2 sowie mit dem zu der IL-6 Familie zählenden gp130. Im Gegensatz zu seinen engen Verwandten enthält der IL-23R keine drei membrannahen Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen, sondern eine bisher uncharakterisierte *stalk* Region, vergleichbar mit der *stalk* Region der Rezeptoren IL-6R α , IL-11R α und CNTFR α (30, 42, 43). Der zytoplasmatische Teil des IL-23R enthält die Bindungsstellen für die Tyrosin-Kinase JAK2 sowie wichtige Tyrosinreste für die Signaltransduktion (30, 44, 45).

Im Unterschied zu anderen heterodimeren Rezeptoren ist der IL-23R aktiv an der Signalweiterleitung in die Zelle beteiligt. Bei vergleichbaren Rezeptoren z.B. dem IL-6R üben die kürzeren α -Rezeptoren keinen Einfluss auf die intrazelluläre Signaltransduktion aus (30).

Der murine und der humane IL-23R unterscheiden sich in mehreren Punkten voneinander, weisen aber dennoch große Homologien auf (vgl. Abbildung 2). Parham und Mitarbeiter analysierten cDNAs von T_H2 polarisierten murinen und humanen T-Zellen und fanden eine DNA-Sequenzhomologie von 84% in den Protein-kodierenden Regionen des murinen und humanen IL-23R (30). Als wichtige Unterschiede lassen sich jedoch die unterschiedlich lange *stalk* Region und eine 20 AS lange Duplikation innerhalb der Domäne 3 des murinen Rezeptors herausstellen (30, 46). Der murine IL-23R hat eine Länge von insgesamt 644 AS, der humane enthält hingegen nur 629 AS. Die intrazelluläre Domäne des murinen Rezeptors enthält 247 AS, die des humanen Rezeptors jedoch 252 AS (30). Die 20 AS lange Duplikation des mIL-23R enthält das bereits beschriebene WQPWS (WSXWS)-Motiv, dessen Einfluss auf die Signaltransduktion bisher noch ungeklärt ist (30). Außerdem findet sich innerhalb des humanen Rezeptors an Position 310 der *single nucleotide polymorphism* (SNP) P310L, bei dem die AS Prolin durch Leucin ausgetauscht ist. Dieser SNP P310L ist mit dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen assoziiert (46). *Single nucleotide polymorphisms* sind DNA-Sequenzvariationen im menschlichen Genom, die die Antwort des Individuums auf äußere Einflüsse verändern können (47). Innerhalb des IL-23R Gens wurden verschiedene SNPs identifiziert. Studien konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen IL-23R-SNPs und dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn sowie eine Assoziation mit der Basedow Ophthalmopathie im Rahmen von Basedow-Erkrankungen herstellen (46, 48). Dabei führten verschiedene Studien allerdings zu unterschiedlichen Ergebnissen, so dass der genaue Zusammenhang weiter unklar bleibt (48, 49).

1.4 Die IL-23 vermittelte Signaltransduktion

Nach Zytokinbindung und Heterodimerisierung der Rezeptorketten kommt es in der Zielzelle zu einer Aktivierung von rezeptorassozierten Januskinasen. Diese Januskinasen phosphorylieren Tyrosinreste in der intrazellulären Domäne des IL-23R (30, 44). Die Tyrosinreste induzieren nachgeschaltete Effektormoleküle für die JAK-STAT, *Mitogen-Activated Protein Kinase*- (MAPK) und Phosphoinositid-3-Kinase- (PI3K) Signaltransduktion (30, 44). An die phosphorylierten Tyrosinreste binden STAT Proteine mit ihrer *Src homology 2 Domäne* (SH2) und werden ebenfalls durch Januskinasen aktiviert. Eine Studie konnte darüber hinaus ebenfalls eine Aktivierung von NF- κ B in CD4⁺ T-Zellen zeigen (50). Die so entstandenen phosphorylierten *Signal Transducer*

and Activator of Transcription Proteine (pSTAT) erkennen über ihre SH2 Domäne reziprok den phosphorylierten Tyrosinrest und es erfolgt eine Dimerisierung der pSTATs. Die aktivierten STAT Proteine wandern anschließend in den Kern und wirken dort als Transkriptionsfaktoren auf Zielgene. Die IL-23 Signaltransduktion ist abhängig von TYK2, die mit dem IL-12R β 1 assoziiert ist sowie der Januskinase 2, die mit dem IL-23R assoziiert ist (30, 45, 51). Die Kinasen aktivieren vorwiegend STAT3 und in geringem Ausmaß ebenfalls STAT1, STAT4 und STAT5 (30, 51). So induziert beispielsweise STAT3 die Transkription der Zielgene IL-22, IL-17A, IL-17F, IFN γ , die unter anderem den T_H17 Phänotyp aufrecht erhalten (26).

Da der humane IL-12R β 1 keinen und der murine IL-12R β 1 hingegen nur einen Tyrosinrest besitzen, welcher nicht in dem klassischen STAT/SH2 Binde-Motiv liegt (52), kann die IL-23-Rezeptorkette als alleinige signaltransduzierende Kette angesehen werden, wohingegen die IL-12R β 1 Rezeptorkette für die hochaffine Zytokinbindung entscheidend ist (31, 53, 54). Die intrazelluläre Domäne des IL-12R β 1 enthält sogenannte Box1- und Box2-Motive als Bindungsstellen für Tyk2 (52). Box1-Motive sind prolinreiche 6-10 AS lange Sequenzen, die sich im transmembrannahen Bereich befinden wohingegen Box2-Motive noch weitgehend undefiniert sind (55).

Diese Box-Motive sind essentiell für die IL-23 induzierte Signaltransduktion, wobei Box1 absolut notwendig für die Signaltransduktion und Box2 hauptsächlich in die STAT3-Phosphorylierung involviert ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass JAK2 entscheidend und Tyk2 entbehrlich für die IL-23 Signaltransduktion ist (45). Abbildung 3 zeigt schematisch die Jak-STAT Signaltransduktion nach Zytokinbindung.

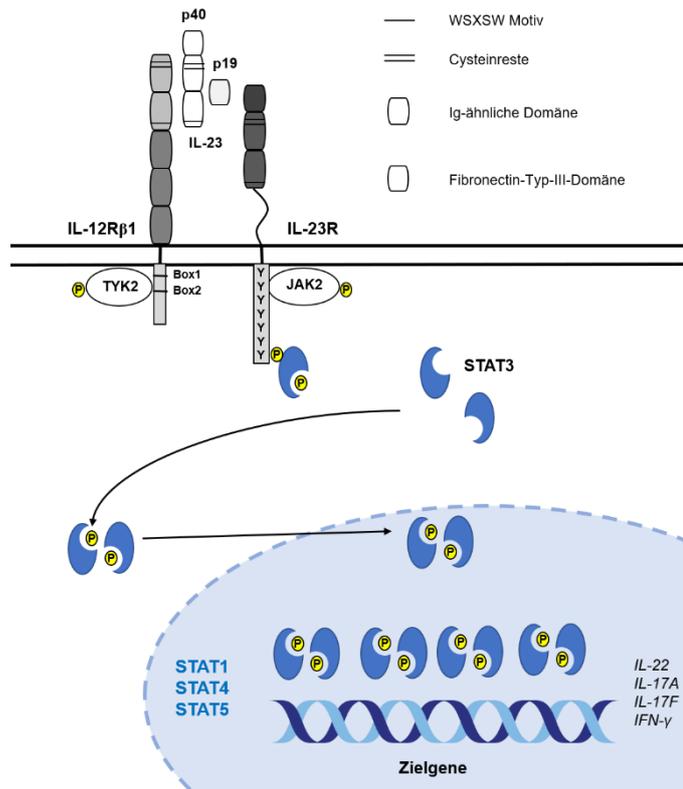


Abbildung 3: Schematischer Ablauf der IL-23 vermittelten Signaltransduktion

Die Bindung des heterodimeren Zytokins IL-23 an seinen Rezeptor induziert die Heterodimerisierung der beteiligten Rezeptorketten IL-12R β 1 und IL-23R. Neben den bereits beschriebenen distalen Domänen (D1 und D2), den drei Fibronectin-Typ-III-Domänen (D3, D4, D5) und der Transmembrandomäne enthält die IL-12R β 1-Kette die zytosolische Domäne mit den Box1 und Box2 Motiven. Zum anderen besteht der Rezeptorkomplex aus der α -Rezeptorkette IL-23R, die ebenfalls eine Ig-ähnliche Domäne (D1) sowie zwei Zytokinrezeptor Domänen (D2, D3), eine *stalk* Region, die Transmembrandomäne und den sieben Tyrosinreste enthaltenden zytosolischen Teil besitzt. Intrazellulär ist der Rezeptorkomplex mit den Januskinasen JAK2 und TYK2 assoziiert, die über eine Phosphorylierung der rezeptorgebundenen Tyrosinreste, zu einer Aktivierung der signaltransduzierenden STAT Proteine führt. Die phosphorylierten STAT Proteine (pSTAT) dimerisieren und wirken im Kern als Transkriptionsfaktoren für entsprechende Zielgene (26, 37).

Die intrazelluläre Domäne des humanen sowie des murinen IL-23R enthält sieben Tyrosinreste (murin: Y416, Y448, Y469, Y496, Y504, Y542 und Y626; human: Y397, Y429, Y450, Y463, Y476, Y484 und Y611) (44).

Untersuchungen von Floss und Mitarbeitern aus dem Jahr 2013 zeigten, dass das Tyrosinmotiv Y_{m416/h397} EDI in die Aktivierung des MAPK/PI3K Signalwegs involviert ist. Darüber hinaus wurde der murine Tyrosinrest Y_{m626FPQ} als weitere STAT3-Bindeseite im murinen IL-23R beschrieben sowie eine weitere STAT3 Bindestelle identifiziert, die kein YXXQ Motiv besitzt (44).

Die Kinetik der STAT3-Aktivierung ist noch nicht abschließend geklärt. Untersuchungen von Floss und Mitarbeitern konnten allerdings weiterhin zeigen, dass eine Stimulation mit IL-23 im Vergleich zu IL-6 zu einer langsameren, aber langanhaltenden STAT3-Phosphorylierung führt (44).

1.5 Die Bedeutung von IL-23 im Immunsystem

Etwa 3% der Weltbevölkerung sind von Autoimmunerkrankungen betroffen. Diese können sich in einer großen Vielfalt von Symptomen äußern. Allen ist gemeinsam, dass sie durch eine Fehlfunktion des Immunsystems charakterisiert sind. Das Immunsystem richtet sich gegen Zellen des eigenen Körpers und erkennt diese als fremd. Trotz der großen Anzahl an Menschen, die von Autoimmunerkrankungen betroffen sind, ist wenig über die Pathogenese bekannt. Die große Vielfalt an Symptomen erschwert die Charakterisierung der kausalen Zusammenhänge und die Entwicklung von Therapiestrategien. In den letzten Jahren wurden einige Parameter identifiziert, die zu der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen beitragen. Dazu zählen unter anderem die Zytokine der IL-12 Familie. IL-23 konnte bereits über eine T_H17 -Zell Aufrechterhaltung mit dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn (48), Rheumatoider Arthritis (56) und Psoriasis (57) in Verbindung gebracht werden. Darüber hinaus konnten *Genome-Wide Association Studies* (GWAS) spezifische SNPs innerhalb des IL-23R-Gens identifizieren, die mit Autoimmunerkrankungen assoziiert sind (31).

IL-23 greift als zentrales Zytokin der T_H17 -Zell Entwicklung maßgeblich in Immunprozesse innerhalb des Körpers ein und gilt neben IL-12 als Vermittler zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem.

Über viele Jahre wurde angenommen, dass allein die IL-12 $p40$ -Untereinheit in die IFN- γ Produktion während Infektionen und damit ebenfalls in das Auftreten von Autoimmunerkrankungen involviert war (58). Neuere Studien konnten zeigen, dass IL-23 an Autoimmunprozessen und der Infektionsabwehr beteiligt ist (59). Dieses neue Modell legt nahe, dass IL-23 T_H17 -Zellen stimuliert, die dann über eine IL-17-Ausschüttung zu einer Produktion von proinflammatorischen Zytokinen führen. Diese Kaskade vermittelt Autoimmunität oder protektive Antworten während Infektionen (35). IL-23 hat sich als Schlüsselfigur in der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen herausgestellt. Beispielsweise konnten Cua und Mitarbeiter im Mausmodell zeigen, dass IL-23- $p19$ -defiziente Mäuse resistent gegenüber autoimmuner Entzündung im zentralen

Nervensystem sind (59). Dies deutet auf einen positiven Zusammenhang zwischen IL-23 und dem Auftreten von Multipler Sklerose hin.

Weitere Zytokine, unter anderem IL-12, sind an der Entstehung von Autoimmunität beteiligt. IL-12 und IFN- γ werden unmittelbar nach Pathogenstimulation produziert und sind wichtig für die Generierung von T_H1-Zellen. Diese T_H1-Zellen kontrollieren bakterielle Infektionen durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, direkte bakterielle Lyse und B-Zell-Aktivierung (60-62). Aggarwal und Mitarbeiter konnten 2003 zeigen, dass die IL-23/IL-17-Achse stark durch die IL-12/IFN- γ -Achse der immunregulatorischen Faktoren reguliert ist (18, 63). Allerdings legen die Ergebnisse von Murphy am Beispiel von Collagen-induzierter Arthritis (CIA) nahe, dass nicht IL-12, sondern IL-23 für die autoimmune Aktivität verantwortlich ist. So haben beispielsweise IL-23 (p19^{-/-}) defiziente Mäuse eine erhöhte Resistenz gegenüber CIA, wohingegen IL-12 (p35^{-/-}) defiziente Mäuse paradoxerweise nicht nur anfälliger für CIA (80% der Mäuse entwickeln klinische Symptome) waren, sondern auch einen stärkeren Krankheitsverlauf sowie eine verlangsamte Erholung nach der Erkrankung zeigten (63).

Klinische und experimentelle Studien konnten IL-17 und T_H17-Zellen und damit IL-23 als Schlüsselfigur im Auftreten von Autoimmunerkrankungen identifizieren. IL-23 wird im Rahmen von Psoriasis-erkrankungen von dermalen DCs sezerniert und induziert die Produktion der proinflammatorischen Mediatoren IL-17A, IL-17F und IL-22 durch T_H17-Zellen. Diese Mediatoren aktivieren epidermale Keratinozyten, die proinflammatorische Zytokine ausschütten und durch eine anschließende Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen in der entzündeten Haut zu dem klinischen Bild der Psoriasis führen (57). Im Gegensatz zu IL-12 wirkt IL-23 hauptsächlich auf CD4⁺ T-Zellen, die bereits einer Antigenexposition ausgesetzt waren und sorgt über eine Förderung des Überlebens der effektorzytokinproduzierenden T_H1-Gedächtniszellen für eine Langzeitimmunität (64). Der IL-23R ist dabei auf den IL-17-produzierenden T_H17-Zellen exprimiert. IL-17 ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin, das unter anderem auf stromale Endothelzellen und Monozyten wirkt und dort die Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-8, Chemokine, TNF sowie des Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors induziert. Diese Mediatoren sorgen für eine schnelle Rekrutierung von Neutrophilen, die unter Normalbedingungen für die Kontrolle einer Infektion sorgen. Gibt es eine Dysregulation innerhalb der IL-17-Produktion in Geweben, so kann diese zu chronischer Entzündung und damit zu Gewebsschäden führen (19).

Bereits 1986 stellten Mosmann und Mitarbeiter die T_H1/T_H2-Hypothese auf und drei Jahre später unterteilten Mosmann und Coffmann die CD4⁺ T-Zellen in die IFN- γ -

produzierenden sowie STAT1-abhängigen T_H1 -Zellen und die IL-4-produzierenden, STAT6-abhängigen T_H2 -Zellen (65, 66). Bis heute hat sich die T_H -Zell-Subpopulation um weitere Mitglieder vergrößert und enthält aktuell die T_H1 -, T_H2 -, T_{reg} -, T_H17 -, folliculäre T_H -Zellen (T_{fh}), T_H9 - und T_H22 -Zellen. Die Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen ist hauptsächlich durch Dendritische Zellen in lymphatischem Gewebe reguliert. Zytokine spielen eine entscheidende Rolle in der Frühphase dieser Differenzierung (67). Die schematische Darstellung in Abbildung 4 verdeutlicht die T-Zelldifferenzierung.

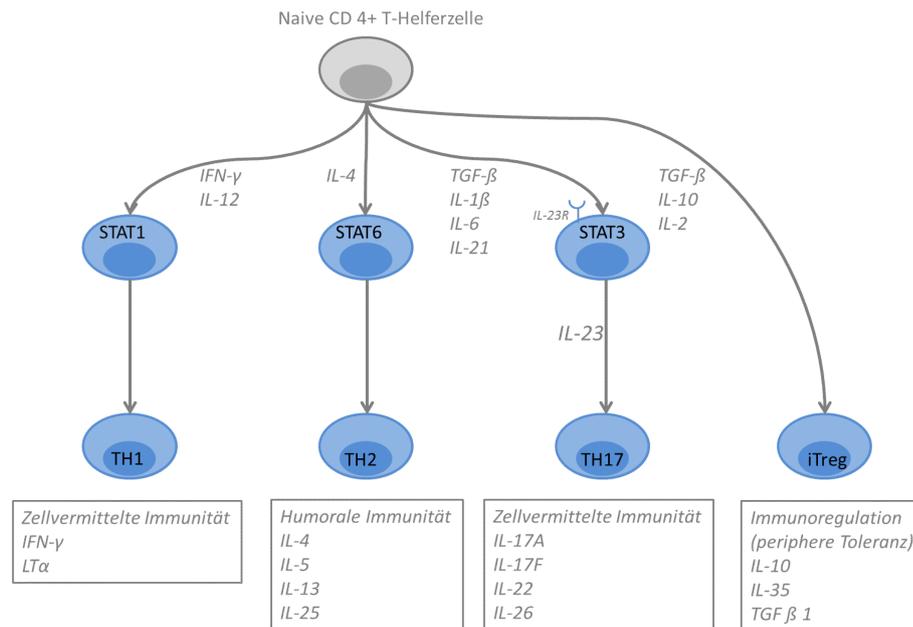


Abbildung 4: Schematische Übersicht zur T-Zelldifferenzierung

T_H1 -Zellen differenzieren in Gegenwart von IL-12 und erfordern eine über STAT1 gesteuerte Aktivierung des Transkriptionsfaktors T-bet. T_H1 -Zellen produzieren über eine STAT2 Aktivierung $IFN-\gamma$ und Lymphotoxin und sind in die zellvermittelte Immunität gegen bakterielle und virale Erreger involviert. T_H2 -Zellen sind abhängig von IL-4, STAT6 und der Glutaryl-Aminotransferase-Untereinheit-A-3 (GATA-3) und induzieren über die Ausschüttung von IL-4, IL-5, IL-13 und IL-25 die humorale Immunantwort gegen Parasiten und Helminthen. T_H17 -Zellen erfordern eine Kombination aus TGF- β und proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-6 und/oder IL-21). Über eine Hochregulation der IL-23R auf der Zelloberfläche sind differenzierte T_H17 -Zellen ebenfalls für IL-23 sensitiv. Dies sorgt für ein Überleben der genannten Zellen. Über die Produktion von IL-17A, IL-17F, IL-22 und IL-26 führen sie zu einer zellvermittelten Immunität gegen extrazelluläre Pathogene. Regulatorische T_{regs} differenzieren in Anwesenheit von TGF- β , IL-10 und IL-2 aus naiven T-Zellen und produzieren die immunsuppressiven Zytokine IL-10, IL-35 und TGF- β 1 (57).

Die T-Zellen werden auf Grund von unterschiedlicher Entwicklung und funktioneller Programmierung in T_H1 -, T_H2 -, T_H17 - und T_{regs} -Zellen unterteilt (68).

Die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen über prozessierte Antigene durch APCs initiiert eine Abfolge von Differenzierungen innerhalb der T-Zellen, die mit klonaler Expansion einhergehen. Dabei werden Zellen generiert, die unterschiedliche Funktionen, bedingt durch das jeweilige Signal, übernehmen können. Welche Funktionen diese Zellen übernehmen und wie sich die Zellen differenzieren, hängt von dem Antigen, der Antigen-Dosis und der damit verbundenen Zytokinstimulation ab. Aber auch nicht-Zytokin-Mediatoren nehmen Einfluss auf die Differenzierung (68).

Anfängliche Studien zeigten, dass IL-23 in die Proliferation von humanen und murinen Gedächtnis-T-Zellen involviert ist (14). Im Gegensatz dazu reagieren naive T-Zellen nicht, bzw. kaum auf IL-23, da sie keinen bzw. nur in geringem Ausmaß den IL-23R exprimieren (30). Neuere Studien zeigten, dass IL-23 die Entwicklung der T_H17-Zellen, die über die Produktion von IL-17A und weiterer proinflammatorischer Zytokine charakterisiert sind, fördern (18, 69-71).

CD4⁺ Zellen sind essentielle Regulatoren der adaptiven Immunantwort und inflammatorischer Erkrankungen. Nach Aktivierung durch professionelle APCs differenzieren sie sich in Abhängigkeit der stimulierenden Zytokine in Effektorzellen. T_H1-Zellen produzieren IFN- γ sowie Lymphotoxin und sind involviert in die zellvermittelte Immunität gegen intrazelluläre Bakterien und Viren. Sie entwickeln sich in Abhängigkeit von IL-12 aus naiven T-Zellen. T_H2-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-13 und IL-25 und sind involviert in die humorale Immunantwort gegen Parasiten und Helminthen. Induziert wird die T_H2-Differenzierung über IL-4 und den Transkriptionsfaktor GATA-3 (57).

Die T_H17-Zellen waren die erste neue T-Zelllinie seit der Beschreibung der T_H1/T_H2-Achse durch Mosmann und Mitarbeiter im Jahre 1986. Zunächst wurden die T_H17-Zellen als ein Produkt aktivierter Gedächtniszellen beschrieben. Infante-Duarte und Mitarbeiter zeigten allerdings, dass IL-17A produzierende Zellen nicht über das T_H1/T_H2-Paradigma klassifiziert werden können (72). Diese Annahme wurde durch die Entdeckung von IL-23 weiter untermauert (18) und der Zusammenhang zwischen T_H17-Zellen und Autoimmunerkrankungen durch Knock-out-Mäuse gezeigt (63, 70). Schließlich belegten Genexpressionsanalysen von IL-17A produzierenden Zellen eine Produktion proinflammatorischer Mediatoren, darunter IL-17A, IL-17F, IL-6, CCL20 und GM-CSF (70).

Die genaue Regulierung der T-Zellen kann Abbildung 4 entnommen werden.

1.6 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Charakterisierung der IL-23R *stalk* Region und deren Einfluss bei der IL-23 vermittelten Signaltransduktion.

Arbeiten der AG Scheller zeigten bereits, dass die *stalk* Region für eine uneingeschränkte Signaltransduktion des murinen IL-23 Rezeptors obligat ist und eine Verkürzung dieser *stalk* Region die Aktivierung der Zielzelle reduziert (73).

Diese Ergebnisse sollen durch erneute Generierung von stabilen Ba/F3-gp130-Zelllinien verifiziert werden. Dazu werden zunächst die in Abbildung 7 dargestellten Deletionsvarianten des murinen IL-23R in Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-Zellen transduziert und die Oberflächenexpression der Rezeptorvarianten mittels Durchflusszytometrie analysiert. Anschließend soll die STAT3-Aktivierung nach IL-23-Stimulation als Parameter für die Zellaktivierung nachgewiesen werden. Zusätzlich soll die IL-23-abhängige Zellproliferation der stabilen Zelllinien untersucht werden. Analog sollen für den humanen IL-23R ebenfalls Deletionsvarianten und Chimären generiert werden. Die Analyse dieser Zellen erfolgt wie bereits für den mIL-23R beschrieben. Dazu werden zunächst die Deletionsvarianten mittels *Splicing by overhang Extension Polymerase Chain Reaction* (SOE-PCR) erzeugt und anschließend in den Expressionsvektor p409 sowie den retroviralen Vektor pMOWS kloniert. Anschließend erfolgt zur Überprüfung der Proteinexpression die Transfektion der generierten cDNAs in COS-7-Zellen. Die Analyse der generierten Ba/F3-Zelllinien mit Expression der IL-23R *stalk* Deletionsvarianten erfolgt ebenfalls unter Nachweis der biologischen Aktivität anhand von STAT3-Aktivierung und Zellproliferation.

Die Ergebnisse dieser Dissertation tragen entscheidend zu der Charakterisierung des IL-23 und seines Rezeptorkomplexes bei. Sie bilden eine vielversprechende Grundlage für das Verständnis Zytokin-assoziiierter Autoimmunerkrankungen und damit verbundener Entwicklung von Therapiestrategien.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Die im Folgenden aufgezählten Zellen wurden in *DMEM High Glucose Medium* unter Zugabe von FCS, Penicillin und Streptavidin kultiviert und proliferierten unter Zugabe der in Tabelle 11 aufgezählten Zytokine. Die Selektion erfolgte durch die in Tabelle 10 genannten Antibiotika.

Tabelle 1: Liste der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Herkunft	Besonderheiten
COS-7 (ACC-60)	Nierenzellen der grünen Meerkatze	LEIBNITZ INSTITUT DSMZ, Braunschweig, Deutschland	Adhärente Zellen, Wachstum unter: DMEM + 10% FCS + Penicillin (60 mg/l)/ Streptomycin (100 mg/l)
Phoenix-Eco	Humane embryonale Nierenzellen	MAX PLANCK INSTITUT FÜR IMMUNOLOGIE, Freiburg, Deutschland (74)	Adhärente Zellen, Wachstum unter: DMEM + 10% FCS + Penicillin (60 mg/l)/ Streptomycin (100 mg/l)
Ba/F3-gp130	Murine pro B-Zellen	IMMUNEX, Seattle, WA, USA (75)	Suspensionszellen mit Oberflächenexpression des humanen gp130, Wachstum unter DMEM + 10% FCS + Penicillin (60 mg/l)/ Streptomycin (100 mg/l) + Hyper-IL-6 (10 ng/ml)
Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1	Murine pro B-Zellen	Medizinische Fakultät Düsseldorf, Institut für molekulare Biologie und Biochemie II, Deutschland (44)	Suspensionszellen mit Oberflächenexpression des humanen gp130 und murinen IL-12R β 1, Wachstum unter DMEM + 10% FCS + Penicillin (60 mg/l)/ Streptomycin (100 mg/l) + Hyper-IL-6 (10 ng/ml)
Ba/F3-gp130-mIL-23R-mIL-12R β 1	Murine pro B-Zellen	Medizinische Fakultät Düsseldorf, Institut für molekulare Biologie und	Suspensionszellen mit Oberflächenexpression des humanen gp130 und murinen IL-12R β 1, Wachstum unter DMEM + 10% FCS + Penicillin (60

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Die in Tabelle 2 gelisteten Chemikalien wurden für die Experimente der Doktorarbeit verwendet und entsprechen alle den Reinheitsgraden *pro analysis* oder *reinst*.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese	
Biozym LE Agarose	BIOZYM SCIENTIFIC, Oldendorf, Deutschland
DNA-Größenstandard GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Express DNA Ladder 100-5000bp	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland
Loading-Dye Solution (6x)	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland
Polymerasekettenreaktion (PCR)	
10x <i>Dream Taq Puffer</i>	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland
10x Pfu Puffer + MgSO ₄	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland
5x Phusion HF Puffer	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland
dNTPs Mix (25 mM)	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland
<i>Dream Taq</i> DNA Polymerase (5 u/μl)	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland

Pfu® DNA-Polymerase	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland
Phusion <i>High-Fidelity</i> DNA Polymerase (2 u/μl)	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland
T4 Polynucleotide Kinase (10 u/μL)	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland

Klonierung

10x Standard-Restriktionspuffer	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland
10x T4-DNA-Ligasepuffer	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland
FastAP™ (thermosensitive)	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland
Restriktionsenzyme	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland
T4-DNA-Ligase (5 Weiss u/μl)	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland

SDS-PAGE/ Western Blot

Acrylamid-Mix 30%	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	SIGMA-ALDRICH, München, Deutschland
Bromphenolblau (BPB)	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
BSA	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	GE HEALTHCARE AMERSHAM™, München, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	SIGMA-ALDRICH, München, Deutschland
Glycerin (99%)	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver (<i>blotting grade</i>)	ROTH, Karlsruhe

Methanol	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS) Pellets	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Proteingrößenstandart PageRuler™ Prestained Protein Ladder	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	SIGMA-ALDRICH, München, Deutschland
Tris	BETHESDA RESEARCH LABORATORIES; USA
Tween20	SIGMA-ALDRICH, München, Deutschland
β-Mercaptoethanol	SIGMA-ALDRICH, München, Deutschland
Zellkultur	
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (EDTA-free)	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA-ALDRICH, München, Deutschland
Fetales Bovines Serum (FBS)	LIFE TECHNOLOGIES, Darmstadt, Deutschland
KCL	MERCK, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	MERCK, Darmstadt, Deutschland
NA ₂ HPO ₄	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Na ₃ VO ₄	MERCK, Darmstadt, Deutschland
NaCL	MERCK, Darmstadt, Deutschland
NaF	MERCK, Darmstadt, Deutschland
NP-40	SIGMA-ALDRICH, München, Deutschland
Triton X-100	SIGMA-ALDRICH, München, Deutschland
Trypan Blue Dye 0,4%	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
TurboFect Transfektionsreagenz	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland

Sonstige Chemikalien

Essigsäure	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	APPLICHEM GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumacetat	MERCK, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon –Rot, Deutschland
Natriumcarbonat	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Pyridone 6 (P6)	CALBIOCHEM MERCK KGaA, Darmstadt, Germany
Schwefelsäure	APPLICHEM GmbH, Darmstadt, Deutschland

Im Folgendem aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Kits.

Table 3: Liste der verwendeten Kits

Kits	Hersteller
CellTiter-Blue Cell Viability Assay	PROMEGA GmbH, Mannheim
ECL Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien
NucleoBond Xtra Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	MACHERY UND NAGEL, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid	MACHERY UND NAGEL, Düren, Deutschland
Qia quick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.3 Puffer und Lösungen

Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen. Die Ansätze wurden in destilliertem Wasser (H_2O_{dd}) vorbereitet und bei Bedarf autoklaviert (20 min, 120°C, 2 bar).

Tabelle 4: Zusammensetzung der Puffer S1 -3 für die Minipräparation und DNA-Analyse

Puffer	Zusammensetzung
Solution 1 (bei 4°C gelagert)	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl pH 8.0 0,5 M EDTA pH 8.0 RNase
Solution 2 (bei RT gelagert)	4 M NaOH 10% SDS
Solution 3 (bei 4°C gelagert)	5 M Kaliumacetat (CH_3CO_2K) 11,5 ml Essigsäure (CH_3COOH)

Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Puffer für die Western Blot Analysen.

Tabelle 5: Puffer für die Western Blot Analysen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
10 x Tris Buffered Saline	1 M Tris/HCl (pH 7,5) NaCl
TBS-T	10x TBS Tween20
Lämmli-Puffer	1 M Tris-HCl pH 8,8 50% Glycerol 20% SDS 10% β -Mercaptoethanol Bromphenolblau
Lauf-Puffer	25 mM Tris 0,1% SDS 192 mM Glycin

Zellyse-Puffer	150 mM NaCl 2 mM EDTA 1 mM NaF 1 mM Na ₃ VO ₄ 1% NP-40 1% Triton X-100
Milch-TBS-T	5% Milchpulver (5 g Milchpulver in 100 ml TBS-T)
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 2% SDS 0,1% β-Mercaptoethanol
Transfer-Puffer	25 mM Tris 0,1% SDS 192 mM Glycin 20% Methanol

Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Gele für die Western Blot Analysen.

Tabelle 6: Gele für die Western Blot Analysen

Gel	Zusammensetzung
Sammelgel	30% Acrylamidmix 1,0 M Tris-HCl pH 6,8 10% SDS 10% Ammonium persulfat (APS) TEMED
Trenngel	30% Acrylamidmix 1,5 M TrisHCl pH 8,8 10% SDS 30% Ammonium persulfat TEMED

Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Puffer für die Immunopräzipitations Analysen.

Tabelle 7: Puffer und Lösungen für die IP

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
IP-Lyse Puffer	10 ml IP-Puffer
	1% Triton X-100
IP-Puffer	20 mM Tris pH 7,5
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM EGTA
	1 mM Natriumvanadat
	2,5 mM Natriumpyrophosphat
	1 mM β Glycerophosphat
	1 Tablette/50 ml Complete Protease Inhibitor

Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Puffer.

Tabelle 8: Sonstige Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
BSA-Lösung 5%	5% BSA in TBS-T
DNA Ladepuffer (6x)	0,25% Bromphenolblau
	0,2 M EDTA
FACS-Puffer	1% BSA in PBS
Phosphate-Buffered-Saline PBS	1,5 mM KH_2PO_4
	2,7 mM KCl
	8,1 mM Na_2HPO_4
	137 mM NaCl pH 7,4
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)	0,4 M Tris-HCl pH 8,8

	0,01 M EDTA
	0,2 M Essigsäure
Trypsin/EDTA-Lösung	5 ml 1:10 Trypsin/EDTA (10x)
	Ad 50 ml PBS

2.1.4 Medien und Antibiotika

Alle Medien wurden nach Herstellerangaben angesetzt, autoklaviert (121°C, 1,2 bar, 20 min) und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 9: Liste verwendeter Medien

<u>Lösung</u>	<u>Hersteller</u>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	LIFE TECHNOLOGIES, Darmstadt, Deutschland
DMEM+/-	LIFE TECHNOLOGIES, Darmstadt, Deutschland
DMEM+10% FCS, 60 mg/l Penicillin, 100 mg/l Streptomycin	
Lysogeny-Broth-(LB)-Medium	ROTH, Karlsruhe, Deutschland

Im folgendem aufgelistet sind die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika und Bakterienkulturen.

Tabelle 10: Liste verwendeter Antibiotika und Bakterienkulturen

<u>Antibiotikum</u>	<u>Arbeitskonzentration</u>	<u>Hersteller</u>
Ampicillin	200 µg/ml für die Agarplatten, 100 µg/ml für die Flüssigkultur	CARL ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Escherichia coli Stamm XL1 blue		STRATAGENE, La Jolla, CA, USA
Hygromycin B	1 mg/ml	CARL ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin G	60 mg/L	GENAAXXON BIOSCIENCE GmbH, Ulm, Germany
Puromycin	1,5 µg/ml	CARL ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Streptomycin

100 mg/L

GENAAXXON BIOSCIENCE
GmbH, Ulm, Germany

2.1.5 Zytokine

Die folgende Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Zytokine.

Das Zytokin HIL-6 wurde innerhalb dieser Arbeitsgruppe als konditionierter Zellüberstand eines stabilen CHO-K1-Klons gewonnen. Hyper-IL-23 (HIL-23) besteht aus p40 und p19 und ist analog zum HIL-6 aufgebaut. HIL-6 und HIL-23 wurden als Wachstumsstimulanzen zu den Zellen gegeben.

Tabelle 11: Liste verwendeter Zytokine

<u>Zytokin</u>	<u>Merkmale</u>	<u>Konzentration im Medium</u>	<u>Referenz</u>
Hyper-IL-23	kond. Zellkulturüberstand von CHO-K1-Zelllinie mit Hyper-IL-23 Expression (HIL-23)	10 ng/ml	(44)
Hyper-IL-6	kond. Zellkulturüberstand von CHO-K1-Zelllinie mit Hyper-IL-6 Expression (HIL-6)	10 ng/ml	(76)
rHIL-6	Rekombinantes Hyper - IL-6	10 ng/ml	

2.1.6 Antikörper (AK)

Die folgende Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten AK.

Tabelle 12: Liste verwendeter AK

<u>Antikörper</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Herkunft</u>
Alexa Fluor 647-konj. Fab Ziege anti-Ratte IgG	1,6 mg/mL	1:100	DIANOVA, Hamburg, Deutschland

Allophycocyanin (APC)- Streptavidin Ratte (554067)	0,2 mg/mL	1:100	BD BIOSCIENCE, Heidelberg
Anti-human Fc HRP, Kaninchen (31423)	k.A.	1:5000	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon-Rot, Deutschland
Anti-myc 9E10, Maus	k.A.	1:50	AG Scheller Hybridomüberstand
Biotinylierter anti-mIL-23R (BAF1686), Ziege	0,2 ng/ml	1:20	R&D SYSTEMS, Minneapolis, USA
Biotinylierter Anti-Maus IL12R β 1 AK, Ziege (BAF1998)	0,2 ng/ml	1:300	R&D SYSTEMS, Minneapolis, USA
PE-konjugierter IL-12R β 1 MAb	50 μ g/mL	1:10	R&D SYSTEMS GmbH, Minneapolis, USA
Phospho-STAT3 AK (Tyr705), Kaninchen (D3A7)	k.A.	1:1000	Cell Signaling Technology (Frankfurt, Germany)
Ratte α -murin-IL-23R (MAB 1686)	0,2 mg/mL	1:20	R&D SYSTEMS GmbH, Minneapolis, USA
STAT3 (124H6), Maus AK, Maus	k.A.	1:1000	Cell Signaling Technology (Frankfurt, Germany)
Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP/POD) (DY998)	k.A.	1:200	R&D SYSTEMS, Minneapolis, USA

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (H + L) Sekundärantikörper, HRP (31462)	0,4 mg/ml	1:2000	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon-Rot, Deutschland
Ziege-anti-Maus-IgG (H + L) - Sekundärantikörper, HRP (31432)	k.A.	k.A.	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon-Rot, Deutschland
α -humaner IL-12R β 1 (FAB 839P)	k.A.	1:300	R&D SYSTEMS, Minneapolis, USA
α -human-IL-23R biotin (BAF 1400)	0,2 mg/ml	1:40	R&D SYSTEMS, Minneapolis, USA
α -human-IL-23R biotin (BAF 1400)	0,2 mg/ml	1:40	R&D SYSTEMS GmbH, Minneapolis, USA

2.1.7 Oligonukleotid-Primer

Die folgende Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer.

Tabelle 13 Liste der verwendeten Primer

<u>GEN (Transkript)</u>	<u>DNA Sequenz 5'-3'</u>	<u>Ann.</u> <u>T. [°C]</u>
hIL-23R Δ 344- 353A	Fw CTTCTGGATATCCGCCAGATATTCCTG	65
	Rv AGTCCAATTGTAGAGATGGAAGCAAC	61,6
hIL-23R Δ 344- 353B	Fw CCATCTCTACAATTGGACTTTTATTGGGAATG	64,4
	Rv CTGCGGCCGCCTTTTCCAAGAGTGAAATCC	75
hIL-23R Δ 334- 353A	Fw CTTCTGGATATCCGCCAGATATTCCTG	65
	Rv AGTCCAATATTCCATGTGTCATGTTGGA	62,2
	Fw CATGGAATATTGGACTTTTATTGGGAATGATC	63,1

hIL-23RΔ334-353B	Rv	CTGCGGCCGCCTTTTCCAAGAGTGAAATCC	75
hIL-23RΔ323-353A	Fw	CTTCTGGATATCCGCCAGATATTCCTG	65
	Rv	AGTCCAATGACCTGGGGAAGTGTTC	65
hIL-23RΔ323-353B	Fw	CCAGGTCATTGGACTTTTATTGGGAATG	63,7
	Rv	CTGCGGCCGCCTTTTCCAAGAGTGAAATCC	75
hIL-23RΔ313-353A	Fw	CTTCTGGATATCCGCCAGATATTCCTG	65
	Rv	AGTCCAATAAAAAACGGTGAAGTCCAAGG	63,9
hIL-23RΔ313-353B	Fw	GAGTTCACCGTTTTTTTATTGGACTTTTATTGGG	64,5
	Rv	CTGCGGCCGCCTTTTCCAAGAGTGAAATCC	75

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Die folgende Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 14: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

<u>Verbrauchsmaterialien</u>	<u>Herkunft</u>
8-Strip PCR-Tubes und Caps, natural	STARLAB, Hamburg, Deutschland
Einwegpipetten	CORNING INCORPORATED, New York, USA
Einwegpipettenspitzen	StarLab, Hamburg, Deutschland
Extra Thick Blotting Paper	BioRad, Hercules, USA
Falkon Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	GREINER BIO-ONE, Frickenhausen, Deutschland
Messpipetten	HIRSCHMANN, Eberstadt, Deutschland
Petrischale 10 cm (Adhärente Zellen)	TPP, Trasadingen, Schweiz

Petrischale 10 cm (Bakterien, Suspensionszellen)	GREINER BIO-ONE, Frickenhausen, Deutschland
PVDF-Membran	VWR INTERNATIONAL BVBA, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1 ml, 2 ml	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
TC10 System Counting Slides Dual Chamber	BIO-RAD LABORATORIES GmbH, München, Deutschland
Zellkulturschale 6-well-Platte	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale 96-well-Platte	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	GREINER BIO-ONE, Frickenhausen, Deutschland

2.1.9 Geräte

In Tabelle 15 sind die im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Geräte gelistet.

Tabelle 15: Liste der verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage Percisia 100M-300c	PERCISA, Hartenstein, Deutschland
Autoklav Laboklav 25	SHP Steriltechnik AG, Detzel-Schloss/Satuelle, Deutschland
BD FACSCANTO II Flow Cytometer	BECTON DICKINSON AND COMPANY, Heidelberg, Deutschland
ChemoCam Imager (Westernblot)	INTAS, Göttingen, Deutschland
Geldokumentationssystem Gel iX20 Imager	INTAS, Göttingen, Deutschland
Gelkammer für Agarosegele	BIO-RAD, München, Deutschland
IKA® Minishaker MS2	IKA, Staufen, Deutschland

Infinite® M200 Pro Multimode Microplate Reader	TECAN, Männedorf, Deutschland
Inkubator Hera Cell	HERAEUS, Hanau, Deutschland
Kühlzentrifuge Centrifuge 5417R	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge Labofuge 400R	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 25	ZEISS, Köln, Deutschland
Mastercycler	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
Mikropipetten Research®	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle Optiquick	MOULINEX, Offenbach, Deutschland
MiniProtean® TetraCell	BIO-RAD, München, Deutschland
NanoDrop® 2000c	THERMO SCIENTIFIC, St. Leon-Rot, Deutschland
Oberschalenwaage EW 2400 2NM	KERN&SOHN, Balingen-Frommern, Deutschland
PeqStar 2X Graddient Thermocycler	PEGLAB, Erlangen, Deutschland
pH-Messgerät	SARTORIUS, Ratingen, Deutschland
Pipetus®-Akku	HIRSCHMANN, Eberstadt, Deutschland
PowerPac™ HC	BIO-RAD, München, Deutschland
Schüttelinkubator Infors HT Multitron®	BIOTRON, Hilden, Deutschland
Spannungsquelle PowerPac Basic™	BIO-RAD, München, Deutschland
Sterilbank ScanLaf MARS Class II	WEISS LABORTECHNIK, Heroldsberg, Deutschland
Sterilbankabsaugpumpe	HLC BIOTECH, Bovenden, Deutschland
TC10 Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermomixer 5436	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
Thermomixer® Comfort	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
Thermosublimationsdrucker	mitsubishi, Ratingen, Deutschland

Tischzentrifuge 5415D	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot®Turbo™	BIO-RAD, München, Deutschland
Vortex Mixer 7-2020	NEOLAB, Heidelberg, Deutschland

2.1.10 Plasmide

Die folgende Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Tabelle 16: Liste verwendeter Plasmide

Plasmid	Resistenz	Ursprung
p409	Amp	Althoff, 2001 (77)
pMOWS-puro	Amp	Ketteler, 2002 (74)
pMOWS-hygro	Amp	Suthaus, 2010 (78)
p409-mIL-12Rβ1	Amp	Floss 2013 (44)
p409-mIL-23R	Amp	Floss 2013 (44)
pEGFP-N1	Amp	CLONTECH LABORATORIES, TaKaRa Bio, Japan
	Kanamycin/Neomycin	
p409-hIL-12Rβ1	Amp	
p409-hIL-23R	Amp	
pPCR-Script SK(+) Vektor	Amp	STRATAGENE, Waldbronn, Deutschland
pcDNA3.1	Amp	INVITROGENTM, Life Technologies
pcDNA3.1-mIL- 12Rβ1	Amp	Floss, 2013
pcDNA3.1-mIL-23R	Amp	Floss, 2013
pcDNA3.1-hIL- 12Rβ1	Amp	
pcDNA3.1-hIL-23R	Amp	

2.1.11 Softwares und Datenbanken

Die im Folgenden gelisteten Softwares und Datenbanken wurden zur Erstellung dieser Doktorarbeit verwendet.

Table 17: Übersicht der verwendeten Softwares und Datenbanken

Software
DeNovo Software, Los Angeles, CA, USA
FCS Express 4 Flow Software
Datenbank
http://www.ncbi.nlm.nih.gov

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Quantifizierung wurde unter Verwendung des *NanoDrop®* der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Dabei wurde zur photometrischen Bestimmung der Konzentration die Absorption einer Nukleinsäure-Lösung bei 260 nm bestimmt. Zusätzlich wurde die Absorption bei 230 nm (Detektion organischer Substanzen) und 280 nm (Detektion von Proteinen und Phenolen) gemessen. Über das Verhältnis dieser Absorptionen zueinander konnten anschließend Aussagen über die Reinheit der Proben getroffen werden.

2.2.1.2 Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* XL-1 *blue* Zellen verwendet. Zunächst wurden 30 μ L Aliquots der kompetenten Zellen auf Eis inkubiert. Anschließend wurden diese mit 1 μ L der Plasmid DNA oder mit 10 μ L Ligationsansatz versetzt, gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Damit die DNA in die Zelle gelangt, muss die Permeabilität der Zellmembran erhöht werden. Dies kann durch einen Hitzeschock oder durch einen Elektroschock geschehen. In dieser Arbeit wurde die Permeabilitätssteigerung durch einen Hitzeschock über 60 s bei 42°C gewährleistet. Anschließend wurden die Zellen auf Eis inkubiert und nach 5 min mit 500 μ l vorgewärmtem Regenerationsmedium versetzt. Zellen und Medium wurden für 1 Stunde (h) unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 μ l des Ansatzes

auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum verteilt und für 12-16 h bei 37°C inkubiert.

2.2.1.3 Präparation der Plasmid-DNA

Im Rahmen der Arbeit wurden zwei verschiedenen Verfahren der Plasmid-DNA-Isolation angewendet. Die Minipräparation diente dazu kleine Mengen an Plasmid-DNA (bis 25 µg) zu isolieren, während die Midipräparation größere Mengen DNA bereitstellte. Die so isolierte Plasmid-DNA wurde im Anschluss mittels Endonukleasebehandlung und Agarosegelelektrophorese auf seine Korrektheit geprüft.

Um die in Bakterien amplifizierte DNA zu analysieren, wurde die Minipräparation angewendet. Hierfür wurden 2 ml flüssiges LB-Medium mit dem plasmidspezifischen Selektionsantibiotikum und einer Bakterienkolonie über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Bakterien mittels Zentrifugation bei 5000 *rpm* über 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) geerntet und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde anschließend in 100 µl Ribonuklease-haltigem (RNase) S1 Puffer resuspendiert. Unter Zugabe von 200 µl S2 Puffer, der denaturierendes SDS enthält, kam es zu alkalischer Lyse der Zellen und damit zu der Freisetzung von DNA. Die Zelllyse wurde nach 5 Minuten durch Zugabe von 150 µl S3 Puffer gestoppt. Das in dem S3 Puffer enthaltenen Kalziumacetat und die Essigsäure hemmen die Lyse und führen zur Präzipitation der Proteine. Darin wurden die Zellen für 10 Minuten inkubiert, um die vollständige Präzipitation zu gewährleisten. Anschließend wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation (13.000 *rpm* und 4 °C) von der DNA getrennt und der DNA-haltige Überstand mit 900 µl Ethanol (100 %) zur Fällung der DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch erneute Zentrifugation wurde das 100 %ige Ethanol wieder entfernt und das Pellet im Anschluss mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen. Der durch wiederholte Zentrifugation entstandene Überstand wurde entfernt und das an der Luft getrocknete Plasmid-DNA-Pellet in 20 µL H₂O_{dd} resuspendiert. Für die Endonukleasebehandlung wurde 1 µL der Plasmid-DNA verwendet.

Zur Gewinnung von hochqualitativer DNA für weitere Klonierungsschritte wurde eine Midipräparation durchgeführt. Diese wurde gemäß Herstellerangaben des *Nucleo Bond Xtra Midi Kits* der Firma Machery-Nagel angewendet. Nach erfolgreicher Isolierung der Plasmid-DNA wurde die Konzentration am *NanoDrop* (vgl. Punkt 2.2.1.1.) gemessen und anschließend mittels Endonukleasebehandlung kontrolliert.

2.2.1.4 Restriktionsanalyse von DNA

Zur Charakterisierung von Plasmid-DNA und zur Vorbereitung dieser für weitere Klonierungen wurde eine Endonukleasebehandlung angesetzt. Bakterielle Endonukleasen schneiden spezifische Basensequenzen und es entstehen Enden mit Überhang (*sticky ends*) oder ohne Überhang (*blunt ends*).

Die Endonukleasebehandlung wurde mit den Restriktionsenzymen und den entsprechenden Puffern der Firma Thermo Scientific nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurden die resultierenden DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese analysiert.

2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Größenbestimmung von DNA-Fragmenten durch die Trennung dieser Fragmente in einem Agarosegel und der anschließenden Detektion der DNA-Banden unter UV-Licht. Das Anlegen einer elektrischen Spannung führt zu einem Ionenstrom. Dabei wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren der DNA in Richtung des Pluspols und werden durch die Poren des Gels ihrer Größe nach getrennt. Das Gel hält große Moleküle stärker zurück und somit sind diese weiter oben im Gel sichtbar. Kleinere Moleküle gelangen schneller durch die Poren in Richtung Pluspol und befinden sich im unteren Teil des Gels. Abgelesen wird die Größe der Fragmente anschließend anhand von DNA-Markern.

In dieser Arbeit wurde bei der Herstellung des Gels bereits Ethidiumbromid als DNA-Farbstoff hinzugefügt. Das Ethidiumbromid lagert sich in die DNA ein und die Banden sind anschließend unter UV-Licht sichtbar. Standardmäßig erfolgte in dieser Arbeit die Größentrennung der DNA-Fragmente in einem 1% igem Gel mit konstanter Spannung (70-100 V). Als DNA-Marker diente der *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* der Firma Thermo Scientific (Waltham, USA).

2.2.1.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese auf einem 1 % oder 2 % Agarosegel voneinander getrennt, mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und anschließend mittels Gel Extraktions Kit der Firma Machery-Nagel (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up) nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mittels UV-Spektrometrie im NanoDrop 2000c nach Herstellerangaben gemessen.

Das angegebene *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Gel Extraction Kit* wurde innerhalb dieser Doktorarbeit ebenfalls für die Reinigung von Restriktionsansätzen und PCR-Produkten benutzt.

2.2.1.7 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von DNA-Abschnitten. Die Ausgangs-DNA (*template*) wird dabei mit einem entsprechenden Puffer, zwei als *primer* bezeichneten, sequenzspezifischen Oligonukleotiden, einer hitzestabilen DNA-Polymerase und den Nukleotiden (dNTPs) gemischt. Die Reaktionsschritte laufen bei definierten Temperaturen ab. Diese können für das Standard-PCR-Programm aus Tabelle 18 entnommen werden können.

Tabelle 18: Standard-PCR Programm

-
- 1. Initiale Denaturierung zum Auftrennen der Sekundärstruktur beider DNA-Stränge (95°C)**
 - 2. 30 Zyklen bestehend aus:**
 - a) Denaturierung (95°C)**
 - b) Annealing (Anlagerung) der spezifischen Oligonukleotide bei ca. 55-60°C**
 - c) Elongation der Primer unter Vorlage des DNA-Gegenstranges bei 72°C**
 - 3. Finale Elongation (72°C)**
-

2.2.1.7.1 Colony-PCR

In der *colony*-PCR kann eine große Anzahl an Bakterienkolonien auf das Vorhandensein der gewünschten Plasmid-DNA getestet werden, um somit eine Selektion der Einzelkolonien vorzunehmen. Die *Colony*-PCR stellt eine Qualitätskontrolle der *E.coli*-Transformation dar.

Für diese Arbeit wurde folgendes Protokoll verwendet:

Von der LB-Agarplatte wurde mit einer Pipettenspitze eine Bakterienkultur aufgenommen und in mit 20 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ vorbereitete PCR-*tubes* übertragen. Die Pipettenspitze mit dem Rest der Bakterienkolonie wurde dann in ein mit flüssigem LB-Ampicillin-Medium (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) befülltes Reaktionsgefäß abgeworfen und über Nacht kultiviert. Diese Übernachtkultur diente als Ausgangsmaterial für die Kontroll-Plasmid-Isolierung bei der Minipräparation.

Die mit 20 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ und dem Teil der Bakterienkultur befüllten PCR-*tubes* wurden für 5 Minuten bei 95°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und anschließend mit 30 μL des PCR-Mastermixes gemischt.

Die Zusammensetzung des PCR-Mastermixes ist der folgenden Tabelle 19 zu entnehmen.

Tabelle 19: PCR-Mastermix

5 μL	DreamTaq Puffer (mit $MgCl_2$)
4 μL	$MgCl_2$
2,5 μL	<i>primer</i> forward (10 pmol Lösung)
2,5 μL	<i>primer</i> reverse (10 pmol Lösung)
1 μL	dNTPs (10 mM)
0,2μL	DreamTaq (5U/ μ L)
14,8 μL	H_2O_{dd}

Anschließend wurden die amplifizierten DNA-Fragmente im Agarosegel kontrolliert, passende Klone für die Minipräparation gewählt und die zuvor in LB-Agar abgeworfenen Pipettenspitzen-Kolonien über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.7.2 Splicing by Overlap Extension-PCR (SOE-PCR)

Die SOE-PCR wurde angewendet, um aus der cDNA des humanen IL-23R die jeweils um 10 AS verkürzten Deletionsvarianten zu generieren. Durch spezifische *primer* wurden zunächst jeweils zwei Fragmente A und B erzeugt, die links und rechts neben der Deletion lagen. Dabei überlagern sich die inneren beiden *primer*. Anschließend wurden diese in einer zweiten PCR fusioniert. Abbildung 5 zeigt den Ablauf der SOE-PCR.

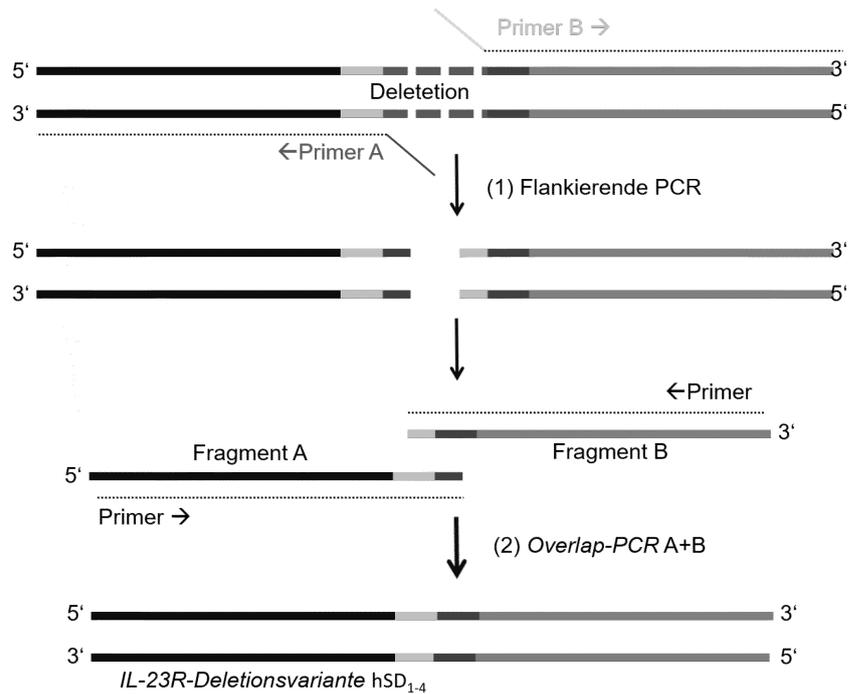


Abbildung 5: SOE-PCR am Beispiel der IL-23 Deletionsvarianten

Zunächst wurden in getrennten PCR-Ansätzen die Fragmente A und B mittels PCR mit entsprechenden *primern* amplifiziert. Als DNA *template* diente dabei die cDNA des humanen IL-23R. Für die SOE-PCR wurden *primer* genutzt, die Überlappungen in der Sequenz mit den zu fusionierenden DNA-Strängen beinhalten, so dass sie einen Überhang bilden, der komplementär zu dem an die Deletion grenzenden Bereich war. Anschließend wurden die Fragmente A und B mittels *overlap*-PCR fusioniert und in einem weiteren Schritt amplifiziert, so dass der resultierende DNA-Strang mit der Deletion (hSD₁₋₄) vorlag.

Die Nukleotidsequenzen der verwendeten *primer* und das verwendete PCR-Programm sind Tabelle 13 und Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle 20: PCR-Ansatz der flankierenden-PCR

1 μ L	Template-DNA
10 μ L	HF-Puffer
2,5 μ L	<i>primer</i> forward (10pmol Lösung)
2,5 μ L	<i>primer</i> reverse (10pmol Lösung)
1 μ L	dNTPs (10mM)
1 μ L	Phusions-Polymerase (2,5 u/ μ L)
32 μ L	H ₂ O _{dd}

Im Rahmen der Fusions-PCR wurden die Fragmente A und B als *template* genutzt und *forward* bzw. *reverse primer* verwendet, um die entsprechenden Abschnitte zu amplifizieren.

2.2.1.8 Dephosphorylierung

Um eine Religation von geschnittenen Vektoren zu verhindern, wurden die 5'-Enden dephosphoryliert. Dies geschah unter Verwendung der alkalischen Phosphatase (*FastAPTM*) bei 37°C für 60 min. Anschließend wurde die Phosphatase bei 65 °C für 10 min inaktiviert.

2.2.1.9 Phosphorylierung

Um DNA- und RNA-Fragmente mit fehlender 5'-Phosphat-Gruppe für eine Ligation verwenden zu können, wurde eine T4-Polynucleotid-Kinase eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde dabei mit T4-DNA-Ligasepuffer und der PNK versetzt und bei 37 °C für 30 min und anschließend bei 75 °C für 5 min inkubiert.

2.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation von Vektor und entsprechendem DNA-Fragment (*insert-DNA*) kommt es unter ATP-Hydrolyse zur Ausbildung von Phosphodiesterbindungen. Als Katalysator diente hierbei die T4-DNA-Ligase. Die Menge der benötigten *insert-DNA* im Verhältnis zur eingesetzten Vektor-Menge wurde anhand folgender Formel bestimmt:

$$\frac{5xMasse\ Vektor\ [ng] \times Länge\ insert\ [bp]}{Länge\ Vektor\ [bp]}$$

Ein Ligationsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

50-100 ng	Vektor
5x	molekularer Überschuss an insert-DNA
2 µl	T4 DNA-Ligase-Puffer
2 µl	T4-DNA-Ligase
2 µl	PEG 4000 (nur bei <i>blunt-end</i> -Ligation)
Ad 20 µl	H ₂ O

Der Ligationsansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht inkubiert und anschließend 10 µl in kompetente E.coli Zellen transformiert (vgl. Kapitel 2.2.1.2).

2.2.1.11 DNA Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Seqlab in Göttingen durchgeführt.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Passagieren von Zellen

Das Passagieren von Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer zuvor desinfizierten Sicherheitswerkbank der Stufe 1 mit laminarer Luftströmung.

Die verwendeten Zelllinien sind Tabelle 1 zu entnehmen und wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), *high glucose culture medium* mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 60 mg/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin (DMEM^{+/+}) bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

COS-7-Zellen sind adhärente Zellen und müssen, bevor sie auf eine neue Zellkulturschale übertragen werden, von der Zellkulturschale gelöst werden. Zunächst wurde das überstehende DMEM^{+/+} abgesaugt und die Zellen mit 10 ml Phosphate-Buffered-Saline (PBS) gewaschen. Das PBS senkt die Zell-Zell-Adhäsion und dient dazu, die abgestorbenen Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Das PBS wurde anschließend wieder entfernt und die Zellen mit 2 ml Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (Trypsin-EDTA) für 5 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Trypsin-EDTA sorgt für einen enzymatischen Verdau der extrazellulären Matrix. Dadurch lösen sich die Zellen vom Boden und die interzellulären Verbände werden aufgelöst. Die Zellen lagen danach vereinzelt vor. Zur Antagonisierung des Trypsins wurden 8 ml DMEM^{+/+} hinzugefügt und jeweils ein Aliquot der Zellen auf eine neue Kulturschale mit 10 ml Medium übertragen.

Phoenix-Eco-Zellen wurden mit PBS von der Zellkulturschale gelöst und im Verhältnis 1:50 passagiert.

Ba/F3-Zellen sind murine pro-B-Zellen, die nur in Anwesenheit von IL-3 proliferieren. Nach Elektroporation der Zellen mit der cDNA für das humane gp-130-Protein wachsen diese Zellen auch in Anwesenheit von Hyper-IL-6 (HIL-6) (75). HIL-6 ist ein

Designerzytokin, das aus dem löslichen IL-6-Rezeptor (IL-6R) und IL-6 besteht (76). Die Ba/F3-gp130-Zelllinie lag in der AG Scheller bereits vor.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Zellen wurden mit den Selektionsantibiotika in 10 ml DMEM^{+/+} kultiviert und wöchentlich bei einer Konfluenz von 70-90 % gesplittet. Hierfür wurden 1 µL der Ba/F3 Zelllinien auf eine neue Petrischale mit 10 ml DMEM^{+/+} überführt. Als Selektionsantibiotikum wurden für die IL-12Rβ1 Varianten Hygromycin-B (1 mg/ml) und für die IL-23R Varianten Puromycin (1,5 µg/ml) verwendet. Die Inkubation erfolgte im CO₂-Inkubator.

2.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden mit Hilfe der Neubauer Zählkammer manuell oder automatisiert mit dem *TC10 Automated Cell Counter* gezählt. Für die manuelle Zählung wurden 10 µl der Zelllösung mit 10 µl *Tryptan-Blau* gemischt und 10 µl in die Neubauer Zählkammer pipettiert. Das Tryptan-Blau färbt abgestorbene Zellen blau an, so dass nur die lebenden, ungefärbten Zellen unter dem Mikroskop in zwei 16er Großquadraten ausgezählt wurden und anschließend die Zellzahl über folgende Formel ermittelt werden konnte:

$$\frac{\Sigma \text{ der gezählten 16er Quadrate}}{2} \times a \times b = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

a= Verdünnungsfaktor

b = Kammerfaktor (10⁴)

Bei der automatischen Zellzählung wurden 10 µl der Zelllösung mit 10 µl *Tryptan-Blau* angefärbt und anschließend 10 µl in *TC10 System Counting Slides Dual Chamber* pipettiert. Die Bestimmung erfolgte dann maschinell mittels *TC10 Automated Cell Counter*.

2.2.2.3 Transfektion von adhärennten Zellen

Um die Aufnahme der DNA in eukaryotische Zellen zu gewährleisten, wurde *TurboFect™* der Firma Thermo Scientific verwendet. *TurboFect™* vereinfacht durch Komplexbildung mit der negativ geladenen DNA die Aufnahme in die Zelle.

Am Vortag wurden die adhärennten Zellen auf neue Platten ausgesät, um am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70-90 % zu erreichen. Dazu wurden die COS-7-Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA wie unter Punkt 2.2.2.1 beschrieben in 10 ml PBS gewaschen, von der Platte abgelöst, in DMEM^{+/+} Medium überführt und mittels *TC10 Automated Cellcounter* gezählt. Die *Phoenix-Eco*-Zellen wurden mit PBS von der Zellkulturschale

gelöst und ebenfalls gezählt. Um die benötigte Konfluenz am Folgetag zu erreichen, wurden je 1×10^6 Zellen der *COS-7*-Zellen bzw. 8×10^5 *Phoenix-Eco*-Zellen auf eine 10 cm Schale bzw. in eine Vertiefung der 6-*well*-Platten mit 2 ml DMEM^{+/+} ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden 5 μ g der Plasmid-DNA mit 1 ml DMEM^{-/-} und 10 μ l *TurboFect*TM für 20 min bei RT inkubiert und anschließend tröpfchenweise zu den *COS-7*-Zellen gegeben. Nach 6 h wurde das Medium entfernt und 10 ml DMEM^{+/+} hinzugegeben.

Für die *Phoenix-Eco*-Zellen wurde 1 μ g Plasmid-DNA verwendet, die mit 2 μ l *TurboFect*TM und 200 μ l DMEM^{-/-} gemischt wurden. Auch diese Komponenten wurden nach 20-minütiger Inkubation bei RT tröpfchenweise auf die am Vortag ausgesäten *Phoenix-Eco*-Zellen in die Vertiefung der 6-*well*-Platten gegeben. Nach 6 h erfolgte ebenfalls ein Mediumwechsel, wobei das DMEM^{+/+} hierfür mit 30% FCS versetzt war.

2.2.2.4 Retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen

Um stabile *Ba/F3*-gp130-Zellen mit humanen oder murinen IL-23 Rezeptorvarianten zu generieren, wurde die retrovirale Transduktion angewendet. Dabei wurden zunächst *Phoenix-Eco*-Zellen wie unter Pkt. 2.2.2.3 beschrieben mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert. Am Tag der retroviralen Transduktion wurden mittels kurzer Zentrifugation bei 2000 rpm und RT, Zelltrümmer der *Phoenix-Eco*-Zellen entfernt und jeweils 250 μ l des entstandenen Überstands zu den *Ba/F3*-gp130-Zellen gegeben. Zuvor wurden die *Ba/F3*-gp130-Zellen auf 2×10^6 Zellen/ml konzentriert und davon 50 μ l pro Transduktionsansatz verwendet. Nach Zugabe von 3 μ l *Polybrene* (Sigma Aldrich, 800 μ g/ml) wurden die Zellen für 2 h bei RT und 1800 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 5 ml DMEM^{+/+} resuspendiert und auf 6-*wells* verteilt. Um die Proliferation der Zellen zu gewährleisten, wurden pro *well* 0,5 μ l HIL-6 (Stockkonzentration: 100 ng/ μ l) hinzugefügt.

Als Positivkontrolle wurden *Ba/F3*-gp130-Zellen mit dem Plasmid pMOWS-puro-GFP transduziert, welche bei erfolgreicher Transduktion zur Expression von GFP führt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen ohne Plasmid-DNA transduziert. Beide Varianten wurden nach zweiwöchiger Selektion unter dem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

Die retroviralen Expressionsvektoren enthielten jeweils ein Antibiotikaresistenzgen. Das entsprechende Selektionsantibiotikum Hygromycin-B (IL-12R β 1) bzw. Puromycin (IL-23R) wurde 48 h nach der retroviralen Transduktion hinzugegeben und die Zugabe über mindestens zwei Wochen fortgeführt.

2.2.2.5 Nachweis der Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie

Die Oberflächenexpression der Rezeptoren auf den generierten Ba/F3-gp130-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft. Dabei werden Zellen anhand der Emission optischer Signale beim Passieren eines Laserstrahls analysiert. Als Referenzwert wurde die Emission der mit den entsprechenden AK gefärbten Ba/F3-gp130-Zellen verwendet, die weder den IL-23R noch den IL-12R β 1 exprimierten.

Die Zellen wurden hierfür mit spezifischen AK (siehe Tabelle 12) gefärbt. Dazu wurden je 5×10^5 Zellen mit 100 μ l FACS-Puffer (PBS mit 1 % BSA) gewaschen und entsprechend der nachzuweisenden Rezeptoren mit je 100 μ l FACS-Puffer und entsprechendem AK für 2 h auf Eis (IL-23R) oder bei 4 °C im Dunkeln (IL-12R β 1) inkubiert. Die AK gegen IL-12R β 1 waren direkt mit dem Fluorophor gekoppelt und benötigten keinen zweiten AK zur Detektion. Die IL-23R-Varianten mussten hingegen vor dem Nachweis nochmals mit 100 μ l FACS-Puffer gewaschen und anschließend für eine weitere Stunde mit einem zweiten AK im Dunkeln bei 4 °C inkubiert werden.

Abschießend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, in 500 μ l FACS-Puffer resuspendiert und im FACS-Gerät (FACS Cantoll, BD) analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der FCS Express Software (DeNovo Software, Los Angeles, CA, USA).

2.2.2.6 Zellproliferationsassay

Um das Proliferationsverhalten der generierten Ba/F3-gp130-Zelllinien mit entsprechenden Rezeptoren unter Zytokinstimulation zu analysieren, wurde der *CellTiter-Blue Cell Viability Assay* (Promega) angewendet. Dabei wurde Resazurin als Redox-Indikator eingesetzt. Resazurin wird von normal arbeitenden Zellen irreversibel zu pinkfarbendem, fluoreszierendem Resorufin umgesetzt. Dieser Umsatz wurde mittels Fluoreszenzmessung bestimmt und der Farbumsatz galt als Indikator für die Vitabilität der Zellen. Die Messung erfolgte bei 590 nm im Platerader (Infinite M200pro, Tecan). Zur Vorbereitung der Messung wurden die Ba/F3-gp130-Zellen 72 h zuvor dreimal mit sterilem PBS gewaschen (5 min, RT, 1500rpm), anschließend in DMEM^{+/+} resuspendiert und auf eine Zellzahl von 5×10^4 pro ml eingestellt. Jeweils 5000 Zellen wurden dann in die Vertiefungen einer 96-well-Platte gegeben und mit dem entsprechenden Zytokin versetzt. Für jede Variante wurde, um die Genauigkeit der Messung zu erhöhen, eine Dreifachbestimmung vorgenommen und die Werte gemittelt. Nachdem die Platten für drei Tage bei 5 % CO₂ und 37°C inkubiert wurden, wurde je 20 μ l/well des *Cell-Titer-Blue-Reagents* hinzugefügt. Unmittelbar nach Zugabe des Reagenzes erfolgte die

Messung zum Zeitpunkt 0. Anschließend wurde alle 20 min bis max. 120 min gemessen. Nach Abzug des Messwertes zum Zeitpunkt 0 wurde für eine bessere Vergleichbarkeit der verschiedenen Zelllinien die Proliferation unter HIL-6 auf 100% gesetzt.

2.2.2.7 Ba/F3 Stimulationstest

Zur Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion wurde die Aktivierung von STAT3 in den stimulierten Ba/F3-gp130-Zellen nachgewiesen. Dabei wurden die Zellen zunächst dreimal mit sterilem PBS gewaschen (1500 rpm, 5 min, RT) und anschließend in DMEM^{-/-} für 4 h inkubiert (*starving*). Nachfolgend wurden die Zellen für 15 min mit HIL-23 oder ohne Zytokin stimuliert. Die Zellernte erfolgte nach Ablauf der Inkubationszeit mittels Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm. Das resultierende Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die eingefrorenen Zellen wurden mittels Lysepuffer (vgl. Tabelle 5) lysiert (siehe Punkt 2.2.3.1) und anschließend der Proteingehalt mittels BCA-Methode (siehe Punkt 2.2.3.2) nach Pierce laut Herstellerangaben bestimmt.

Die STAT3-Aktivierung wurde im Western Blot (siehe Punkt 2.2.3.3) analysiert. Dabei wurden AK verwendet, die gegen das phosphorylierte STAT3 Protein gerichtet waren (siehe Tabelle 12).

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Proteinlysaten

Transduzierte Ba/F3-Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Herstellung der Proteinlysate bei -80°C aufbewahrt. Die eingefrorenen Zellen wurden anschließend mit Lyse Puffer versetzt, resuspendiert und unter ständigem Rollen bei -4°C für 2 h lysiert. Das so entstandene Zelllysate wurde mittels Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, 4°C) geerntet und in einem neuen 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß mit Lämmli-Puffer versetzt. Die Analyse der Zelllysate erfolgte im Western Blot.

2.2.3.2 BCA-Testung

Zur Quantifizierung von Proteinen wurde der BCA-Protein-Assay der Firma Pierce, Thermo Scientific verwendet. Zelllysate wurden nach Herstellerangaben in 96-well-Platten analysiert. Bei der BCA-Reaktion wurde über die in Anwesenheit von Proteinen stattfindende Umwandlung von zweiwertigem Kupfer zu einwertigem Kupfer die Proteinkonzentration bestimmt. Die Reaktion der in dem Kit enthaltenem

Bicichoninsäure (BCA) mit dem entstandenen reduzierten Kupfer führte zu einem Farbumschlag. Dieser Farbumschlag wurde bei 562 nm gemessen und dessen Absorption war proportional zur Proteinkonzentration. So konnte über vergleichende Eichgerade mit BSA die Proteinkonzentration berechnet werden.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Proteine wurden mittels *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) anhand ihres Molekulargewichtes von einander getrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Western Blot wird die Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Membran bezeichnet. Abschließend wurden die Proteine mittels spezifischer AK nachgewiesen. Durch ein *stripping* der Membran wurden die AK wieder entfernt und die Membran konnte mit einem weiteren spezifischen AK erneut inkubiert werden.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese wurden diese mit 5x Lämmli-Puffer versetzt und bei 95 °C für 10 min inkubiert. Das in dem Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol sorgt für ein Auflösen der Disulfidbrücken und anschließendes Erhitzen zerstört die Proteinstruktur. Beide Schritte dienen dazu, dass die Proteine linearisiert vorliegen.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese fand mit 10 %igen Gelen in einer denaturierenden, diskontinuierlichen SDS-PAGE statt. Das Gel bestand aus einem Trenngel und einem Sammelgel, die sich in pH-Wert und Porengröße voneinander unterschieden (siehe Tabelle 6). An die Gele wurde eine kontinuierliche elektrische Spannung von 95 V angelegt, die zu einer Größentrennung des Proteingemisches führte. Für die Proteingrößenbestimmung wurde neben den Proben ein *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* der Firma Thermo Scientific mit bekannten Molekulargrößen aufgetragen.

Proteintransfer (Western Blot)

Die voneinander getrennten Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde diese zuvor für 2 min in Methanol inkubiert. Parallel dazu wurde

blotting Papier in Transfer-Puffer (siehe Tabelle 5) inkubiert. Die Komponenten wurden dann in einem Trans-Blot-Turbo-Behälter wie in Abb. 6 gezeigt geschichtet.

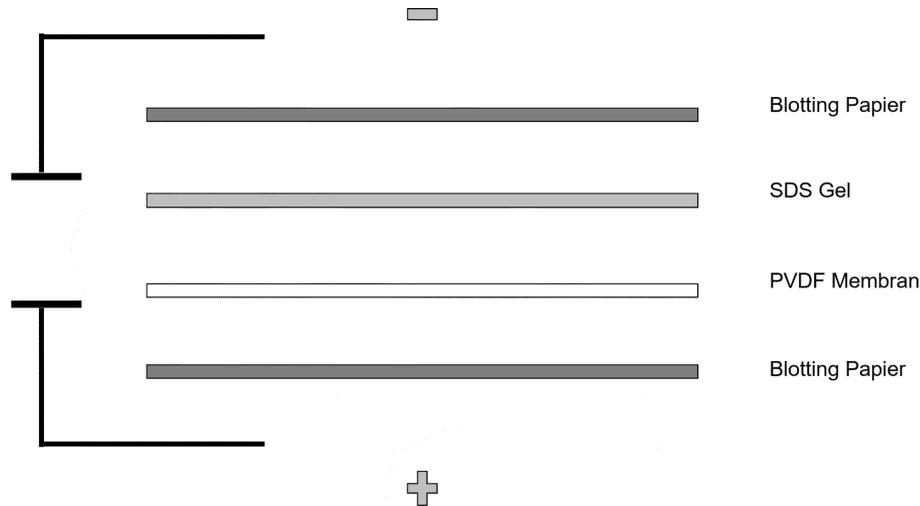


Abbildung 6: Aufbau des semi-dry Western Blot Verfahrens

Eine Schicht besteht aus vier Lagen Whatman *blotting* Papier, gefolgt von der aktivierten PVDF-Membran, dem SDS-Gel und abschließend nochmals vier Lagen Whatman *blotting* Papier. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte durch das Anlegen einer Spannung von 20 V für eine Stunde bei RT.

Immunologischer Nachweis der Proteine

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran nach dem Transfer für 2 h in TBST-T in 5 % Milch (TBS-T) inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und mit dem primären AK in entsprechender Konzentration über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde der primäre AK entfernt, die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und für 1,5 h mit dem sekundären AK inkubiert. Dieser sekundäre AK ist gegen den primären AK gerichtet und mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die PVDF-Membran erneut gewaschen (zweimal mit TBS-T, einmal mit TBS) und die gebundenen AK mittels der ECL-Reagenzien der Firma HE Healthcare unter dem *INTAS Chemo Cam Imager* sichtbar gemacht. Hierfür wurden je 400 μ l der Reagenzien 1:1 gemischt und für eine Minute auf die PVDF-Membran gegeben, bevor die Lichtemission, die bei der Reaktion der am AK gebundenen Peroxidase mit dem ECL entsteht, mit dem *INTAS Chemo Cam Imager* detektiert wurde.

Die AK wurden entsprechend der Herstellerangaben entweder in 1 % BSA oder in 5%-Milch-TBS-T gelöst.

2.2.3.3.1 *Stripping* der PVDF-Membran

Um die PVDF-Membran ein weiteres Mal zu verwenden und mit Hilfe eines anderen Antiköpers weitere Proteine zu visualisieren, mussten zunächst die zuvor verwendeten AK entfernt werden. Dies erfolgte durch 30-minütiges Inkubieren der Membran in *stripping*-Puffer bei 60 °C. Die Zusammensetzung des *stripping*-Puffers ist Tabelle 5 zu entnehmen. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit 5 % Milch-TBS-T geblockt und anschließend mit einem anderen AK inkubiert.

2.2.3.4 **Proteinpräzipitation (PP)**

Um das Bindungsverhalten des Zytokins an den Rezeptorvarianten zu prüfen, wurde eine Proteinpräzipitation (PP) durchgeführt. Hierfür wurden Lysate von Zytokinrezeptor- und Zytokin-exprimierenden Zellen hergestellt, wobei das Zytokin als Fc-Fusionsprotein HmIL-23-Fc (HIL-23Fc) vorlag. Dieses Protein wird von Protein-A-Sepharose mit hoher Affinität über den Fc-Teil gebunden und konnte somit anschließend über Zentrifugation isoliert werden. Der Proteinnachweis erfolgte im Western Blot. Zelllysate wurden wie unter Punkt 2.2.3.1 beschrieben hergestellt.

Für die Proteinpräzipitation wurden 250 μ l des Zytokinrezeptorlysats mit 100 μ l Zytokinlysat vereinigt und über Nacht bei 4 °C und Rotation inkubiert. Als Negativkontrolle wurden ebenfalls alle Lysate nur mit Lysepuffer versetzt. Jeweils 50 μ l der Lysate wurden als Input-Kontrolle mit 10 μ l Lämmli-Puffer versetzt. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 50 μ l Protein-A-Sepharose pro Ansatz. Diese wurde zuvor zweimal mit IP-Puffer gewaschen und ebenfalls über Nacht equilibriert. Die Inkubation der Proben mit der Protein-A-Sepharose erfolgte für 4 h bei 4 °C und Rotation. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Protein-A-Sepharose durch Zentrifugation (300 rpm, 4 °C, 5 min) pelletiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und die Sepharose-*Beads* fünfmal mit IP-Puffer gewaschen. Dabei wurden ungebundene Proteine entfernt. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand restlos entfernt, das Protein-A-Sepharose-Pellet in 50 μ l 5x Lämmli-Puffer resuspendiert und bei 95 °C für 10 min gekocht. Der Proteinnachweis erfolgte anschließend im Western Blot.

3 Ergebnisse

3.1 Die Deletion des murinen IL-23R *stalks* führt zu einer Zytokin-unabhängigen Aktivierung des Rezeptors

3.1.1 Generierung stabiler muriner Ba/F3-gp130 Zelllinien

Ausgangspunkt dieser Dissertation waren die Ergebnisse der Masterarbeit von Gregor Ciupka (73). Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden Ba/F3-gp130-Zelllinien generiert, die neben dem murinen IL-12R β 1 unterschiedliche murine IL-23R Varianten mit verkürzten *stalk* Regionen besaßen.

Der IL-23R besitzt eine 37 AS lange *stalk* Region beim Menschen und eine 36 AS lange *stalk* Region bei Mäusen, die als Abstandhalter fungieren könnten, um die Cytokin-Bindungsdomänen im richtigen Abstand von der Plasmamembran zu positionieren und eine Signaltransduktion zu ermöglichen.

Die Transmembranregion beginnt vermutlich bei der AS I₃₅₄ oder G₃₅₅ im humanen und bei der AS I₃₇₃ oder G₃₇₄ im murinen IL-23R. In Analogie zu anderen Zytokinrezeptoren wurde die letzte Aminosäure der D3-Domäne als P₃₁₆ in hIL-23R vorausgesetzt und die 37 AS lange *stalk* Region des hIL-23R von E₃₁₇ bis D₃₅₃ definiert.

Die Differenzierung ist durch eine 20 AS lange Duplikatur am C-terminalen Ende der Domäne D3 für den murinen IL-23R komplizierter. Die Duplikatur umfasst das Sequenzmotiv WQPWS, das der Zytokinrezeptorsignatur WSXWS (30) ähnlich ist und eine Rolle in der Proteinfaltung spielen könnte (79). Derzeit ist unbekannt, ob diese Sequenz zu D3 oder der *stalk* Region gehört. In dieser Dissertation wurde S₃₁₆ (Ende D3) bzw. S₃₃₆ (Ende der Duplikatur in D3) als letzte Aminosäure der Domäne D3 festgelegt. Folglich sind zwei *stalk* Varianten möglich: eine klassische 36 AS lange *stalk* Region von Q₃₃₇ bis D₃₇₂ und eine erweiterte 56 AS lange *stalk* Region von Q₃₁₇ bis D₃₇₂, einschließlich der Duplikatur.

Um die funktionelle Bedeutung der Länge der *stalk* Region zu untersuchen wurden Abschnitte von jeweils 10, 20 und 30 AS der 36 AS langen murinen IL-23 *stalk* Region deletiert (mIL-23R Δ 363-372, mIL-23 Δ 353-372, mIL-23R Δ 343-372) sowie der komplette klassische *stalk* inklusive vier AS der Duplikatur (mIL-23R Δ 333-372), der klassische *stalk* inklusive Duplikatur (mIL-23R Δ 317-372) und nur die Duplikatur bei erhaltenem *stalk* deletiert (mIL-23R Δ 317-336). Darüber hinaus wurde eine Variante erstellt, die den im hIL-23R vorkommenden SNP, einen Austausch der Aminosäure Prolin an Position

310 gegen Leucin imitiert: mL-23 Δ 317-336-P310L. Die murine IL-23R Wildtyp-Variante sowie die generierten Deletionsvarianten sind in Abbildung 7 dargestellt. Die Klonierung der Deletionsvarianten erfolgte bereits durch Gregor Ciupka. Die von ihm erzeugten Expressionsplasmide wurden in dieser Arbeit verwendet.

	D3 Region	stalk-Region
Murin WT	...VRCQETGKRN <u>WQPWSSPFVHQTS</u> -QETGKRN <u>WQPWSSPFVHQTS</u> QTVSQVTAKSS-HEPQKMEMLSATIFRGHPASGNH-QD IGLLS...	
Δ 363-372	...VRCQETGKRN <u>WQPWSSPFVHQTS</u> -QETGKRN <u>WQPWSSPFVHQTS</u> QTVSQVTAKSS-HEPQKMEMLSATIFR----- IGLLS...	
Δ 353-372	...VRCQETGKRN <u>WQPWSSPFVHQTS</u> -QETGKRN <u>WQPWSSPFVHQTS</u> QTVSQVTAKSS-HEPQK----- IGLLS...	
Δ 343-372	...VRCQETGKRN <u>WQPWSSPFVHQTS</u> -QETGKRN <u>WQPWSSPFVHQTS</u> QTVSQV----- IGLLS...	
Δ 333-372	...VRCQETGKRN <u>WQPWSSPFVHQTS</u> -QETGKRN <u>WQPWSSPFV</u> ----- IGLLS...	
Δ 317-372	...VRCQETGKRN <u>WQPWSSPFVHQTS</u> ----- IGLLS...	
Δ 317-336	...VRCQETGKRN <u>WQPWSSPFVHQTS</u> -----QTVSQVTAKSS-HEPQKMEMLSATIFRGHPASGNH-QD IGLLS...	
Δ 317-336		
P310L	...VRCQETGKRN <u>WQPWSS</u> L ₃₁₀ <u>FVHQTS</u> -----QTVSQVTAKSS-HEPQKMEMLSATIFRGHPASGNH-QD IGLLS...	

Abbildung 7: Schematische Darstellung der murinen IL-23R-stalk-Deletionsvarianten

Die Domäne 3 ist anteilig in grün dargestellt und die 20 AS lange Duplikatur des murinen IL-23 Rezeptors ist unterstrichen. Die 36-AS-lange *stalk* Region ist in schwarz und die Transmembrandomäne in lila erkennbar. Die alternative 56 AS lange *stalk* Region umfasst die in grau und schwarz dargestellten AS. Die murinen Deletionsvarianten enthielten einen um 10, 20 bzw. 30 AS verkürzten *stalk*: mL-23R Δ 363-372, mL-23R Δ 353-372, mL-23R Δ 343-372 sowie eine *stalk* Deletion mit anteiliger Deletion in D3: mL-23R Δ 333-372. Lediglich die Varianten mL-23R Δ 317-336 und mL-23R Δ 317-336 P310L wiesen eine dem WT-entsprechende *stalk* Region mit einer Länge von 36 AS auf, unterschieden sich von dieser aber durch eine Deletion der repetitiven Sequenz innerhalb der Domäne 3 (Δ 317-336) oder durch den Austausch der AS Prolin an Position 310 durch Leucin (Δ 317-336 P310L).

Um den Einfluss der Deletion der *stalk* Region auf die IL-23R vermittelte Signaltransduktion zu analysieren, wurden Zellen der murinen Pro-B-Zelllinie Ba/F3-gp130 verwendet. Ba/F3-Zellen sind eine frühe Entwicklungsstufe einer lymphoblastischen B-Zelllinie und wurden aus murinem Knochenmark isoliert. Sie sind IL-3 abhängig und eignen sich zur Untersuchung der zytokinvermittelten Signaltransduktion (78, 80). Nach Transduktion mit der cDNA für den IL-6-Co-Rezeptor gp130 waren diese Zellen neben IL-3- auch HIL-6-abhängig (75). Diese Zellen wurden in der AG Scheller bereits mit cDNAs für den mL-12R β 1 und mL-23R transduziert (44). Der schematische Ablauf der Erzeugung einer IL-23 responsiven Ba/F3-gp130 Zelllinie ist Abbildung 8 zu entnehmen.

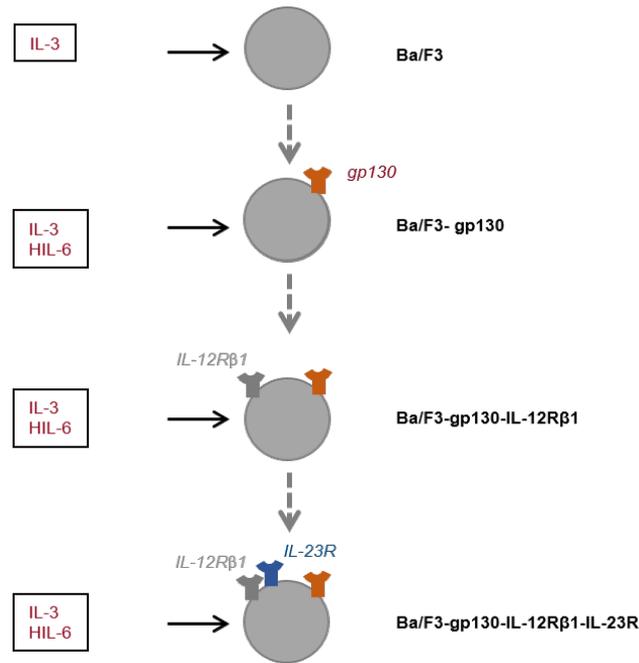


Abbildung 8: Erzeugung von IL-23 responsiven Ba/F3-Zellen

Die nativen Ba/F3-Zellen wurden zunächst mit cDNA für gp130 und anschließend mit der mL-12Rβ1 cDNA retroviral transduziert (44). Weiterhin wurden diese Zellen mit mL-23R cDNA transduziert.

Die Zelllinie Ba/F3-gp130-mL-12Rβ1-mL23R-WT, Ba/F3-Zellen, die den mL-12Rβ1 sowie den mL-23R Wildtyp exprimierten, lagen bereits in der AG Scheller vor und wurden mit HIL-6 kultiviert (44). HIL-6 ist ein Designerzytokin, das aus dem löslichen IL-6 Rezeptor und dem Zytokin selbst besteht. Die Untereinheiten sind über *linker* miteinander verbunden (75).

Die mit dem mL-12Rβ1 transduzierten Zellen wurden schließlich mit der cDNA der mL-23R Deletionsvarianten, die bereits in der AG Scheller in dem retroviralen Vektor pMOWS-puro vorlagen, transfiziert. Somit entstanden Ba/F3-Zelllinien, die neben gp130 den murinen IL-12Rβ1 und die *stalk* Deletionsvarianten (siehe Abbildung 8) exprimierten.

Die murinen IL-23-Rezeptorvarianten werden auf den generierten Ba/F3-gp130 Zellen exprimiert

Für den Nachweis der Oberflächenexpression der IL-23R tragenden Ba/F3-gp130 Zellen, wurden diese mittels Durchflusszytometrie analysiert. Mit Fluorophoren markierte AK bzw. Sekundärantikörper, die an den IL-23R binden, wurden dabei als Marker verwendet. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse. Auf der x-Achse dargestellt ist die

Intensität der Fluoreszenz, die der Oberflächenexpression der detektierten Rezeptoren entspricht. Die y-Achse ist ein Maß für die Anzahl der analysierten Zellen.

Als Negativkontrolle wurden nicht transduzierte Ba/F3-gp130 Zellen verwendet, die in Abbildung 9 als graue Histogramme dargestellt sind. Die weißen Histogramme bilden die transduzierten Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1 Zellen mit den entsprechenden mIL-23R-Deletionsvarianten ab. Eine Rechtsverschiebung der weißen Histogramme gegenüber der Negativkontrolle entspricht einer positiven Abweichung der Emission und damit einer erfolgreichen Rezeptorexpression.

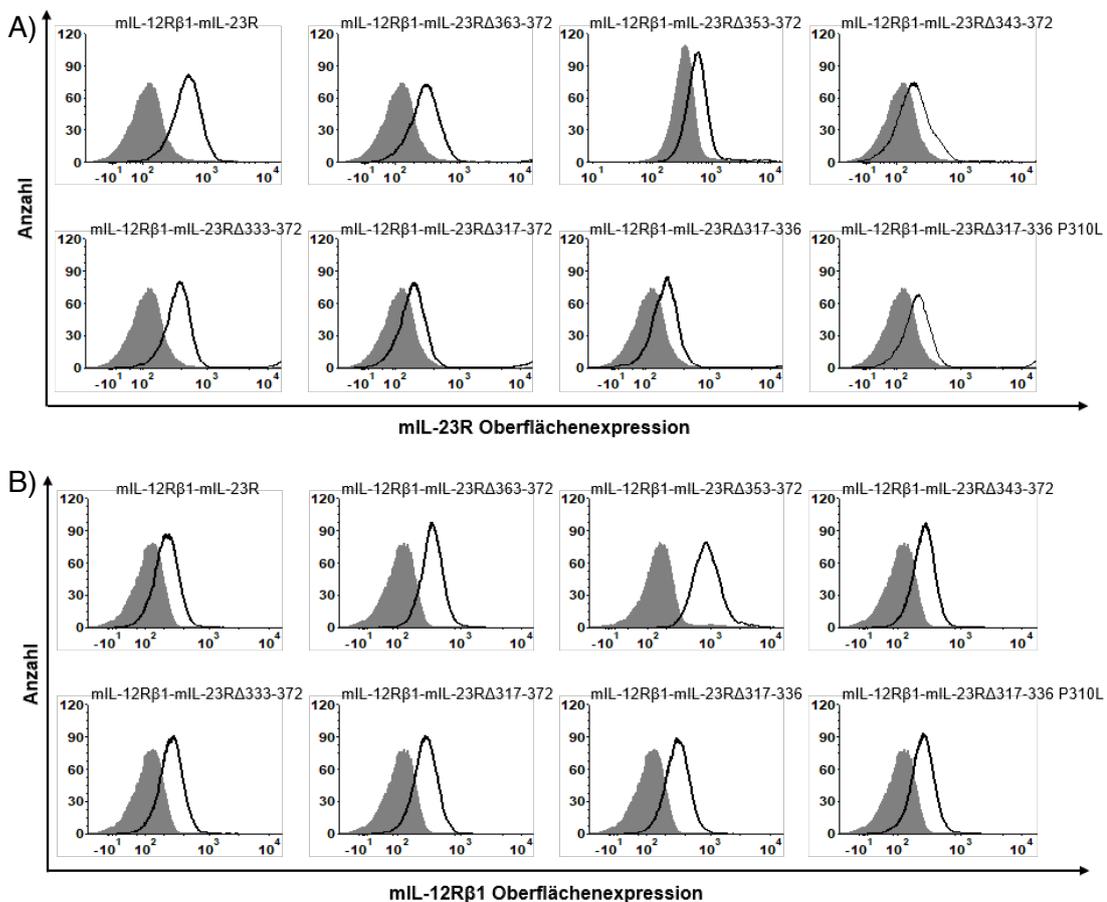


Abbildung 9: Analyse der Oberflächenexpression der verschiedenen Ba/F3-gp130 Zelllinien

Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1 Zellen wurden mit jeweils einer Variante des mIL-23R transduziert und durch das Anfärben mit spezifischen AK und anschließender Durchflusszytometrie analysiert. Die Histogramme zeigen die Oberflächenexpression der A) mIL-23R Varianten sowie des B) mIL-12R β 1. Die Intensität der Fluoreszenz ist auf der x-Achse abgebildet und gilt somit als Maß für die Expression der jeweiligen Rezeptorkette. Die y-Achse zeigt die Anzahl der Zellen, die analysiert wurden. Als Negativkontrolle dienten gefärbte Ba/F3-gp130 Zellen, die als graue Histogramme dargestellt sind. Die weißen Histogramme zeigen die im Rahmen dieser Arbeit generierten IL-23R-Zellen. Die Oberflächenexpression der Rezeptoren spiegelt sich durch die Rechtsverschiebung der weißen Histogramme im Vergleich zur Kontrolle Ba/F3-gp130 wider. n=1.

Die abgebildeten Histogramme der generierten Zelllinien weisen alle eine Verschiebung nach rechts und damit eine Oberflächenexpression der getesteten IL-23-Rezeptoren auf. Eine geringere Verschiebung deutet hierbei auf eine verminderte Oberflächenexpression der jeweiligen IL-23-Rezeptorvariante hin.

3.1.2 Nachweis der biologischen Aktivität der generierten murinen Ba/F3-gp130-IL-23R-Deletionsvarianten

Die Verkürzung des murinen IL-23R stalk führt zu zytokinunabhängiger Zellproliferation

Um den Einfluss der *stalk* Deletion auf das Proliferationsverhalten der verschiedenen Ba/F3-Zelllinien zu analysieren, wurden diese mittels Proliferationsassay analysiert. Ziel der Untersuchung war es, Unterschiede im Proliferationsverhalten der IL-23R-Deletionsvarianten gegenüber der Wildtyp-Variante (WT) herauszustellen und somit Rückschlüsse auf die Funktion der *stalk* Region zu ziehen. Als Wildtyp (WT) werden Ba/F3-gp130 Zellen mit mL-12R β 1 sowie mL-23R ohne *stalk*-Deletion oder andere klonale Veränderungen bezeichnet. Diese Zellen wurden bereits in der AG Scheller generiert (44).

Für die Proliferationsanalyse wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen auf eine 96-well-Platte verteilt und die Proliferation unter HIL-23 Stimulation nach 60 h überprüft. HIL-23 besteht aus p40 und p19, die über einen rekombinanten Peptid-Linker miteinander verbunden sind. HIL-23 wurden als Wachstumsstimulanz zu den Zellen gegeben. Pro Zelllinie wurden drei Stimulationen durchgeführt: ohne Zytokin (Negativkontrolle), mit 0,2 % HIL-6 (Positivkontrolle) sowie mit 0,2 % HIL-23. Die Proben wurden für drei Tage inkubiert und mithilfe des Cell-Titer-Blue® Cell Viability Assay anschließend ausgewertet. Das Ergebnis ist Abbildung 10 zu entnehmen.

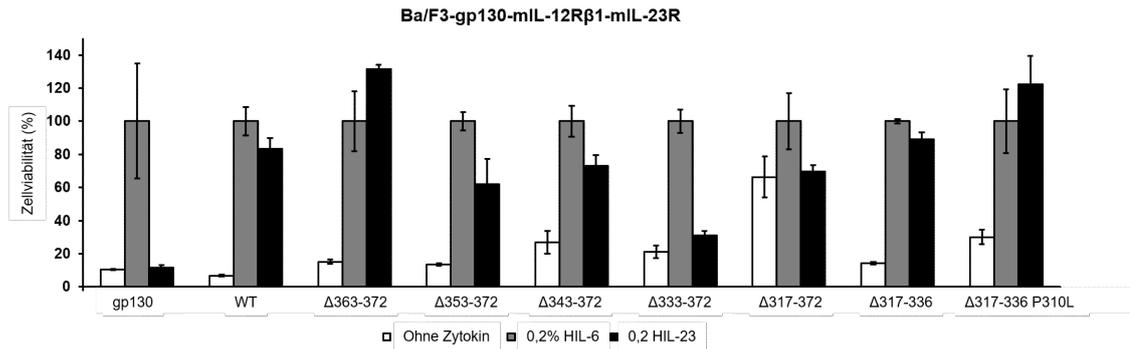


Abbildung 10: Analyse der IL-23-abhängigen Zellproliferation von Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1 Zellen mit verschiedenen IL-23R stalk Deletionsvarianten

Der Proliferationsassay zeigt das HIL-23-abhängige (schwarz) Proliferationsverhalten der murinen IL-23R-Deletionsvarianten im Vergleich zu der Proliferation ohne Zytokin (weiß) und mit HIL-6 (grau). Als Positivkontrolle dienten Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R-Zellen (WT) und als Negativkontrolle Ba/F3-gp130 Zellen. 5×10^3 Zellen wurden für drei Tage mit 0,2 % HIL-23, 0,2 % HIL-6 oder ohne Zytokin inkubiert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Proliferation unter HIL-6 als Bezugsgröße auf 100 % gesetzt. Die Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardabweichung. Das Ergebnis eines repräsentativen Assays ist dargestellt. $n=6$.

Als Kontrollen wurden Ba/F3-gp130 und Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R (WT)-Zellen gewählt. Über das sogenannte IL-6-*trans-signaling* (10) führte die HIL-6 Stimulation zu einer Signaltransduktion und damit zu einer Proliferation aller Ba/F3-gp130-Zelllinien. Diese wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Zelllinien untereinander auf 100 % gesetzt.

Die IL-23-abhängige Proliferation von Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R-Zellen diente als Maßstab für ein uneingeschränktes Proliferationsverhalten. Die Varianten Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R Δ 363-372, Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R Δ 353-372, Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R Δ 343-372 sowie Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R Δ 317-336 und Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R Δ 317-336 P310L zeigten eine HIL-23-abhängige Proliferation, wobei Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R Δ 363-372-Zellen annähernd wie die WT-Zellen proliferierten. Die Varianten Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R Δ 353-372 und Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R Δ 343-372 zeigten eine Abnahme der Proliferation im Vergleich zu den WT-Zellen. Keine Proliferation hingegen war bei Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R Δ 333-372-Zellen nachweisbar. Eine nahezu dem WT-entsprechende Proliferation zeigten die Varianten Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R Δ 317-336 und Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R Δ 317-336 P310L, wobei letztere ebenfalls ein erhöhtes zytokinunabhängiges Proliferationsverhalten zeigte.

Überraschenderweise zeigten sich aber auch Unterschiede im Proliferationsverhalten der Zelllinien in Zytokin-freiem Medium. Ohne Zytokin proliferieren Ba/F3-Zellen normalerweise nicht. Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 317-372-Zellen, die keinen *stalk* und keine WQPWS-Duplikatur haben, zeigten eine im Vergleich zu den anderen Zelllinien erhöhte Proliferation auch ohne Zytokinstimulation.

Eine im Vergleich zu WT-Zellen bereits leicht erhöhte Hintergrundaktivität und damit ein Wachstum der Zellen ohne Zytokinstimulation zeigte sich bereits ab einer *stalk* Deletion von 30 AS (Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 343-372) und ebenfalls bei der Deletionsvariante Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 333-372, die keinen *stalk* aber noch die WQPWS-Duplikatur besitzt.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit konnten die von Gregor Ciupka aufgestellte Schlussfolgerung, dass eine uneingeschränkte Rezeptorfunktion von der Länge der *stalk* Region abhängig ist, bestätigen und erweitern. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen der Länge der *stalk* Region und einer Zytokin-unabhängigen Proliferation. Die Verkürzung der *stalk* Region führt zu einer zytokinunabhängigen Proliferation.

Die Verkürzung des IL-23R stalk führt zu zytokinunabhängiger Aktivierung des STAT3 Signalweges

Die IL-23 induzierte Signaltransduktion erfolgt in der Zelle über eine Aktivierung von JAK2, TYK2 sowie STAT1,3,4 und 5, wobei durch die IL-23R-Untereinheit hauptsächlich STAT3 ligandenabhängig über JAK2 aktiviert wird (30). Die STAT3-Aktivierung ist charakteristisch für IL-23 und kann somit zur Analyse der veränderten Signaltransduktion bei den verschiedenen Deletionsvarianten herangezogen werden. Findet eine Signaltransduktion nach Stimulation mit IL-23 statt, wird STAT3 phosphoryliert und phospho-STAT3 (pSTAT3) kann im *Western Blot* nachgewiesen werden. Dieser Nachweis von pSTAT3 lässt auf die Funktionalität des Rezeptors schließen. Die verschiedenen IL-23R Deletionsvarianten und Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen (WT) wurden unter Verwendung eines Stimulationsassays, wie unter Punkt 2.2.2.7 beschrieben, vorbereitet und analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

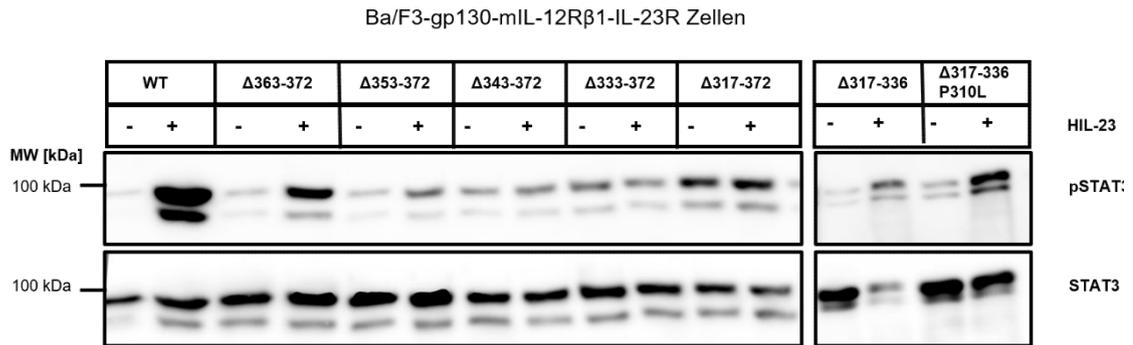


Abbildung 11: STAT3-Aktivierung von stimulierten Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen

Stabil transduzierte Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit PBS gewaschen, für 4 h in serumfreiem Medium inkubiert und im Anschluss mit 0,2 % HIL-23 (10 ng/ml) (+) für 15 min stimuliert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nicht behandelt (-). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, lysiert und gleiche Proteinmengen in die Taschen eines SDS-Gels geladen. Der Nachweis von pSTAT3 und STAT3 erfolgte durch Western Blot. Ein repräsentativer Stimulationstest (n=4) ist gezeigt.

Die Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Deletionsvarianten und WT-Zellen wurden hinsichtlich der IL-23-abhängigen STAT3-Aktivierung untersucht. Die STAT3-Phosphorylierung galt dabei als Indikator für eine uneingeschränkte Signaltransduktion. Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen dienten als Positivkontrolle. Die Deletionsvarianten Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 363-372, Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 317-336 und Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 317-336-P310L zeigten eine IL-23-induzierte STAT3-Phosphorylierung. Diese STAT3-Aktivierung bestätigt die im Proliferationsassay gezeigten Ergebnisse:

Die Deletion der ersten zehn membrannahen AS (Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 363-372) verringert nur geringfügig die STAT3-Phosphorylierung. Wohingegen die Deletion von 20 und 30 transmembrannahen AS (Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 353-372 und Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 343-372) zu einer deutlichen Einschränkung der STAT3-Aktivierung sowie Signaltransduktion führt.

Wie bereits der Proliferationsassay (vgl. Abbildung 10) vermuten ließ, zeigten Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 317-372-Zellen bereits eine erhöhte STAT3-Aktivierung ohne mit dem Zytokin stimuliert worden zu sein. Eine HIL-23-Stimulation dieser Population konnte die STAT3-Aktivierung nicht beeinflussen, so dass eine zytokinunabhängige Aktivierung angenommen werden kann. Die Varianten Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 343-372, Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 333-372 und Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 317-372 zeigten ebenfalls eine im Vergleich zum WT erhöhte zytokinunabhängige STAT3-Aktivierung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine erhöhte zytokinunabhängige Zellaktivierung ab einer *stalk* Deletion von 30 AS auftritt und weder der AS-Austausch an Position 310 oder die reine Deletion der WQPWS-Duplikatur, noch eine Deletion der *stalk* Region von 10 AS einen Einfluss auf die Zellaktivierung haben.

3.2 Die ligandenunabhängige, autonome IL-23R Aktivierung ist unabhängig von dem murinen IL-12R β 1

3.2.1 Erzeugung stabiler muriner Ba/F3-gp130-mIL-23R-Zelllinien

Die murinen Rezeptorvarianten werden auf den transduzierten Co-Rezeptor-defizienten Ba/F3-gp130 Zellen exprimiert

Um zu zeigen, dass die in Punkt 3.1.2 gezeigten Ergebnissen tatsächlich auf die Deletion innerhalb des IL-23R zurückzuführen sind und unabhängig von dem IL-12R β 1 auftreten, wurden Ba/F3-gp130-mIL-23R-Zellen generiert. Diese Zellen exprimierten nur den murinen IL-23R oder die entsprechende Deletionsvariante, nicht aber den murinen IL-12R β 1. Die Zelllinien wurden wie unter Punkt 2.2.2.4 beschrieben mittels retroviraler Transduktion hergestellt. Als Kontrolle wurden Ba/F3-gp130-mIL-23R-Zellen (WT) eingesetzt, die ebenfalls keinen mIL-12R β 1 exprimierten, aber den kompletten IL-23R *stalk* aufwiesen. Die Varianten Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23 Δ 363-372 und Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23 Δ 317-336 P310L zeigten im Proliferationsassay (vgl. Abbildung 10) ein WT-spezifisches Verhalten und wurden hier nicht weiter untersucht. Die Oberflächenexpression wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert und ist in Abbildung 12 dargestellt.

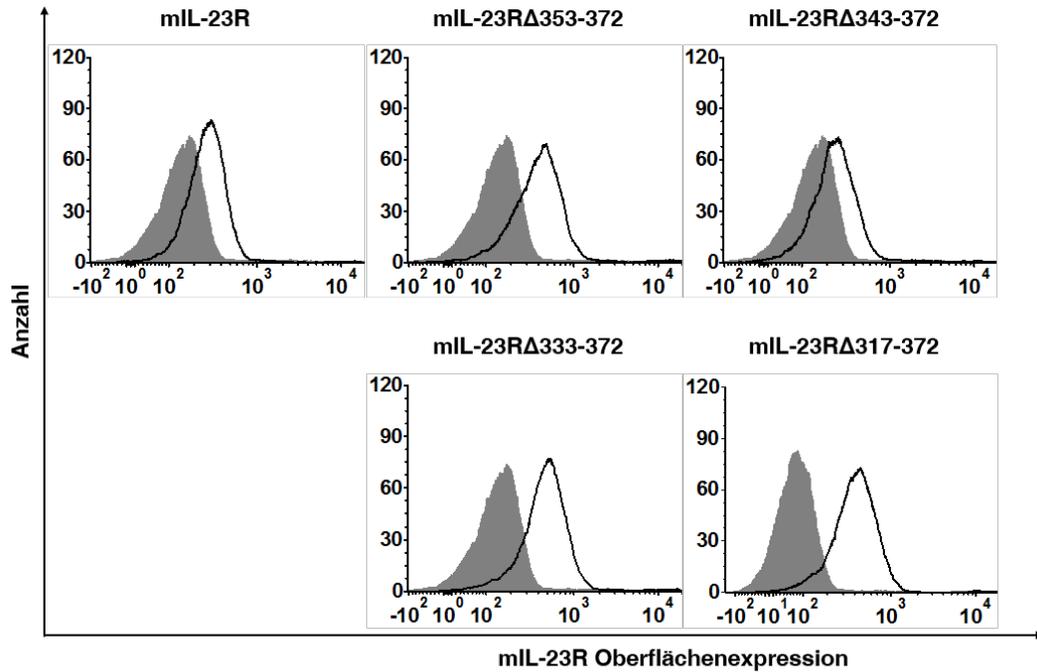


Abbildung 12: Analyse der Oberflächenexpression der Ba/F3-gp130-mIL-23R Zellen mittels Durchflusszytometrie

Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit jeweils einer Variante des mIL-23R sowie des mIL-23R WT transduziert und durch das Anfärben mit spezifischen AK und anschließender Durchflusszytometrie analysiert. Die Histogramme repräsentieren die Oberflächenexpression der mIL-23R-Varianten. Die Intensität der Fluoreszenz ist auf der x-Achse abgebildet und gilt somit als Maß für die Expression der jeweiligen Rezeptorkette. Die y-Achse repräsentiert die Anzahl der Zellen, die analysiert wurde. Als Negativkontrolle dienten gefärbte Ba/F3-gp130 Zellen, die als graue Histogramme dargestellt sind. Die weißen Histogramme zeigen die im Rahmen dieser Arbeit generierten Zellen. Die Oberflächenexpression der Rezeptoren spiegelt sich durch die Rechtsverschiebung der weißen Histogramme im Vergleich zur Kontrolle Ba/F3-gp130 wider. n=1.

Alle weißen Histogramme zeigen einen *shift* nach rechts gegenüber den grauen Histogrammen, welche die Ba/F3-gp130-Zellen repräsentieren. Eine Oberflächenexpression der IL-23-Rezeptoren konnte damit bestätigt werden.

3.2.2 Analyse der biologischen Aktivität der Co-Rezeptor defizienten Ba/F3-gp130-mIL-23R Zellen

Die Verkürzung des IL-23R stalk führt trotz fehlender Expression des Co-Rezeptors mIL-12Rβ1 zu zytokinunabhängiger Proliferation

Um das Verhalten von Ba/F3-gp130-mIL-23R Zellen ohne mIL-12R β 1 Co-Expression unter HIL-23 Stimulation zu untersuchen, wurde ein Proliferationsassay wie unter Punkt 2.2.2.6 beschrieben angesetzt. Die Zellen wurden für drei Tage mit 0,2 % HIL-6, 0,2 % HIL-23 oder ohne Zytokin inkubiert. Das Ergebnis ist Abbildung 13 zu entnehmen. Ba/F3-gp130-mIL-23R-Zellen (WT) und Ba/F3-gp130-Zellen wurden als Kontrollen verwendet.

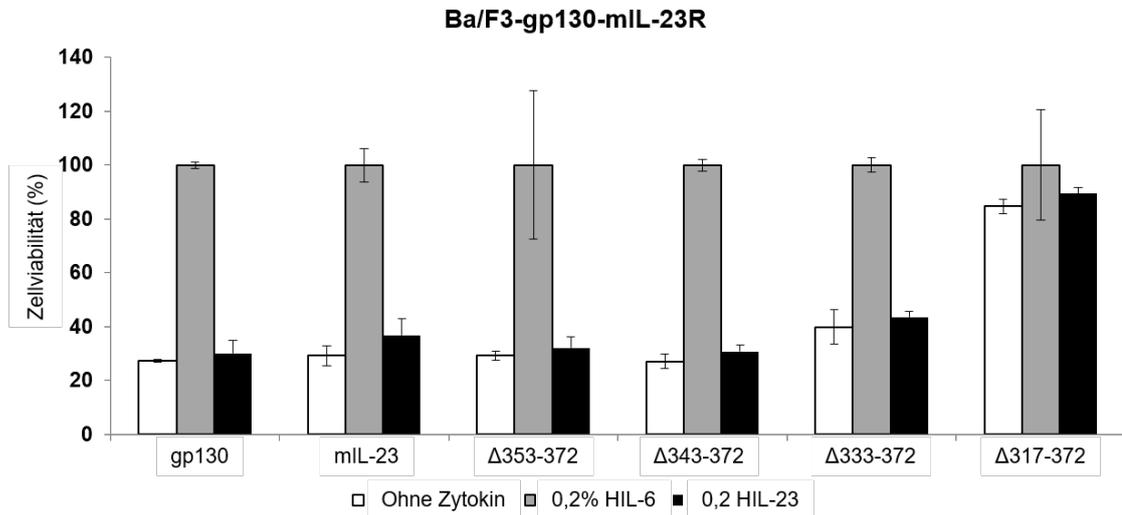


Abbildung 13: Analyse der IL-23-abhängigen Zellproliferation von Ba/F3-gp130-mIL-23R-Zellen mit verschiedenen IL-23R-stalk-Deletionsvarianten

Der Proliferationsassay zeigt das HIL-23-abhängige (schwarz) Proliferationsverhalten der murinen IL-23R-Deletionsvarianten ohne mIL-12R β 1 Co-Expression im Vergleich zu der Proliferation ohne Zytokin (weiß) und mit HIL-6 (grau). Als Positivkontrolle dienten Ba/F3-gp130-mIL-23R-Zellen (WT) und als Negativkontrolle Ba/F3-gp130-Zellen. 5×10^3 Zellen wurden für drei Tage mit 0,2 % HIL-23, 0,2 % HIL-6 oder ohne Zytokin inkubiert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Proliferation unter HIL-6 als Bezugsgröße auf 100% gesetzt. Die Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardabweichung. Das Ergebnis eines repräsentativen Assays ist dargestellt n=3.

Abbildung 13 zeigt deutlich, dass weder Ba/F3-gp130 noch Ba/F3-gp130-mIL-23R-Zellen unter HIL-23 Stimulation proliferieren. Letzteren fehlt der Co-Rezeptor mIL-12R β 1 für die Signaltransduktion. Entsprechend verhalten sich die Deletionsvarianten Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 353-372, Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 343-372 sowie annähernd Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 333-372, wobei sich bei letzterer ein geringer Anstieg der Proliferation ohne Zytokin gegenüber dem Wildtyp zeigte. Signifikant erhöht war hingegen die Proliferation der Deletionsvariante Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 317-372. Die unstimulierten Zellen zeigten ein etwas geringeres Wachstum als das der Kontrollpopulation unter HIL-6 Stimulation, trotz Fehlen des für die Signaltransduktion essentiellen Co-Rezeptors mIL-12R β 1. Die Anwesenheit des Zytokins hatte dabei keinen Einfluss auf das

Proliferationsverhalten. Die Ergebnisse zeigen eine mIL-12R β 1-unabhängige, zytokinunabhängige Aktivierung des murinen IL-23R bei komplett deletierter *stalk* Region inklusive der WQPWS-Duplikatur.

Die Verkürzung des IL-23R stalk führt trotz fehlender Co-Expression des mIL-12R β 1 zu zytokinunabhängiger STAT3-Aktivierung

Ba/F3-gp130-mIL-23R Zellen ohne mIL-12R β 1 Co-Expression wurden auf ihre veränderte Signaltransduktion nach *stalk*-Deletion ebenfalls im STAT3-Assay analysiert. Analog zu Punkt 3.1.2 wurden die Zelllysate der mIL-23R-tragenden Ba/F3-Zellen mittels Immunoblots auf das Vorhandensein von aktiviertem pSTAT3 getestet. Das Ergebnis ist in Abbildung 14 dargestellt.

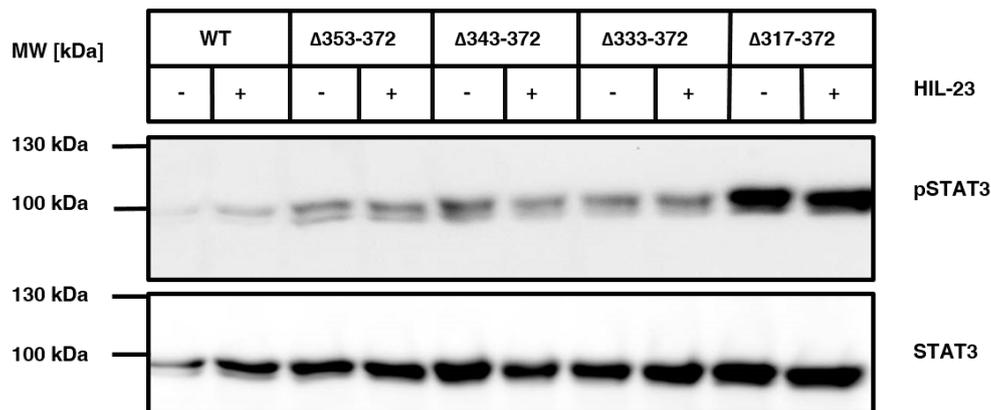


Abbildung 14: STAT3-Aktivierung von stimulierten Ba/F3-gp130-mIL-23R-Zellen mit verschiedenen IL-23R *stalk* Deletionsvarianten

Stabil transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen wurden mit PBS gewaschen, für 4 h in serumfreiem Medium inkubiert und im Anschluss mit 0,2 % HIL-23 (10 ng/ml) (+) für 15 min stimuliert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nicht behandelt (-). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, lysiert und gleiche Proteinmengen in die Taschen eines SDS-Gels geladen. Der Nachweis von pSTAT3 und STAT3 erfolgte durch Western Blot. $n=1$.

Die STAT3-Aktivierung ist sowohl unabhängig von dem Vorhandensein der β -Rezeptorkette mIL-12R β 1, als auch unabhängig von einer Zytokinstimulation. Der pSTAT3-Anstieg zeigt jedoch eine Abhängigkeit von der Länge der *stalk* Region. Während die mIL-23R-WT-Variante, die den unveränderten mIL-23R, aber keinen mIL-12R β 1 trägt, weder mit noch ohne HIL-23-Stimulation eine Aktivierung von STAT3 zeigte, stieg die Menge an nachweisbarem pSTAT3, je kürzer der *stalk* war. So zeigte sich schon bei den Varianten Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 353-372, Ba/F3-gp130-mIL-

23R Δ 343-372 und Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 333-372 eine deutlich höhere Menge an pSTAT3, sowohl in der stimulierten als auch in der unstimulierten Population. Eine eindeutige zytokinunabhängige STAT3-Aktivierung zeigte sich allerdings erst bei Variante Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 317-372. STAT3 konnte in allen Varianten nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass gleiche Mengen an Protein in jede Spur geladen wurden.

Eine Stimulation mit HIL-23 führte zu keinem weiteren Anstieg von pSTAT3. Somit liegt nahe, dass es sich hierbei um eine zytokinunabhängige sowie mIL-12R β 1-unabhängige Autoaktivierung des mIL-23R handelt. Diese ist umso stärker ausgeprägt, je kürzer die mIL-23R-*stalk* Region ist.

3.3 Die Deletionen innerhalb des murinen IL-23R *stalk* nehmen keinen Einfluss auf das Zytokinbindungsverhalten

Der Einfluss der Deletion der *stalk* Region auf das Zytokinbindungsverhalten wurde beispielhaft an den Rezeptorvarianten mIL-23R Δ 317-372 und mIL-23R Δ 333-372 überprüft. Zur Charakterisierung dieses Bindungsverhaltens wurde eine Koproteinpräzipitation zwischen dem Zytokin und den o.g. Rezeptorvarianten durchgeführt. Dabei wurde das mit Fc-*tag* versehene Zytokin (HIL-23-Fc) von Protein-A-Sepharose über die Fc-Domäne gebunden, durch Zentrifugation aus der Lösung isoliert und somit mögliche Interaktionspartner (mIL-23R Varianten) der gebundenen Proteine isoliert. Das Schema und das Ergebnis der Analyse ist Abbildung 15 zu entnehmen.

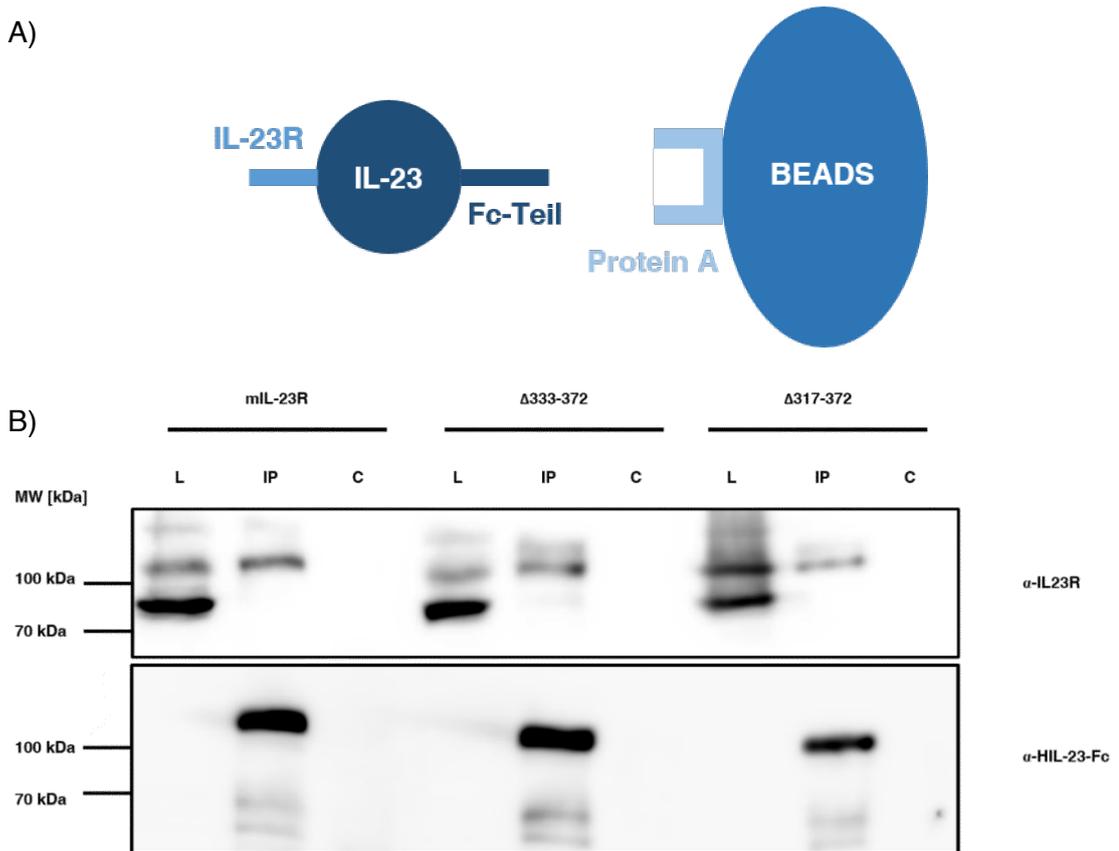


Abbildung 15: Nachweis des Zytokin-Bindungsverhaltens der mIL-23R-Varianten mIL-23R Δ 333-372 und mIL-23R Δ 317-372 mittels Koproteinpräzipitation.

A) Schematischer Aufbau der Ko-PP: der gebundene Rezeptor-Zytokin-Komplex wird über Bindung des Fc-Teils des Fc-Fusions-Proteins (HIL-23-Fc) mittels Protein-A-Sepharose präzipitiert. Nur wenn der Rezeptor sein Zytokin bindet, wird er ebenfalls präzipitiert und ist anschließend im Western Blot detektierbar.

B) Der biologisch inaktive IL-23R bindet sein Zytokin IL-23. COS-7-Zellen wurden transient mit cDNAs transfiziert, die für den mIL-23R, mIL-23R Δ 333–372, mIL-23R Δ 317-372 oder HIL-23-Fc kodieren. Zelllysate wurden hergestellt und die den Rezeptor beinhaltenden Lysate anschließend mit HIL-23-Fc Lysat oder ohne (Kontrolle) gemischt. Das Zytokin-Fc-Fusionsprotein wurde mit Protein-A-Sepharose präzipitiert. Die Koproteinpräzipitation der Rezeptoren wurde mittels Western Blot analysiert. Rezeptor-Zelllysate ohne Zytokin (L), Überstand nach Präzipitation mit Lysat von HIL-23-Fc (IP), Überstand nach Präzipitation ohne HIL-23-Fc (C). n=1.

Die Analyse zeigte, dass eine Bindung von Zytokin und Rezeptor trotz Deletion innerhalb der *stalk* Region stattfand. Zelllysate der mIL-23R-WT tragenden Zellen galten dabei als Kontrolle. Im Western Blot zeigten sie wie zu erwarten das Vorhandensein des IL-23R nach der Präzipitation des HIL-23-Fc mittels Protein A. Auch HIL-23-Fc wurde in dieser Probe nachgewiesen. Kein mIL-23R konnte in der Probe ohne HIL-23-Fc ko-präzipitiert werden. Ein dem WT entsprechendes Verhalten zeigten die beiden getesteten Deletionsvarianten mIL-23R Δ 333–372 und mIL-23R Δ 317-372. Der Nachweis erfolgte

durch Western Blot mit entsprechenden AK, die gegen HIL-23-Fc sowie gegen IL-23R gerichtet waren. Anhand dieser Ergebnisse wurde gezeigt, dass die Deletionen der *stalk* Region die Tertiärstruktur des für die Zytokinbindung verantwortlichen Teils des Proteins nicht verändert. Vermutlich spielt die *stalk* Region also keine Rolle bei der Rezeptorfaltung. Eine uneingeschränkte Bindung von IL-23 an seinen IL-23R findet trotz *stalk* Deletion statt.

3.4 Die Deletion des humanen IL-23R *stalks* führt zu einer Zytokin-unabhängigen IL-23R-Aktivierung

Der humane IL-23R setzt sich aus drei extrazellulären Domänen, an die sich die 37 AS lange *stalk* Region anschließt, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne zusammen (30). Der murine Rezeptor enthält im Unterschied zu dem humanen Rezeptor, wie bereits 2002 durch Parham und Mitarbeiter beschrieben, eine 20 AS lange Duplikatur innerhalb der Zytokin-Bindungsdomäne. Diese Duplikatur enthält das WQPWS Motiv und hat Ähnlichkeit zu dem WSWX-Motiv. Darüber hinaus unterscheiden sich die beiden Rezeptoren durch die Länge ihrer *stalk* Region. Der murine Rezeptor enthält einen 36 AS langen, die humane Variante einen 37 AS langen *stalk* (30). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die in Abbildung 16 schwarz dargestellte *stalk* Region des humanen IL-23R charakterisiert werden.



Abbildung 16: Vergleich der Primärstruktur von humanem und murinem IL-23R

Schematische Übersicht der *stalk* Region von murinem und humanem IL-23R. Die 20 AS lange Duplikatur innerhalb von mIL-23R ist grau dargestellt. WSWX-Motive sind unterstrichen. Ein Bindestrich wurde eingefügt, wenn die Aminosäure in einer Sequenz keine entsprechende Verknüpfung in der anderen Sequenz aufweist. In grün dargestellt ist der Abschnitt der Domäne 3, in lila dargestellt ist die Transmembrandomäne.

3.4.1 Klonierung der Expressionsvektoren verschiedener IL-23R-Varianten

Für den humanen Rezeptor wurden analog zu den Untersuchungen des murinen Rezeptors IL-23R-*stalk*-Deletionsvarianten erstellt und kloniert. Als Ausgangsmatrize

für die Deletionsvarianten diente der humane IL-23R-P310 im pcDNA-3.1-Vektor, der zunächst aus dem, der AG Scheller vorliegendem, pCR-Script-Vektor subkloniert wurde. Im humanen IL-23R wurde ein SNP (P310L) identifiziert, der mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziiert wurde (81). Somit wurden zwei humane IL-23R Varianten kloniert: P310 und L310. Wie bereits in den Studien von de Paus und Kollegen beschrieben, wurde hIL-23R P310 als Wildtypvariante bezeichnet und als *template* für die Klonierungen der Deletionsvarianten verwendet (81).

Die genauen Klonierungsschritte des hIL-23R sind Abbildung 17 zu entnehmen.

Für eine nähere Charakterisierung der stalk Region des humanen IL-23R wurden die in Abbildung 18 dargestellten Deletionsvarianten erstellt.

Klonierung der IL-23R und IL-12R β 1 Varianten in den pcDNA3.1 Expressionsvektor

Zunächst wurden die Rezeptorvarianten hIL-23R P310, hIL-23R L310 und hIL-12R β 1 aus dem pCR-Script-Vektor in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Anschließend wurden die cDNAs in den eukaryotischen Expressionsvektor p409 sowie in die retroviralen Vektoren pMOWS-puro (hIL-23R) oder pMOWS-hygro (hIL-12R β 1) kloniert. Die so entstandenen Klonierungsprodukte wurden jeweils mittels Testspaltung überprüft. Abbildung 17B zeigt exemplarisch die Testspaltung der pcDNA 3.1-hIL-23R Varianten mittels EcoR1. Anhand der zu erwartenden Größen der Restriktionsprodukte konnte somit der Erfolg der Klonierung überprüft werden. Die genauen Schritte der Subklonierung sowie die Testspaltung der pcDNA3.1-hIL-23R-Varianten sind Abbildung 17 zu entnehmen.

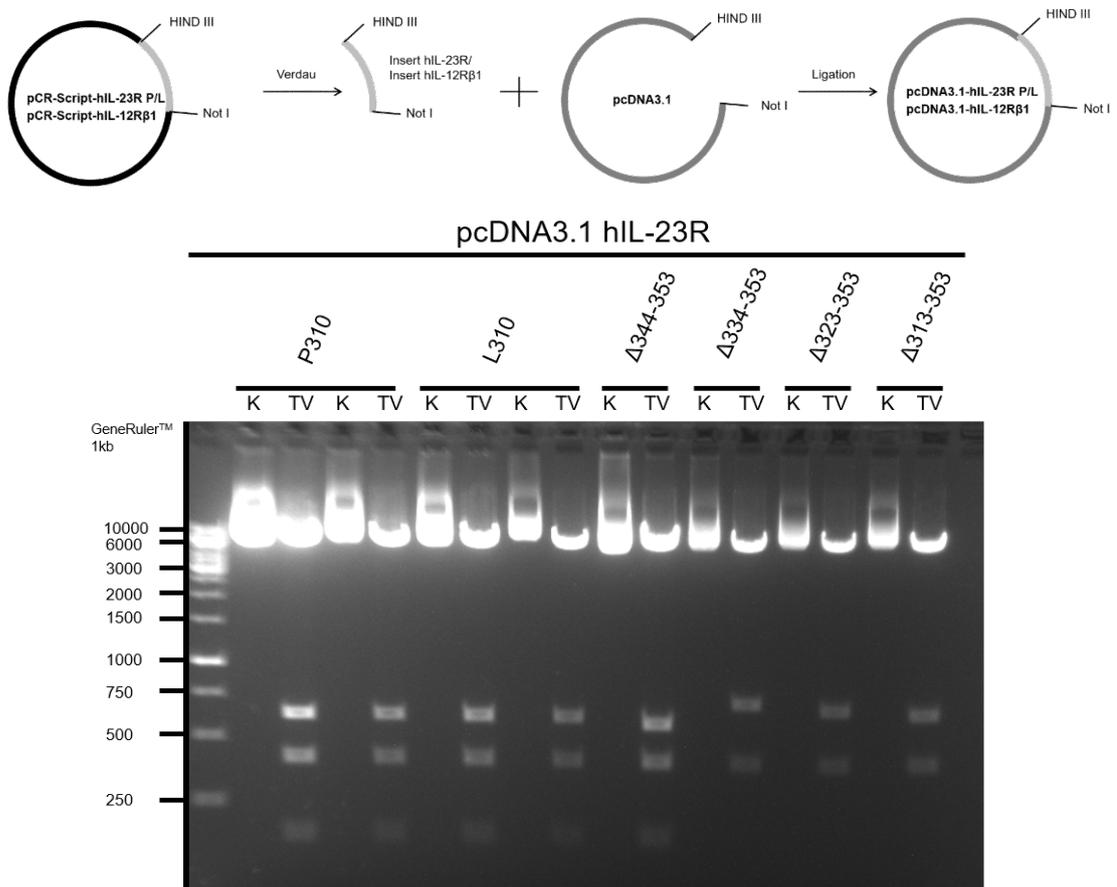


Abbildung 17: Klonierung der hIL-23R und hIL-12Rβ1 Varianten in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1

A) Als *template* DNA diente die DNA der WT Rezeptoren hIL-23R (P310 sowie L310) und hIL-12Rβ1 in pCR-Skript. Durch einen präparativen Verdau der pCR-Script-Vektoren mit HindIII und NotI wurde das *Insert* der WT-Rezeptoren isoliert und anschließend in den ebenfalls mit HindIII und NotI geschnittenen Klonierungsvektor pcDNA3.1 ligiert. B) Das fertige Produkt wurde anschließend mittels Testspaltung analysiert. Die DNA der WT-Rezeptoren pcDNA3.1-hIL-23R-P310, pcDNA3.1-hIL-23RL310 und pcDNA3.1-hIL-23Δ344-353, hIL-23RΔ334-353, hIL-23Δ323-353 und hIL-23RΔ313-353 wurden zur Analyse mittels der Restriktionsendonuklease EcoRI gespalten. Auf dem dargestellten Agarosegel sind die unbehandelten Plasmide (K) neben dem jeweiligen geschnittenen Plasmid (TV) aufgetragen. Die Banden entsprechen den jeweiligen erwarteten Fragmenten mit den Längen: pcDNA3.1-hIL-23R-P310 (6209 bp, 615 bp, 402 bp, 155 bp), pcDNA3.1-hIL-23RL310 und pcDNA3.1-hIL-23Δ344-353 (6209 bp, 585 bp, 402 bp, 155 bp), hIL-23RΔ334-353 (6209 bp, 710 bp, 402 bp), hIL-23Δ323-353 (6209 bp, 677 bp, 402 bp) und hIL-23RΔ313-353 (6209 bp, 647 bp, 402 bp). n=1.

Nach erfolgter Testspaltung und anschließender Analyse auf einem 1 %igem Agarosegel, konnten den erwarteten Plasmidfragmenten auf dem Agarosegel die in Abbildung 17 entsprechenden Banden zugeordnet werden.

Klonierung der humanen Deletionsvarianten

Um die funktionelle Bedeutung der Länge der *stalk* Region zu untersuchen, wurden Abschnitte von jeweils 10, 20, 31 und 41 AS der 37 AS langen humanen IL-23 *stalk* Region deletiert und die Varianten hIL-23R Δ 344-353, hIL-23R Δ 334-353, hIL-23 Δ 323-353 und hIL-23R Δ 319-353 generiert. Abbildung 18 zeigt die AS Sequenzen.

	D3 Region	stalk-Region
Human WT	...Q ₂₉₃ VRCQETGKRYWQPWSSPFFHKTP-----	ETVPQVTSKAFQHDTWNSGLTVASISTGHLTSDNRGDI GLLLGMIVF ...
Δ 344-353	...Q ₂₉₃ VRCQETGKRYWQPWSSPFFHKTP-----	ETVPQVTSKAFQHDTWNSGLTVASIST-----I GLLLGMIVF ...
Δ 334-353	...Q ₂₉₃ VRCQETGKRYWQPWSSPFFHKTP-----	ETVPQVTSKAFQHDTWN-----I GLLLGMIVF ...
Δ 323-353	...Q ₂₉₃ VRCQETGKRYWQPWSSPFFHKTP-----	ETVPQV-----I GLLLGMIVF ...
Δ 313-353	...Q ₂₉₃ VRCQETGKRYWQPWSSPFF-----	I GLLLGMIVF ...

Abbildung 18: Übersicht der klonierten hIL-23R-Deletionsvarianten

Vier Varianten mit verkürzten *stalk* Regionen des humanen IL-23R wurden erzeugt: hIL-23 Δ 344-353, hIL-23 Δ 334-353, hIL-23 Δ 323-353 und hIL-23 Δ 313-353. Die Variante hIL-23 Δ 313-353 entspricht der Deletionsvariante mit komplett deletiertem *stalk* und anteilig deletierter Domäne 3.

Für die Klonierung wurde das zuvor generierte Plasmid pcDNA3.1-hIL-23R-P310 verwendet. Mittels SOE-PCR wurden Plasmide mit hIL-23R cDNAs generiert, die für unterschiedlich lange *stalk* Regionen des humanen IL-23R kodieren. Hierbei wurde jedoch nicht die komplette cDNA der Rezeptorvarianten amplifiziert, sondern die EcoRV Schnittstelle in der kodierenden Region des extrazellulären Bereichs verwendet. Die dabei eingesetzten Primer können Tabelle 13 entnommen werden. Mittels überlappender *forward*- und *reverse primer* wurden die Fragmente A und B amplifiziert und mittels *overlap*-PCR fusioniert (vgl. Punkt 2.2.1.7.2). Anschließend erfolgte die Ligation in den pCR-Script Vektor. Die Klonierungsschritte sind Abbildung 19 zu entnehmen.

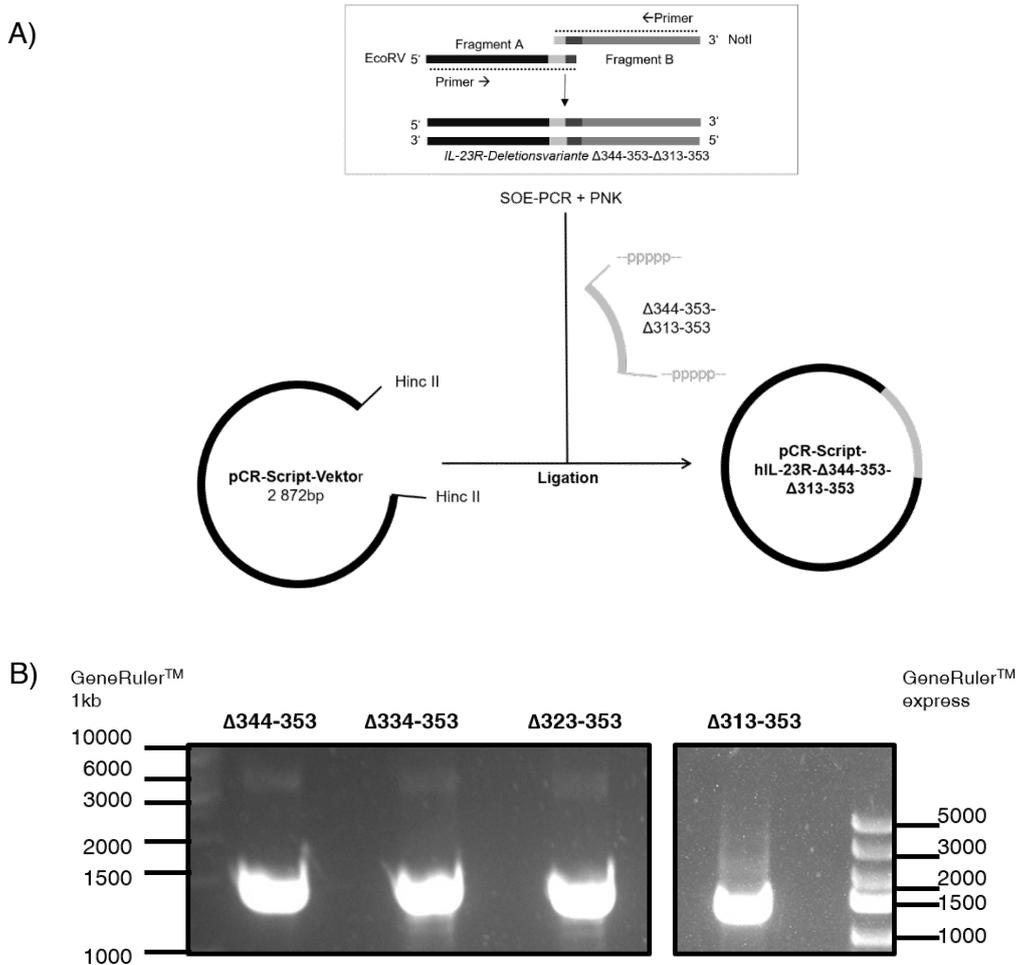


Abbildung 19: Klonierung der Deletionsvarianten des hIL-23R in den Klonierungsvektor pCR-Script

A) Als *template* dienen jeweils die beiden DNA-Fragmente A und B. Die resultierenden PCR-Produkte wurden anschließend mithilfe einer T4-Polynukleotidkinase am 5'-Terminus phosphoryliert, um so die anknüpfende Ligation in den mit dem HincII-Restriktionsenzym geöffneten und dephosphorylierten pCR-Script Klonierungsvektor zu ermöglichen. Die phosphorylierten PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und anschließend aus dem Gel extrahiert.

B) Zur Kontrolle der PCR-Produkte der SOE-PCR wurden die fusionierten Deletionsvarianten $\Delta 344-353$ (1457bp), $\Delta 334-353$ (1423bp), $\Delta 323-353$ (1390bp) und $\Delta 313-353$ (1360bp) auf einem 1 %igem Agarosegel analysiert. Es wurde jeweils 1 μ L des Eluats mit 2 μ L DNA-Probenpuffer versetzt und aufgetragen. n=1.

Nach erfolgreicher SOE-PCR wurden die Inserts durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft, aus dem Gel eluiert und anschließend in den pCR-Script-Vektor ligiert.

Nach Transformation in kompetente *E.coli XL1 blue* Zellen wurden putative Klone mittels Kolonie-PCR identifiziert, deren Plasmid-DNA isoliert und sequenziert.

Subklonierung der für die IL-23R Varianten kodierenden cDNAs in die eukaryotischen Expressionsvektoren pcDNA3.1 und p409 sowie den retroviralen Vektor pMOWS-puro

Zur weiteren Subklonierung der hIL-23R-Deletionsvarianten erfolgte zunächst die Klonierung in den mit EcoRV und NotI geschnittenen Vektor pcDNA3.1-hIL-23R. Nach Transformation von *E.coli* Zellen wurden putative Klone mittels Kolonie-PCR identifiziert und die DNA nach Plasmidpräparation durch Restriktionsanalyse identifiziert.

Für eine erhöhte Expression der Rezeptoren in COS-7-Zellen wurde eine Umklonierung der cDNA in p409 Vektoren angestrebt. Dazu wurde die cDNA der WT-Varianten mittels PmeI aus dem pcDNA3.1 Vektor isoliert und anschließend in den mit PmeI geschnittenen und dephosphorylierten Vektor p409 ligiert. Der Ablauf ist in Abbildung 20 beispielhaft für die WT Rezeptoren dargestellt und wurde analog dazu mit den Deletionsvarianten durchgeführt. Positive Klone wurden dann mittels Kolonie PCR identifiziert und die DNA mittels Minipreparation und Midipreparation amplifiziert.

Anschließend wurde die DNA in die kompetente Zelllinie *E.coli XL1 blue* transformiert, die Plasmid-DNA isoliert und mittels Testspaltung analysiert.

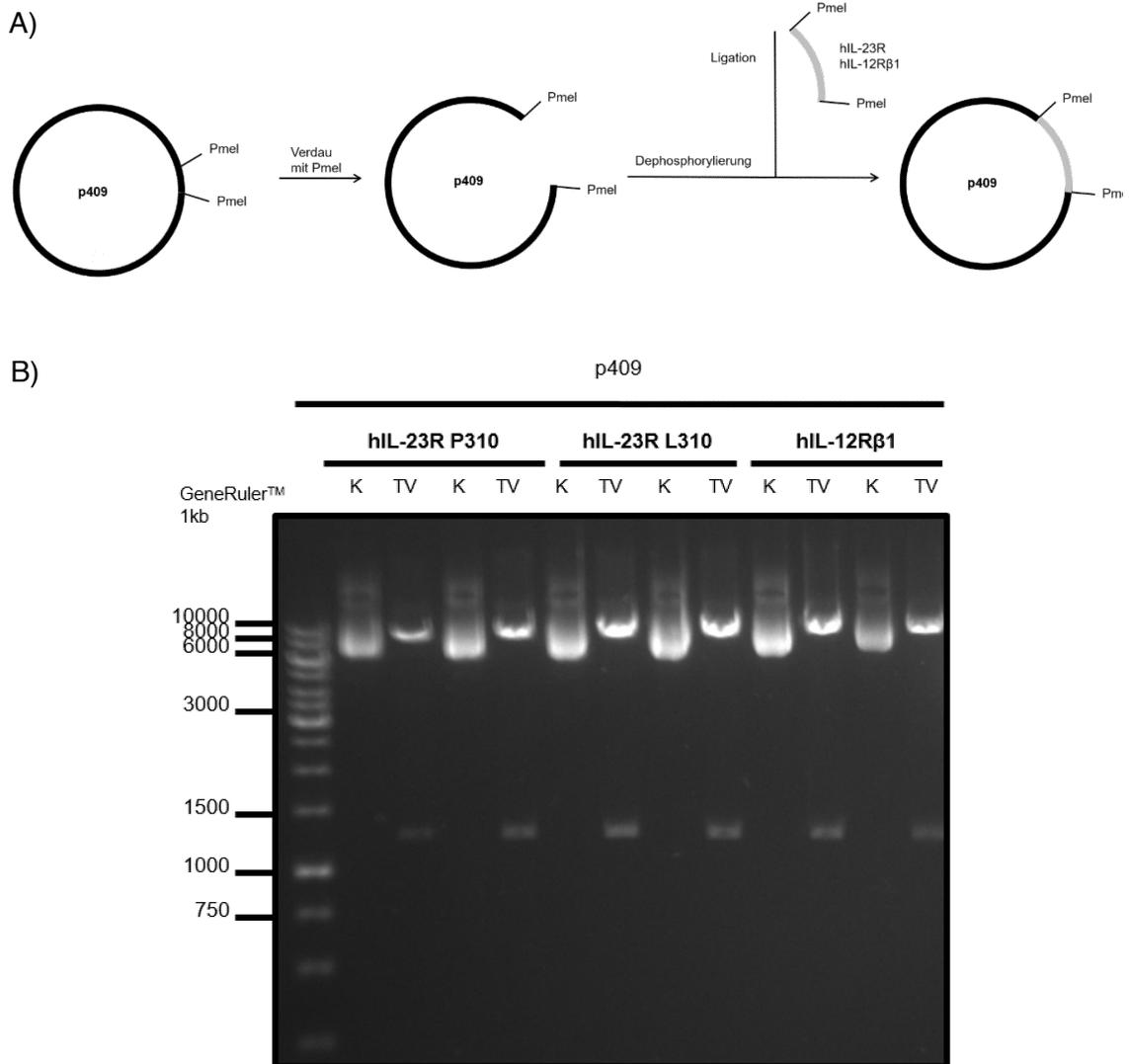


Abbildung 20: Klonierung der Rezeptorvarianten in den Vektor p409

A) Die Umklonierung der Rezeptorvarianten in den Vektor p409 wird beispielhaft anhand der WT Rezeptorvarianten hIL-23R P310, L310 und hIL-12Rβ1 gezeigt. Der Vektor p409 wurde mit PmeI geschnitten und das Insert ebenfalls mittels PmeI aus dem pcDNA 3.1 Vektor herausgelöst. Das geöffnete Plasmid p409 wurde dephosphoryliert um zu verhindern, dass sich die Enden religieren. B) Das fertige Produkt wurde dann mittels Testspaltung analysiert. Die DNA der WT-Rezeptoren p409-hIL-23R-P310, p409-hIL-23RL310 und p409-hIL-12Rβ1 wurde zur Analyse mittels der Restriktionsendonuklease HindIII gespalten. Auf dem dargestellten Agarosegel sind die unbehandelten p409-hIL23R-P310- und p409-hIL23R-L310 Plasmide (K) neben dem geschnittenen Plasmid (TV) mit den erwarteten Fragmentgrößen von 1302 bp und 8464 bp dargestellt. Analog ist das unbehandelte p409-hIL12Rβ1-Plasmid (K) neben dem geschnittenen Plasmid (TV) mit den Fragmentgrößen 8569 bp und 1302 bp gezeigt. n=1.

Nach erfolgter Testspaltung und anschließender Analyse auf einem 1 %igem Agarosegel konnten den Plasmidfragmenten auf dem Agarosegel die entsprechenden Banden zugeordnet werden (vgl. Abbildung 20). Die in p409 vorliegende DNA der

Rezeptor-WT-Varianten p409-hIL-23R-P310/L310, p409-hIL-12R β 1 und die der Deletionsvarianten p409-hIL-23R Δ 344-353, p409-hIL-23R Δ 334-353, p409-hIL-23R Δ 323-353 und p409-hIL-23R Δ 313-353 wurde zur Kontrolle der Expression in COS-7-Zellen transfiziert.

Für die Transfektion von Ba/F3-Zellen musste die cDNA der IL-23-WT-Rezeptoren sowie der hIL-23R-Deletionsvarianten in den Expressionsvektor pMOWS-puro bzw. pMOWS-hygro umklontiert werden. Hierfür wurden die mittels PmeI isolierten cDNAs der Rezeptoren in den pMOWS-Vektor ligiert. Diese wurde zuvor mit EcoNI und BamHI geöffnet, die überstehenden Enden mit Klenow-Fragment aufgefüllt und dephosphoryliert. Nach Transformation in kompetente E.coli Zellen wurden putative Klone mittels Kolonie-PCR identifiziert und die DNA mittels Minipreparation und Midipräparation amplifiziert.

3.4.2 Expression der humanen IL-23-Rezeptorvarianten in COS-7-Zellen

Bei den COS-7-Zellen handelt es sich um eine Fibroblasten-ähnliche Zelllinie, die dazu verwendet wurde die Umsetzung der klonierten cDNA in die entsprechende Rezeptorkette zu überprüfen, bevor die Transfektion in Ba/F3-Zellen durchgeführt wurde.

COS-7-Zellen wurden wie unter Punkt 2.2.2.3 beschrieben mit der Plasmid-DNA der in dem p409-Vektor vorliegenden humanen WT-Rezeptoren hIL-12R β 1, hIL-23R-P310, hIL-23R-L310 sowie der Deletionsvarianten hIL-23R Δ 344-353, hIL-23R Δ 334-353, hIL-23R Δ 323-353 und hIL-23R Δ 313-353 transfiziert. Die Zellen wurden zwei Tage später lysiert und die Expression der Rezeptoren mittels Western Blot nachgewiesen. Das Ergebnis ist Abbildung 21 zu entnehmen.

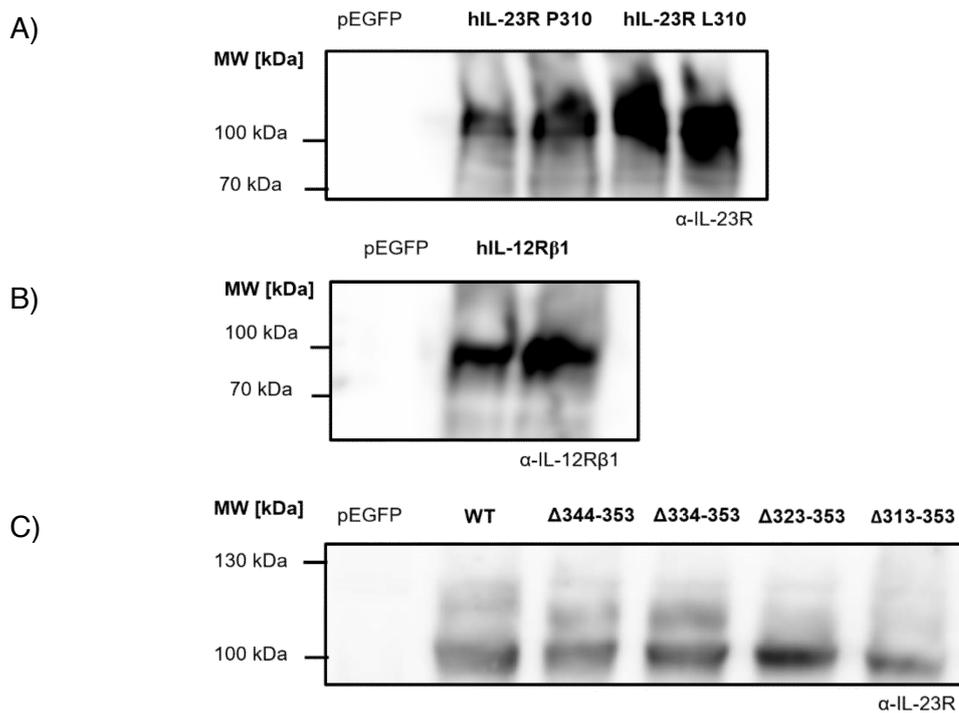


Abbildung 21: Testexpression des humanen IL-12Rβ1 und der humanen IL-23R Varianten in COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden mit Plasmid-DNA für hIL-23R (A), hIL-12Rβ1 (B) sowie der *stalk* Deletionsvarianten des IL-23R (C) transfiziert. Die Lyse der Zellen erfolgte nach 2 Tagen. Als Kontrolle dienten COS-7-Zellen, die mit dem Plasmid pEGFP transfiziert wurden. Die angefertigten Zelllysate wurden auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und die Proteine anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Rezeptor-Nachweis erfolgte unter Verwendung eines biotinylierten AK gegen hIL-23R bzw. gegen IL-12Rβ1 und anschließender Inkubation mit Streptavidin-HRP. Zwei verschiedene Expressionsvektoren für hIL-23R und hIL-12Rβ1 wurden in COS-7-Zellen transfiziert. n=1.

Die in Abbildung 21 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass alle Rezeptorvarianten in den COS-7-Zellen exprimiert wurden. Die Detektion der einzelnen zuvor generierten Rezeptorvarianten bestätigt deren Expressionsfähigkeit und war Voraussetzung dafür die DNA anschließend für weitere Versuche verwenden zu können. Das Ergebnis lässt allerdings keinen Rückschluss auf die unterschiedliche Expression der Rezeptorvarianten zu.

3.4.3 Generierung stabiler Ba/F3-Zelllinien mit verschiedenen humanen IL-23R *stalk* und WT Varianten

Um Aufschlüsse über das Proliferationsverhalten von Zellen mit IL-23R *stalk*-Deletion zu erhalten, wurde analog zu den Untersuchungen an dem murinen Rezeptor (vgl. Punkt

3.1) eine HIL-6 sensible Ba/F3-gp130 Zelllinie verwendet, die der AG Scheller bereits vorlag. Zunächst wurde mittels retroviraler Transduktion eine IL-23 responsive Zelllinie (Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R) generiert. Dazu wurden die Ba/F3-gp130-Zellen nacheinander mit der zuvor in pMOWS-Vektoren klonierten cDNA (vgl. Punkt 3.4.1) beider Rezeptoren transduziert, so dass nach zweifacher Transduktion insgesamt vier Varianten von WT-Rezeptor-Zellen vorlagen (vgl. Tabelle 21 und Abbildung 22). Um einen putativen Einfluss der Reihenfolge bzw. des IL-23R SNP bei der Transduktion auszuschließen, wurden verschiedene Varianten dieser IL-23-responsiven Zelllinie generiert und anschließend verglichen. Die Zusammensetzung der Varianten ist Abbildung 22 und Tabelle 21 zu entnehmen.

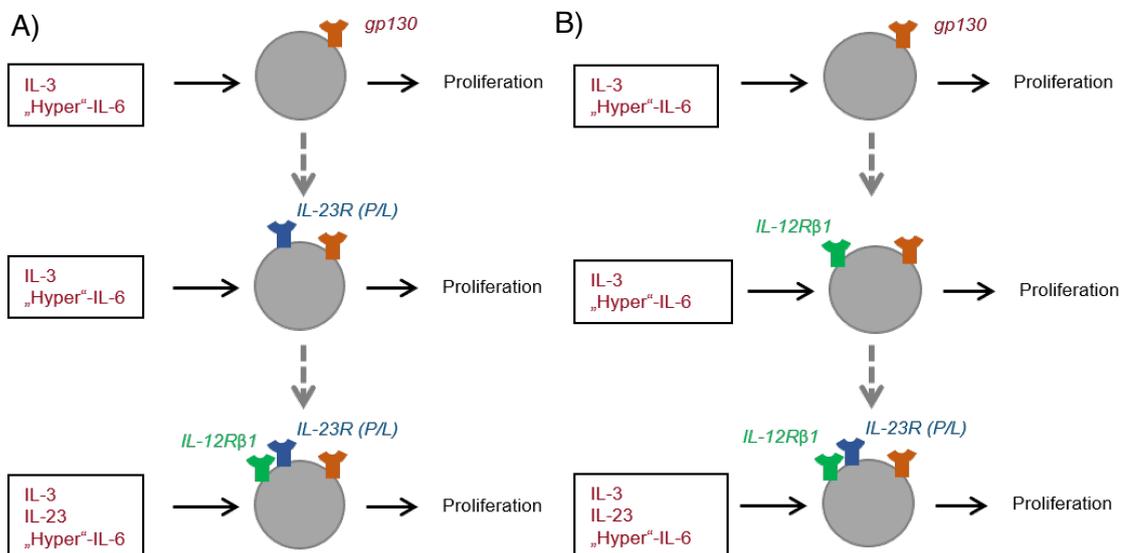


Abbildung 22: Experimenteller Aufbau der Ba/F3-Zelltransduktion

Die Rezeptoren wurden in 2 Schritten in die IL-6-abhängige, murine pro-B-Zelllinie Ba/F3-gp130 transduziert. Die Ba/F3-Zellen, die bereits den gp130-Rezeptor exprimierten, wurden mittels HIL-6 kultiviert. Um einen Einfluss der Reihenfolge der Transduktion auszuschließen wurden die Zellreihen mit denselben Rezeptoren zweimal, jedoch in unterschiedlicher Reihenfolge, transduziert. A) Ba/F3-gp130-Zellen wurden zunächst mit dem hIL-12R β 1 und anschließend mit den hIL-23R P- und L-Varianten transduziert (entspricht Transduktion Nr. 1 und 2 in Tabelle 21). B) Die Reihenfolge wurde umgekehrt. Ba/F3-gp130-Zellen wurden zunächst mit den hIL-23R P- und L-Varianten und anschließend mit dem IL-12R β 1 transduziert (entspricht Transduktion Nr. 3 und 4 in Tabelle 21).

Tabelle 21: Transduktionstabelle

NR.	1.TRANSDUKTION	2. TRANSDUKTION
1	hIL-12R β 1	hIL-23R-P310
2	hIL-12R β 1	hIL-23R-L310
3	hIL-23R-P310	hIL-12R β 1
4	hIL-23R-L310	hIL-12R β 1

Nach zweiwöchiger Selektion der Zellen wurden die Ba/F3-Zelllinien auf Unterschiede in der Rezeptorexpression und im Proliferationsverhalten untersucht (vgl. Punkt 3.4.4).

Um den Einfluss der Deletion innerhalb der *stalk* Region des humanen IL-23-Rezeptors auf die IL-23 vermittelte Signaltransduktion zu untersuchen, wurden Ba/F3-gp130 mit cDNA für hIL-12R β 1 transduziert. Die Zellen wurden mittels HIL-6 kultiviert bis sie den hIL-12R β 1 stabil exprimierten und anschließend mit der cDNA der Deletionsvarianten pMOWS-puro-hIL-23R Δ 344-353, pMOWS-puro-hIL-23R Δ 334-353, pMOWS-puro-hIL-23R Δ 323-353 und pMOWS-puro-hIL-23R Δ 313-353 transduziert.

Die resultierenden Zellen wurden als Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 344-353, Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 334-353, Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 323-353 und Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 313-353 bezeichnet.

Nach zweiwöchiger Selektion wurden die WT-Rezeptor- und die IL-23-Rezeptor-Deletionsvarianten tragenden Ba/F3-Zellen hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression unter Verwendung der Durchflußzytometrie (siehe Punkt 2.2.2.5) überprüft.

Die Ergebnisse der Durchflußzytometrie für die WT-Zelllinien sind Abbildung 23 zu entnehmen.

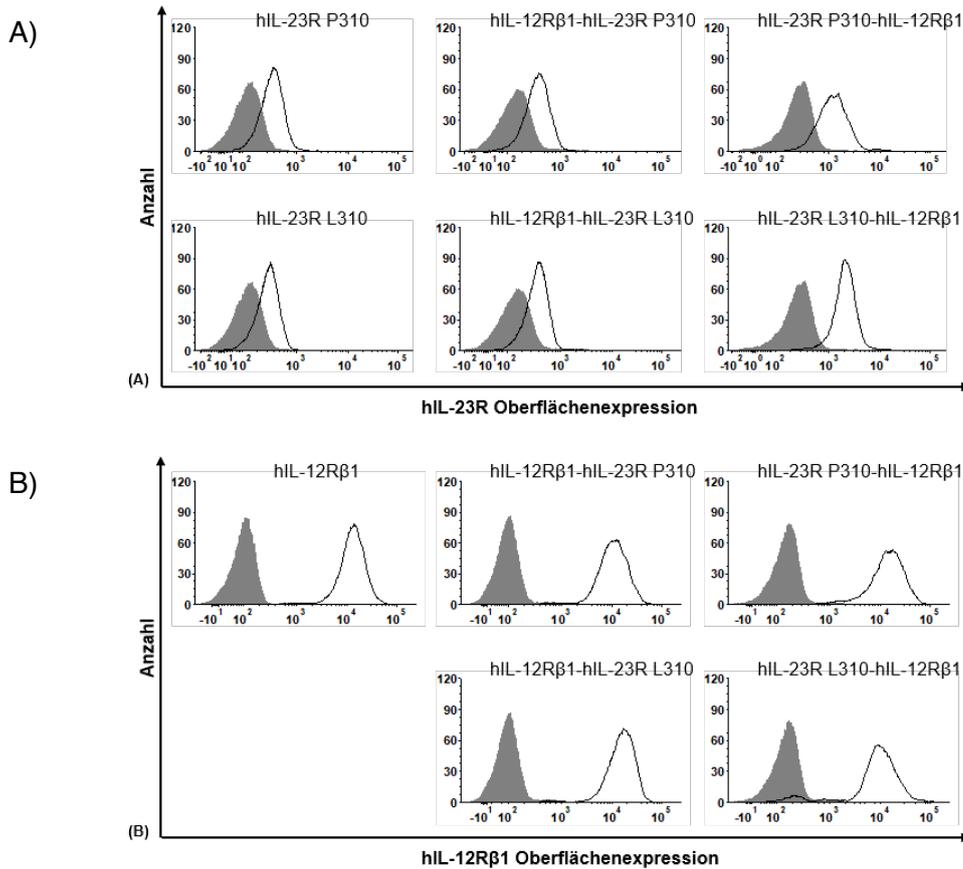


Abbildung 23: Analyse der Oberflächenexpression der verschiedenen Ba/F3-gp130 Zelllinien mit den humanen Rezeptorvarianten hIL-12Rβ1 und hIL-23R-WT mittels Durchflusszytometrie

Ba/F3-gp130-Zellen wurden mit jeweils einer Variante des hIL-23R-WT und dem hIL-12Rβ1 transduziert und durch das Anfärben mit spezifischen AK und anschließender Durchflusszytometrie analysiert. Die Histogramme repräsentieren die Oberflächenexpression der A) hIL-23R Varianten und des B) hIL-12Rβ1. Die Intensität der Fluoreszenz ist auf der x-Achse abgebildet und gilt somit als Maß für die Expression der jeweiligen Rezeptorkette. Die y-Achse repräsentiert die Anzahl der Zellen, die analysiert wurde. Als Negativkontrolle dienen gefärbte Ba/F3-gp130-Zellen, die als graue Histogramme dargestellt sind. Die weißen Histogramme zeigen die im Rahmen dieser Arbeit generiert Zellen. Die Oberflächenexpression der Rezeptoren spiegelt sich durch die Rechtsverschiebung der weißen Histogramme im Vergleich zur Kontrolle Ba/F3-gp130 wider. n=1.

Die Durchflusszytometrie wurde wie bereits für die murinen Rezeptoren beschrieben durchgeführt (vgl. Punkt 3.1.1). Die weißen Histogramme repräsentieren: Ba/F3-gp130-hIL-12Rβ1-hIL23R-P310, Ba/F3-gp130-hIL-12Rβ1-hIL-23R-L310, Ba/F3-gp130-hIL-23R-P310-hIL-12Rβ1 sowie Ba/F3-gp130-hIL-23R-L310-hIL-12Rβ1 im Vergleich zur Negativkontrolle Ba/F3-gp130, die als graue Histogramme dargestellt sind. Die gezeigten Histogramme weisen alle einen *shift* nach rechts und damit eine Oberflächenexpression der getesteten Rezeptoren auf.

Analog zu dem Rezeptornachweis der WT-Varianten wurden auch die mit der cDNA der Deletionsvarianten transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen im FACS überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

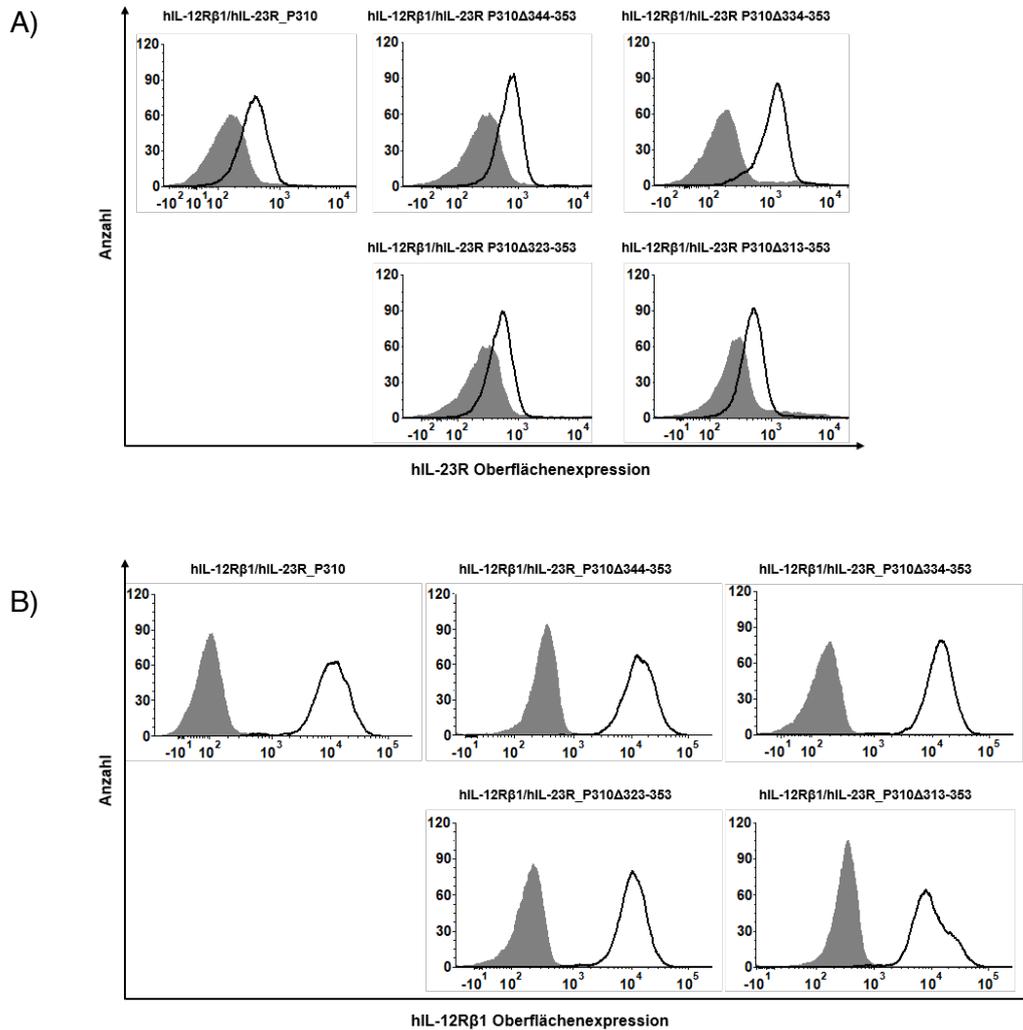


Abbildung 24: Analyse der Oberflächenexpression der verschiedenen Ba/F3-gp130 Zelllinien mit den hIL-12Rβ1, hIL-23R-WT und hIL-23R Deletionsvarianten mittels Durchflusszytometrie

Ba/F3-gp130-Zellen wurden jeweils mit dem hIL-12Rβ1 und einer Deletionsvariante des hIL-23R transduziert und durch das Anfärben mit spezifischen AK und anschließender Durchflusszytometrie analysiert. Die Histogramme repräsentieren die Oberflächenexpression der A) hIL-23R WT-Varianten und B) der Zelllinien Ba/F3-gp130-hIL-12Rβ1-hIL-23R P310, Ba/F3-gp130-hIL-12Rβ1-hIL-23RΔ344-353, Ba/F3-gp130-hIL-12Rβ1-hIL-23RΔ334-353, Ba/F3-gp130-hIL-12Rβ1-hIL-23RΔ323-353 und Ba/F3-gp130-hIL-12Rβ1-hIL-23RΔ313-353. Die Intensität der Fluoreszenz ist auf der x-Achse abgebildet und gilt somit als Maß für die Expression der jeweiligen Rezeptorkette. Die y-Achse repräsentiert die Anzahl der Zellen, die analysiert wurde. Als Negativkontrolle dienten gefärbte Ba/F3-gp130-Zellen, die als graue Histogramme dargestellt sind. Die weißen Histogramme zeigen die im Rahmen dieser Arbeit generiert Zellen. Die Oberflächenexpression der Rezeptoren spiegelt sich durch die Rechtsverschiebung der weißen Histogramme im Vergleich zur Kontrolle Ba/F3-gp130 wider. n=2.

Die weißen Histogramme der analysierten Zelllinien weisen einen *shift* nach rechts und damit eine Oberflächenexpression der getesteten Rezeptoren auf.

3.4.4 Analyse der biologischen Aktivität der humanen Rezeptorvarianten auf transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen

Die Reihenfolge der Transduktion der cDNAs der hIL-23-Rezeptoren hat keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden die WT Varianten Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R P310, Ba/F3-gp130-hIL-23R P310-hIL-12R β 1, Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R L310, Ba/F3-gp130-hIL-23R L310-hIL-12R β 1 generiert.

Im Folgendem wurde das Proliferationsverhalten der humanen Wildtyp IL-23R-Varianten unter HIL-6 und HIL-23 Stimulation im Proliferationsassay untersucht. Die Analyse des Proliferationsverhaltens der WT-Varianten wurde analog zu dem der murinen Varianten (vgl. Punkt 3.1) durchgeführt. Ziel dieser Untersuchung war es zu überprüfen, ob die Reihenfolge der Transduktion sowie der *SNP* an Position 310 (P310L) einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten haben.

Die Proliferation der Zellen einer definierten Anfangspopulation wurde nach 60 h unter Stimulation mit dem Designerzytokin HIL-23 überprüft. Pro Zelllinie wurden drei Ansätze durchgeführt. Der erste Ansatz, die zellinterne Positivkontrolle, wurde mit 0,2 % HIL-6 stimuliert. Da alle verwendeten Ba/F3-Zellen gp130 exprimierten, war zu erwarten, dass alle Zelllinien unter dieser Stimulation proliferieren würden. Das Proliferationsverhalten aller Zellen unter HIL-6-Stimulation wurde im Anschluss als Bezugsgröße auf 100 % gesetzt und die beiden weiteren Ansätze im Verhältnis zu dieser Bezugsgröße bestimmt. Dadurch wurde eine bessere Vergleichbarkeit der Zelllinien zueinander erreicht. Eine Negativkontrolle wurde ohne Zytokin inkubiert und der zu untersuchende Ansatz wurde mit 0,2 % HIL-23 stimuliert. Alle Proben wurden für 60 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im CO₂-Inkubator inkubiert. Die Zellzählung erfolgte nach Ablauf der Inkubationszeit mit Hilfe des Cell-Titer-Blue® Cell Viability Assay.

Das Ergebnis ist in Abbildung 25 dargestellt.

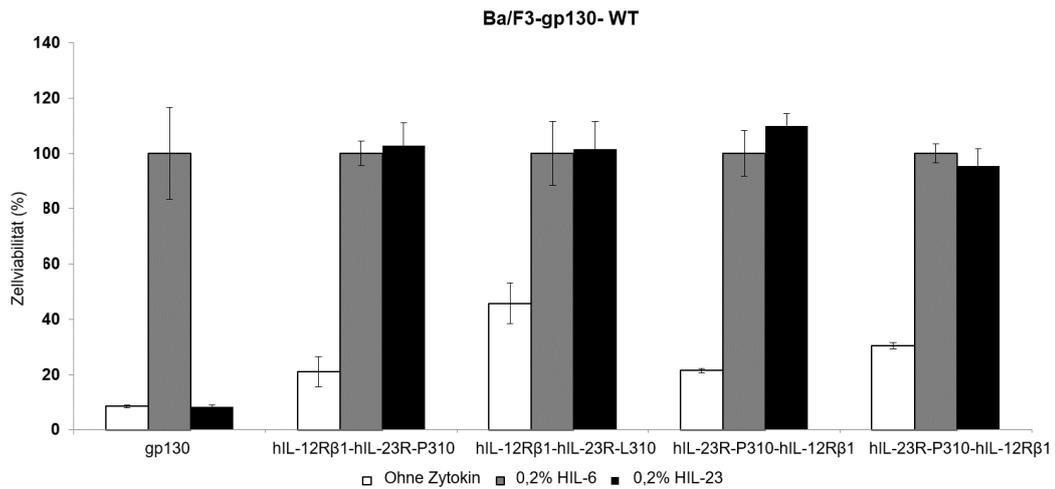


Abbildung 25: Analyse der Ba/F3-gp130-hIL12Rβ1-hIL-23R-WT Zellproliferation in Abhängigkeit von HIL-23

Der Proliferationsassay zeigt das HIL-23-abhängige (schwarz) Proliferationsverhalten der humanen IL-23R-WT Varianten mit unterschiedlicher Transduktionsreihenfolge im Vergleich zu der Proliferation ohne Zytokin (weiß) und mit HIL-6 (grau). Als Negativkontrolle dienten Ba/F3-gp130-Zellen. 5×10^3 Zellen wurden für drei Tage mit 0,2 % HIL-23, 0,2 % HIL-6 oder ohne Zytokin inkubiert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Proliferation unter HIL-6 als Bezugsgröße auf 100 % gesetzt. Die Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardabweichung. Das Ergebnis eines repräsentativen Assays ist dargestellt. n=2.

Die einzelnen Varianten zeigten weder einen Unterschied in ihrem Proliferationsverhalten unter HIL-6-, noch unter HIL-23-Stimulation. Da alle getesteten Zellen, außer der Negativkontrolle gp130, sowohl den humanen IL-23R als auch den humanen IL-12Rβ1 exprimierten, proliferierten die Zellen nicht nur unter Zugabe von HIL-6, sondern auch unter HIL-23 Stimulation. Entscheidend für die Signaltransduktion und damit die Proliferation der Zellen ist das Vorhandensein und die Heterodimerisierung beider Rezeptorketten (30). Die Ba/F3-gp-130-Zellen proliferierten als Negativkontrolle nur unter Gabe von HIL-6 und waren nicht sensibel für HIL-23.

Aufgrund der in Abbildung 25 gezeigten Ergebnisse konnte somit ein Einfluss der Reihenfolge der Transduktion ausgeschlossen werden. Da die Variante IL-23R P310 in der Publikation von de Paus und Mitarbeitern (81) als Wildtyp geführt wird und diese Variante weniger Hintergrundaktivität als die L310-Variante zeigte, wurde die Zelllinie Ba/F3-gp130-hIL-12Rβ1-hIL-23R-P310 im Folgenden als Wildtyp verwendet.

Die Länge der hIL-23R stalk Region beeinflusst das Proliferationsverhalten der mit den Deletionsvarianten transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen

Das Proliferationsverhalten der Deletionsvarianten Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 344-353, Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 334-353, Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 323-353 und Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 313-353 im Vergleich zu Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R-WT-Zellen und der Negativkontrolle Ba/F3-gp130 ist in Abbildung 26 gezeigt. Der Test wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt wie die zuvor beschriebenen Proliferationsanalysen (vgl. Punkt 3.1.2).

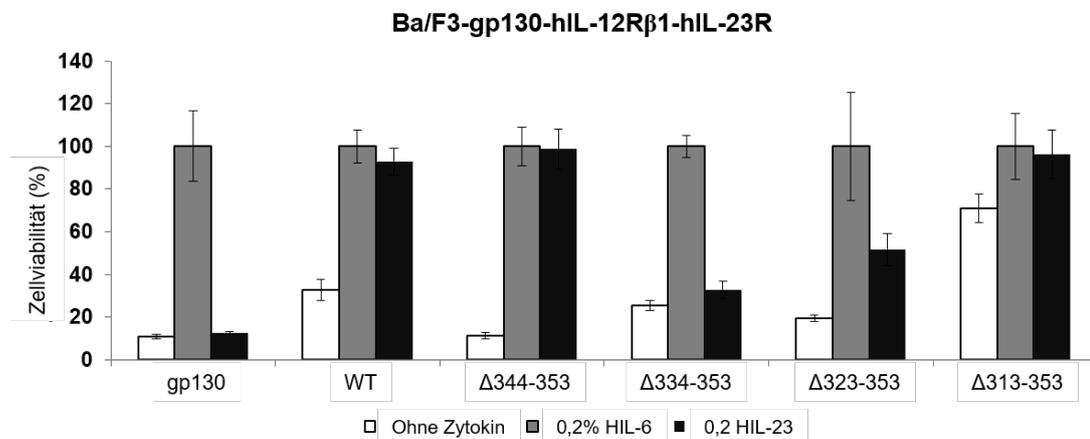


Abbildung 26: Analyse der IL-23-abhängigen Zellproliferation von Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1 Zellen mit verschiedenen IL-23R stalk Deletionsvarianten

Der Proliferationsassay zeigt das HIL-23-abhängige (schwarz) Proliferationsverhalten der humanen IL-23R-Deletionsvarianten im Vergleich zu der Proliferation ohne Zytokin (weiß) und mit HIL-6 (grau). Als Positivkontrolle dienten Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R-Zellen (WT) und als Negativkontrolle Ba/F3-gp130-Zellen. 5×10^3 Zellen wurden für drei Tage mit 0,2 % HIL-23, 02 % HIL-6 oder ohne Zytokin inkubiert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Proliferation unter HIL-6 als Bezugsgröße auf 100 % gesetzt. Die Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardabweichung. Das Ergebnis eines repräsentativen Assays ist dargestellt. n=5.

Die Deletion von 10 membrannahen AS der hIL-23R *stalk* Region (hIL-23R Δ 344–353) führte zu keiner Reduktion der Zellproliferation, während die Deletion von 20 AS (hIL-23R Δ 334–353) die Proliferation stark einschränkte. Diese rapide Abnahme der HIL-23-abhängigen Proliferation war Grundlage weiterer unter Punkt 3.4.4.1 durchgeführten Untersuchungen. Eine 31 AS lange Deletion (hIL-23R Δ 323-353) der *stalk* Region führte hingegen nur zu einer mäßig eingeschränkten Zellproliferation. Die Deletion der 41 AS

langen membranahen Region (hIL-23R Δ 313-353) führte, wie schon für die murinen *stalk* Deletionsvarianten beschrieben, zu zytokinunabhängiger Zellproliferation.

Die Länge der hIL-23R stalk Region beeinflusst die intrazelluläre Signaltransduktion

Wie bereits beschrieben verläuft die Signaltransduktion aktivierter Ba/F3-Zellen über eine Aktivierungskaskade bestehend aus JAK2, TYK2 und STAT1,3,4 und 5, wobei die IL-23R-Untereinheit vor allem eine ligandenabhängige STAT3-Aktivierung über JAK2 induziert (30). Da STAT3 bei der Aktivierung phosphoryliert wird, kann der Nachweis von pSTAT3 als Indikator einer veränderten Signaltransduktion nach *stalk*-Deletion herangezogen werden (30).

Der Nachweis von pSTAT3 erfolgte mittels Western Blot. Der in Abbildung 27 gezeigte Western Blot verdeutlicht, dass die partielle Deletion der humanen IL-23R *stalk* Region die biologische Aktivität der Zellen beeinträchtigt, wohingegen eine komplette Deletion des *stalk* zu einer Autoaktivierung der Zellen und damit zu einer autonomen Aktivierung der STAT3-Kaskade führt.

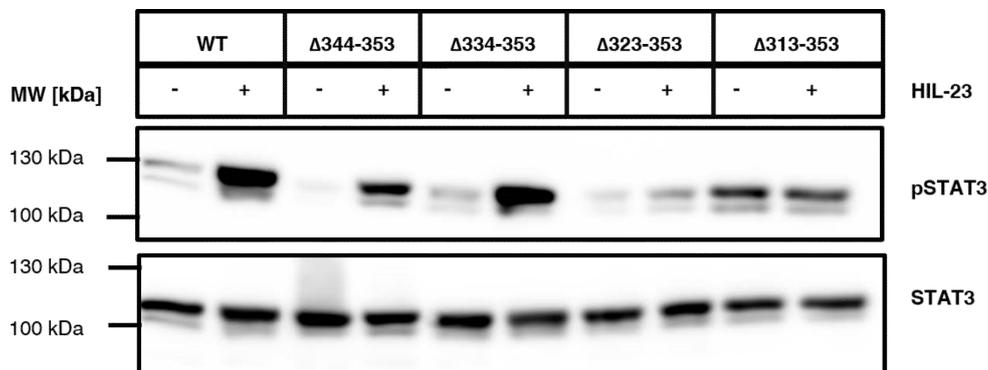


Abbildung 27: STAT3-Aktivierung von stimulierten Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R-Zellen

Stabil transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen (Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R-WT, Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 344-353, Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 334-353, Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 323-353 und Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 313-353) wurden mit PBS gewaschen, für 4 h in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend mit HIL-23 (10 ng/ml) (+) für 15 min stimuliert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nicht behandelt (-). Die Zellen wurden geerntet, lysiert und gleiche Proteinmengen in die Taschen eines SDS-Gels geladen. Der Nachweis von pSTAT3 und STAT3 erfolgte durch Western Blot unter Verwendung der entsprechenden AK. Die Analyse eines repräsentativen Stimulationstests (n=2) ist gezeigt.

Die Deletion von 10 membranahen AS der hIL-23R *stalk* Region (hIL-23R Δ 344–353) führte weder zu einer reduzierten STAT3-Aktivierung noch zu einer reduzierten

Proliferation, wohingegen die Deletion von 20 AS (hIL-23R Δ 334–353) die Proliferation stark einschränkte, aber interessanterweise keinen Einfluss auf die STAT3-Aktivierung zeigte (vgl. Abbildung 26 und Abbildung 27). Die STAT3-Phosphorylierung der um 31 AS gekürzten Deletionsvariante (hIL-23R Δ 323–353) war zwar deutlich reduziert, aber noch nachweisbar. Wie bereits der Proliferationsassay (vgl. Abbildung 26) vermuten ließ, führte die Deletion von 41 membrannahen AS (hIL-23R Δ 313–353) zu einer IL-23-unabhängigen Phosphorylierung von STAT3.

3.4.4.1 Die Autoaktivierung der hIL-23R Δ 334-353 Variante ist auf kanonische IL-23-induzierte Signaltransduktion zurückzuführen

Im Folgendem wurde gezeigt, dass die STAT3-Phosphorylierung der Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 334-353 Zellen auf kanonischer IL-23-induzierter Signaltransduktion beruht. Wie bereits Abbildungen 26 und 27 zeigen, beeinflusst die Deletion von 20 AS der IL-23R *stalk* Region nicht die STAT3-Aktivierung, führt jedoch zu einer verringerten Zellproliferation. Um zu zeigen, dass diese STAT3-Aktivierung auf eine kanonische IL-23 induzierte Signaltransduktion zurückzuführen ist, wurde ein STAT-Assay unter Verwendung eines JAK-Inhibitors durchgeführt. Dabei wurde der pan-JAK-Inhibitor P6 verwendet, der Januskinasen gezielt blockiert. Als Kontrollgruppe wurde die gleiche Ba/F3-Population mit HIL-6 stimuliert. Die Ergebnisse sind Abbildung 28 zu entnehmen.

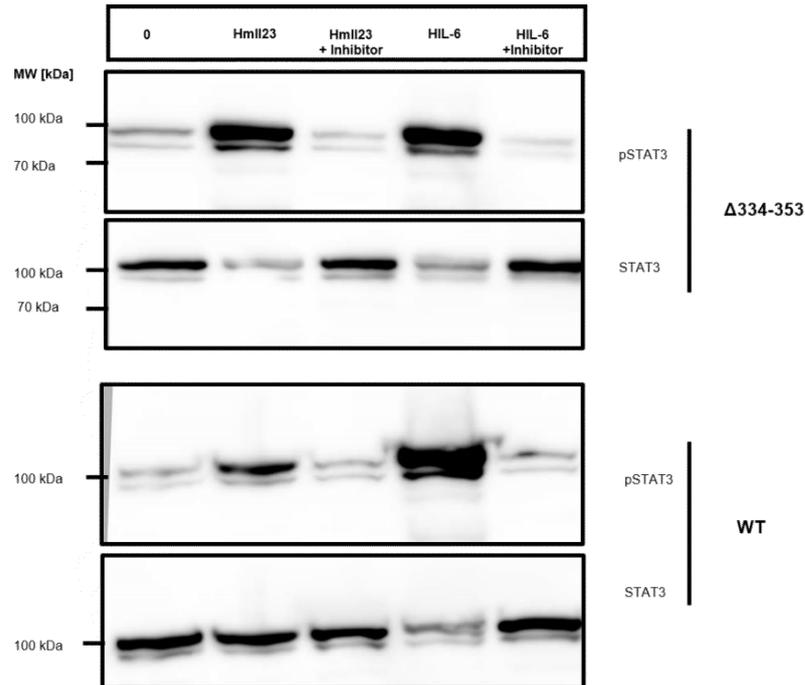


Abbildung 28: Die Unterdrückung der Signaltransduktion mittels JAK-Inhibitor in der Immunopräzipitation

Die Ba/F3-Zelllinien mit Expression des hIL-23R Δ 334-353 sowie des hIL-23R-WT wurden mit PBS gewaschen, für 4 h in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend mit dem pan-JAK-Inhibitor P6 für 60 min vorbehandelt, bevor sie dann mit HIL-23 (10 ng/ml) stimuliert wurden. Als Kontrolle wurde dies mit den gleichen Zellen auch für HIL-6 durchgeführt. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und gleiche Proteinmengen in die Taschen eines SDS-Gels geladen. Der Nachweis von pSTAT3 und STAT3 erfolgte durch Western Blot unter Verwendung der entsprechenden AK. n=1.

Die um 20 AS verkürzte Deletionsvariante zeigte unter JAK-Inhibition analog zu der WT-Variante unter HIL-23 Stimulation keine STAT Phosphorylierung. Die in Abbildung 28 gezeigten Ergebnisse legen die Annahme nahe, dass die Autoaktivierung der hier untersuchten Deletionsvariante hIL-23R Δ 334-353 durch eine IL-23R-Homodimerisierung zustande kommt.

3.4.5 Analyse der biologischen Aktivität von Ba/F3-gp130-hIL-23R-Zellen ohne Co-Rezeptor IL-12R β 1

Die Verkürzung des IL-23R stalk führt trotz fehlender Expression des hIL-12R β 1 zu zytokinunabhängiger Proliferation

Im Rahmen der Arbeit wurde weiterhin die Beteiligung des humanen IL-12R β 1 an der ligandenunabhängigen, autonomen Aktivierung der hIL-23R-Deletionsvarianten untersucht. Hierzu wurden Ba/F3-gp130-Zellen nur mit der cDNA der entsprechenden hIL-23R-Deletionsvariante transduziert und diese anschließend hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens analysiert. Auf die Transduktion der cDNA für hIL-12R β 1 wurde verzichtet.

Die Oberflächenexpression wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert und ist in Abbildung 29 dargestellt.

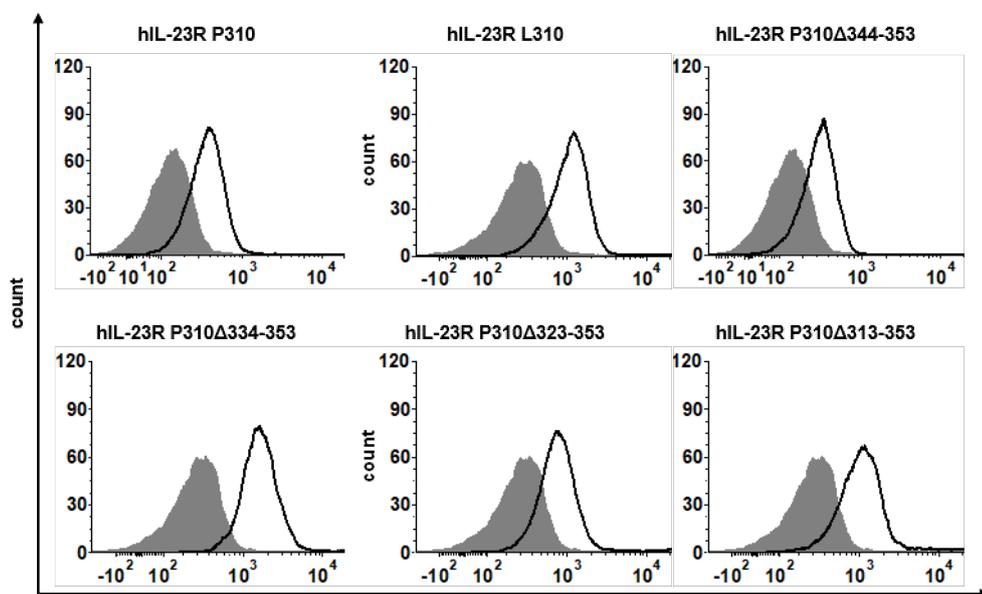


Abbildung 29: Analyse der Oberflächenexpression der verschiedenen Ba/F3-gp130 Zelllinien mit den hIL-23R-WT und hIL-23R Deletionsvarianten mittels Durchflusszytometrie

Ba/F3-gp130 Zellen wurden jeweils mit dem hIL-23R P310, hIL-23R L310 oder jeweils einer Deletionsvariante des hIL-23R transduziert und durch das Anfärben mit spezifischen AK und anschließender Durchflusszytometrie analysiert. Die Histogramme repräsentieren die Oberflächenexpression der einzelnen Rezeptoren. Die Intensität der Fluoreszenz ist auf der x-Achse abgebildet und gilt somit als Maß für die Expression der jeweiligen Rezeptorkette. Die y-Achse repräsentiert die Anzahl der Zellen, die analysiert wurde. Als Negativkontrolle dienten gefärbte Ba/F3-gp130-Zellen, die als graue Histogramme dargestellt sind. Die weißen Histogramme zeigen die im Rahmen dieser Arbeit generierten Zellen. Die Oberflächenexpression der Rezeptoren spiegelt sich durch die Rechtsverschiebung der weißen Histogramme im Vergleich zur Kontrolle Ba/F3-gp130 wider. n=1.

Die Durchflusszytometrie wurde wie unter Punkt 2.2.2.5 beschrieben durchgeführt. Die weißen Histogramme repräsentieren die entsprechenden Ba/F3-gp130 Zellen mit hIL-23R WT und hIL-23R Deletionsvarianten Expression im Vergleich zur Negativkontrolle Ba/F3-gp130, die als graue Histogramm dargestellt ist. Die gezeigten Histogramme

weisen alle einen *shift* nach rechts und damit eine Oberflächenexpression der getesteten IL-23 Rezeptoren auf.

Um den Einfluss von hIL-12R β 1 auf die Zellproliferation auszuschließen, wurde ein Proliferationsassay wie unter Punkt 2.2.2.6 beschrieben angesetzt. Die Zellen wurden für drei Tage mit 0,2 % HIL-6, 0,2 % HIL-23 oder ohne Zytokin inkubiert. Ba/F3-gp130-hIL-23R P310-(WT)-Zellen und Ba/F3-gp130-Zellen wurden als Kontrollen verwendet. Das Ergebnis ist Abbildung 30 zu entnehmen.

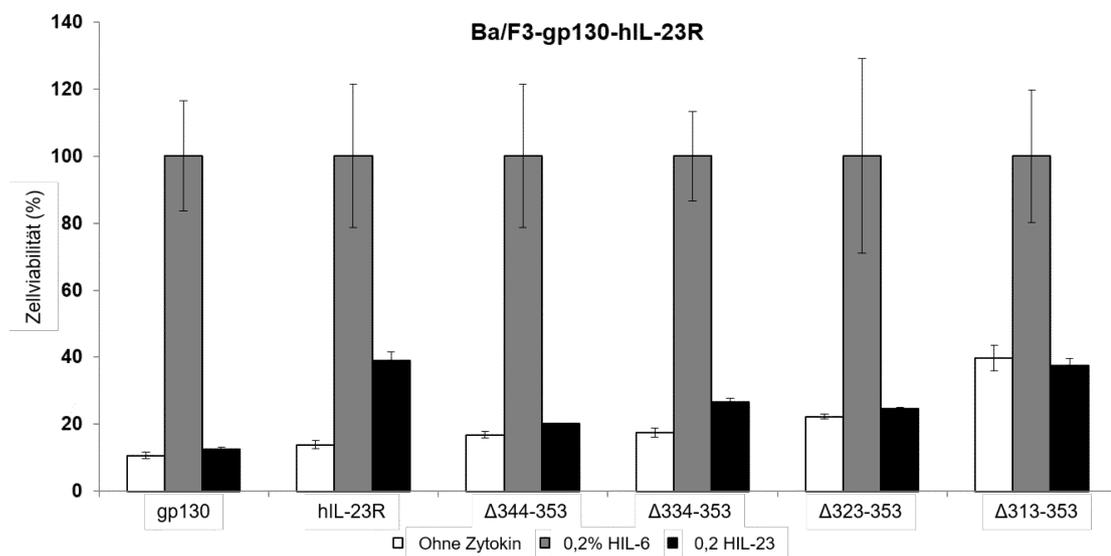


Abbildung 30: Proliferationsverhalten der Ba/F3-gp130-hIL-23R-Zellen ohne hIL12R β 1-Co-Expression

Der Proliferationsassay zeigt das HIL-23-abhängige (schwarz) Proliferationsverhalten der humanen IL-23R-Deletionsvarianten ohne hIL12R β 1-Co-Expression im Vergleich zu der Proliferation ohne Zytokin (weiß) und mit HIL-6 (grau). Als Positivkontrolle dienen Ba/F3-gp130-hIL-23R-Zellen (WT) und als Negativkontrolle Ba/F3-gp130-Zellen. 5×10^3 Zellen wurden für drei Tage mit 0,2 % HIL-23, 0,2 % HIL-6 oder ohne Zytokin inkubiert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Proliferation unter HIL-6 als Bezugsgröße auf 100 % gesetzt. Die Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardabweichung. Das Ergebnis eines repräsentativen Assays ist dargestellt. $n = 3$.

Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R-Zellen zeigten sowohl STAT3-Phosphorylierung (siehe Abbildung 27) als auch Proliferation (siehe Abbildung 26) nach HIL-23 Stimulation, während Ba/F3-gp130-hIL-23R- (WT), hIL-23R Δ 344–353-, hIL-23R Δ 334–353- oder hIL-23R Δ 323–353-Zellen ohne hIL-12R β 1 Co-Expression keine IL-23-abhängige Proliferation zeigten. Interessanterweise konnte bei der autonomen hIL-

23RΔ313–353-Variante eine ligandenunabhängige Proliferation ohne hIL-12Rβ1 Co-Expression nachgewiesen werden (siehe Abbildung 30). In nachfolgenden Untersuchungen der AG Scheller wurde diese hIL-12Rβ1 unabhängige konstitutive hIL-23R-Aktivierung weiter analysiert.

3.5 Untersuchung von murin-humanen Expressionsvarianten

Ein Vergleich der IL-23R Proteinsequenz verschiedener Spezies (siehe Abbildung 31) belegt die hohe Homologie zwischen Mensch, Schwein, Hund, Rind, Katze, Schaf, Schimpanse und Pferd. Maus und Mensch weisen jedoch innerhalb der IL-23R *stalk* Region nur 37,8% Ähnlichkeiten auf (82).

```

Murin WT  ...VRCQETGKRNWQPWSSPFVHQTS-QETGKRNWQPWSSPFVHQTS-QTVSQVTAKSS-HEPQKMEMLSATIFRGHPASGNH-QDIGLL...
Human WT  ...VRCQETGKRYWQPWSSPFFHKTP-----ETVPQVTSKAFQHDWTWNSGLTVASISGHLTSDNRGDIIGLLL...
Ratte     ...VRCQGTGKRNWQPWSSPFVHQTP-----OTASQVTSKP-PHEPQKIEMLTATIFKGHS-TSDNSQDIIGLLL...
Hase      ...VRCQETGKKYWQPWSTPFFHRTREKGLKKNWIKCWNFRKVHNLSEDDVVSQVMRESVHHDTRTSGLLVASTFKEHHFISDSRQDTGLLL...
Rind      ...VRCQETGKKYWQPWSSPFFHKTP-----EIVPQVTMKSQFQHDQNSGLLIASIFKKHLTSDNRKQDIIGLLL...
Schwein   ...VRCQETGKRYWQPWSSPFFHKTP-----ETVPQVTVKFQHDQNSGLPVASIFKGHLTSDNRQDIIGLLL...
Schaf     ...VRCQETGKRYWQPWSSPFFHKTP-----EIVPQVTVKSQFQHDQNSGLLIASIFKKHLTSDNGKQDIIGLLL...
Meerschwein ...VRCREAGSRHWQPWSAPFYHKTPDTVGLRRWHP-WLSGFLK-LKIESGQETPKLYG-SPERLKRKSDTTFHAH-THAHGKQDAGLLL...
Pferd     ...VRCQETGKIYWQPWSSPFFHKTP-----DAVPQVTRKSFQHDQNSGLLIASIFKGHLTSDNGQDIIRLLL...

```

Abbildung 31: Vergleich der IL-23R Proteinsequenz verschiedener Spezies

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen des IL-23R verschiedener Spezies ist dargestellt. Grün hinterlegt ist der Abschnitt der Domäne 3, der das WQWPS-Motiv (unterstrichen) enthält. Grau dargestellt ist der verlängerte *stalk*, schwarz zeigt die konventionelle IL-23R *stalk* Region und die in lila dargestellte Sequenz entspricht der Transmembrandomäne.

Um die Kompatibilität der murinen und humanen Rezeptoren zu testen und zu überprüfen, ob eine Signaltransduktion trotz unterschiedlicher Rezeptorherkunft möglich ist, wurden mIL-12Rβ1 tragende Ba/F3-gp130-Zellen mit der cDNA des hIL-23R P310 stabil transduziert. Die Transduktion wurde wie bereits beschrieben (vgl. 2.2.2.4) durchgeführt und die Oberflächenexpression beider Rezeptoren mittels Durchflusszytometrie bestätigt. Das Ergebnis der Durchflusszytometrie ist Abbildung 32 zu entnehmen.

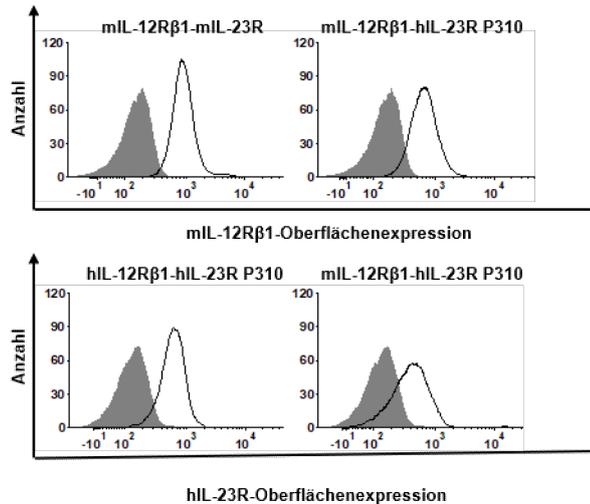


Abbildung 32: Analyse der Oberflächenexpression der Rezeptorvarianten mIL-12R β 1 und hIL-23R-WT mittels Durchflusszytometrie

Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit jeweils einer Variante des mIL-12R β 1 sowie des hIL-23R WT transduziert und durch das Anfärben mit spezifischen AK und anschließender Durchflusszytometrie analysiert. Die Histogramme repräsentieren die Oberflächenexpression des mIL-12R β 1 sowie des hIL-23R-WT. Die Intensität der Fluoreszenz ist auf der x-Achse abgebildet und gilt somit als Maß für die Expression der jeweiligen Rezeptorkette. Die y-Achse repräsentiert die Anzahl der Zellen, die analysiert wurden. Als Negativkontrolle dienten gefärbte Ba/F3-gp130-Zellen, die als graue Histogramme dargestellt sind. Die weißen Histogramme zeigen die im Rahmen dieser Arbeit generierten Zellen. Die Oberflächenexpression der Rezeptoren spiegelt sich durch die Rechtsverschiebung der weißen Histogramme im Vergleich zur Kontrolle Ba/F3-gp130 wider. Zellen der Zelllinie mIL-12R β 1-mIL-23R sowie hIL-12R β 1-hIL-23R dienten als Positivkontrolle. n=1.

Die Durchflusszytometrie wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (siehe Punkt 2.2.2.5). Die weißen Histogramme repräsentieren die entsprechenden Ba/F3-gp130 Zellen mit Co-Expression des murinen IL-12R β 1 sowie des humanen IL-23R im Vergleich zur Negativkontrolle Ba/F3-gp130, die als graue Histogramme dargestellt sind. Die gezeigten Histogramme weisen alle einen *shift* nach rechts und damit eine Oberflächenexpression der getesteten Rezeptoren auf.

Die unterschiedliche Herkunft der IL-23 Rezeptorketten hat keinen negativen Einfluss auf das Proliferationsverhalten

Das Proliferationsverhalten der Zellen mit muriner und humander Co-Expression Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-hIL-23R wurde im Vergleich zu den Kontrollen Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1, Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1/Ba/F3-gp130-hIL-23R-WT und Ba/F3-gp130 analysiert. Der Test wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt wie die zuvor

beschriebenen Proliferationsanalysen (siehe Punkt 2.2.2.6). Alle Zellen wurde mit HIL-6, HIL-23 und ohne Zytokin für 60 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend mithilfe des Cell-Titer-Blue® Cell Viability Assay untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 33 dargestellt.

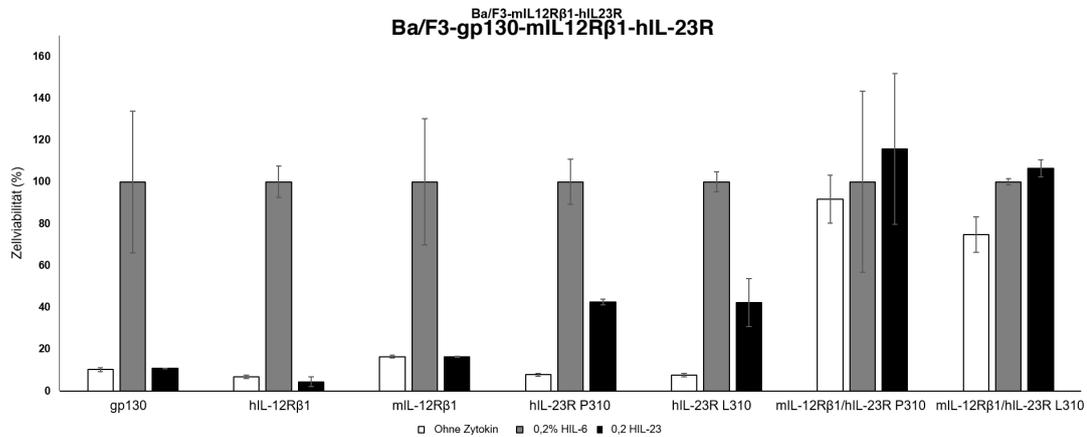


Abbildung 33: Analyse der IL-23-abhängigen Zellproliferation von Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-hIL-23R-Zellen

Der Proliferationsassay zeigt das HIL-23-abhängige (schwarz) Proliferationsverhalten der murin-humanen Mischvarianten im Vergleich zu der Proliferation ohne Zytokin (weiß) und mit HIL-6 (grau). Als Positivkontrolle dienten Ba/F3-gp130-hIL-12Rβ1-Zellen, Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-Zellen sowie Ba/F3-gp130-hIL-23R- P310 und -L310-Zellen. Als Negativkontrolle dienten Ba/F3-gp130-Zellen. 5×10^3 Zellen wurden für drei Tage mit 0,2 % HIL-23, 0,2 % HIL-6 oder ohne Zytokin inkubiert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Proliferation unter HIL-6 als Bezugsgröße auf 100 % gesetzt. Die Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardabweichung. Das Ergebnis eines repräsentativen Assays ist dargestellt. n=3.

Trotz der Expression zweier Rezeptorketten unterschiedlicher Herkunft fand eine IL-23-abhängige Zellproliferation statt. Um einen Einfluss des SNP an dieser Stelle auszuschließen, wurde sowohl die IL-23R P310- als auch die IL-23R L310-Variante getestet. Ein Einfluss des SNP auf das Proliferationsverhalten wurde nicht festgestellt. Die Heterodimerisierung des Rezeptorkomplexes sowie die intrazelluläre Signaltransduktion scheinen weder durch den SNP noch durch die unterschiedliche Rezeptorherkunft beeinträchtigt zu werden.

4 Diskussion

4.1 Warum sollte der IL-23R analysiert werden?

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, die Rolle der IL-23R *stalk* Region innerhalb der IL-23-abhängigen Signaltransduktion zu untersuchen. Dazu ist es wichtig IL-23 im Kontext seiner Rezeptorfamilie zu sehen. Interleukin 23 und sein Rezeptorkomplex gehören zu der IL-12 Superfamilie. Zu der IL-12 Familie gehören die pro- und antiinflammatorischen, heterodimeren Zytokine IL-12, IL-23, IL-27, IL-35 und IL-39 (10, 11, 26, 83). Charakteristisch für die Mitglieder dieser Familie ist die Verwendung einzelner Rezeptoruntereinheiten durch verschiedene Zytokine. So nutzt IL-23 den IL-12R β 1, der auch innerhalb der IL-12-Bindung rekrutiert wird und den einzigartigen IL-23R (12, 53). In der Literatur ist der IL-12R β 1 bereits weitestgehend charakterisiert. Untersuchungen von Floss und Klöcker aus dem Jahre 2016 konnten beispielsweise zeigen, dass die p40 UE innerhalb der IL-23-vermittelten Signaltransduktion an die Dömanen 1 und 2 des IL-12R β 1 bindet. (45). Der IL-23R hingegen ist noch zu großen Teilen unerforscht.

IL-23 nimmt über die Kontrolle der T_H17-Zell-Reifung eine zentrale Rolle in der zellulären Immunität ein und ist wie Cua und Mitarbeiter zeigten, anstelle des zunächst angenommenen IL-12 entscheidend an der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen beteiligt (59). Verschiedene Studien zeigten bereits, dass IL-23 über eine T_H17-Zell-Aufrechterhaltung an dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn (48), Rheumatoider Arthritis (56) und Psoriasis (57) beteiligt ist. Dabei wirkt IL-23 als entscheidender Faktor in der Differenzierung und inflammatorischen Funktion von pathogenen T_H17-Zellen (21). IL-23R-defiziente T-Zellen zeigten in Studien von McGeachy und Mitarbeitern eine verzögerte T_H17-Zell-Entwicklung. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass IL-23 innerhalb des Differenzierungsprozesses vor allem an der Generierung einer großen Anzahl von Effektor T_H17-Zellen beteiligt ist und nicht etwa bereits differenzierte Zellen beeinflusst (20).

Die Erkenntnis über die IL-23/T_H17-Achse führte bereits zu neuartigen Therapiemöglichkeiten in der Psoriasis-Behandlung (57) und auch die Charakterisierung des IL-23R bietet eine vielversprechende Grundlage für die Entwicklung neuartiger Therapeutika im Kampf gegen Autoimmunerkrankungen. Teile des IL-23R wurden bereits untersucht. 2013 konnten Floss und Mitarbeiter die intrazellulären STAT3-Bindungsstellen identifizieren, 2015 definierten Schröder und Mitarbeiter die für die

Zytokinbindung entscheidenden AS innerhalb der p19 und p40 UE innerhalb des IL-23 und 2016 konnten Floss und Klöcker die JAK-Bindungsstellen analysieren (38, 44, 45). All dies macht IL-23 und seinen Rezeptorkomplex zu einem relevanten und vielversprechenden Forschungsobjekt.

4.2 Inwiefern beeinflusst die Länge des *stalk* die biologische Aktivität?

Der IL-23R gehört zu den Typ-I-Transmembran Proteinen und setzt sich aus einem Signal-Peptid, einer N-terminalen-Immunglobulin-ähnlichen Domäne, zwei das WQPWS-Motiv enthaltenden Zytokin-bindenden Domänen, der 37 AS langen humanen bzw. 36 AS langen murinen *stalk* Region, einer Transmembran-Domäne und der 252 AS langen intrazellulären Domäne zusammen. Bindet das Zytokin seinen Rezeptorkomplex, kommt es über eine Aktivierung der Januskinasen Jak2 und Tyk2 zu einer Aktivierung von STATs. Diese STATs homodimerisieren und aktivieren im Zellkern die Transkription von proinflammatorischen Genen (64). Diese Aktivierung von STATs, genauer STAT3, wurde genutzt, um die biologische Aktivität von Ba/F3-Zellen nachzuweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass eine Verkürzung der mIL-23R *stalk* Region die mIL-23R Signaltransduktion entscheidend beeinträchtigt. Dies unterstreicht die Rolle des *stalk* bei der Positionierung der Zytokinbindungsdomäne im richtigen Abstand von der Plasmamembran im Rahmen der Signaltransduktion (82). Untersuchungen an dem IL-23R zeigten bereits, dass die *stalk* Region des IL-23R nicht direkt an der Zytokinbindung beteiligt ist, sondern als *spacer* dafür sorgt, dass die drei sich anschließenden Domänen in der richtigen Position sind um das Zytokin zu binden (38). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen allerdings darauf schließen, dass die IL-23R *stalk* Region neben einer *spacer* Funktion noch weitere Aufgaben erfüllt.

Eine 26 AS lange, murine *stalk* Region war notwendig, um eine uneingeschränkte Signaltransduktion zu garantieren. Um noch eine IL-23-abhängige Aktivierung der Zellen nachzuweisen, reichte hingegen eine 6 AS lange murine *stalk* Region aus. Diese Daten stimmen mit neueren Erkenntnissen über die Funktion der IL-6R *stalk* Region überein (84). Einzelpartikelelektronenmikroskopie, die den gesamten extrazellulären hexameren IL-6-IL-6R α -gp130-Komplex inklusive der Immunglobulin-ähnlichen Domäne, der CBD und der drei Fibronectin-ähnlichen Domänen visualisierte, zeigte, dass die COOH-terminalen Abschnitte der CBD nach Ligandenbindung etwa 100 Å von der

Plasmamembran entfernt sind (85). Skiniotis und Mitarbeiter wiesen dabei nach, dass die Struktur von gp130 so ausgebildet ist, dass die membranproximalen Domänen von gp130 an der Zelloberfläche nahe beieinander liegen und somit die Aktivierung intrazellulärer Signalwege ermöglicht wird. Variationen dieser Rezeptorkonformation deuten auf einen Konformationsübergang von offenen zu geschlossenen Zuständen nach Ligandenbindung hin. Dieses Phänomen kann laut Skiniotis und Mitarbeitern auf andere Zytokinrezeptoren übertragen werden (85). Der IL-12R β 1 besteht unter anderem aus drei FNIII-Domänen, die in Analogie zu gp130 den C-Terminus des CBM von der Plasmamembran trennen könnten. Wenn davon ausgegangen werden kann, dass die Gesamtzusammensetzung von IL-23R / IL-12R β 1 mit derjenigen von gp130 vergleichbar ist, kann die minimale Anzahl von etwa 20 AS (etwa 80 Å) der mL-23R-Region des klassischen *stalks* ausreichen, um diese Entfernung zu überbrücken und biologische Aktivität zu ermöglichen (82). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass eine AS Länge zwischen 6 und 36 AS noch zu einer Aktivierung des Rezeptors führt und lässt damit die oben genannte Erklärung zu.

Der humane IL-23R zeigte ebenfalls eine stark eingeschränkte Proliferation ab einer *stalk*-Deletion von 20 AS (hIL-23R Δ 334–353), wohingegen die STAT3-Phosphorylierung unbeeinflusst blieb. Eventuell führt die Deletion dazu, dass die Signaltransduktion zwar gewährleistet ist, die Aktivierung der Zelle aber nicht ausreicht um eine adäquate Proliferation nachzuweisen.

Überraschenderweise zeigte eine Deletion von 31 AS eine nur geringfügig beeinflusste Zellproliferation bei stark reduzierter STAT3-Phosphorylierung. Dieses Ergebnis kann nicht durch die oben genannte *spacer*-Theorie erklärt werden und impliziert, dass andere strukturelle Grundlagen der hIL-23R *stalk* Region wichtig sind, die weitere Untersuchungen benötigen (82).

Im Gegensatz zu dem IL-23R ist der IL-6 Rezeptor nicht direkt an der Signaltransduktion beteiligt, sondern bildet den Rezeptorkomplex mit einem Homodimer aus gp130 (10). Der IL-6 Rezeptor besteht aus einer IG-like-Domäne (D1), dem Zytokinbindungsmodul (D2 und D3) und einer 52 AS langen, flexiblen *stalk* Region (86). Die *stalk* Region des IL-6 Rezeptors ist somit länger als die des IL-23R. Durch den ähnlichen Aufbau beider Rezeptoren ist der IL-6R aber dennoch ein idealer Vergleichspartner. Abbildung 34 zeigt den mL-23R, hIL-23R und hIL-6R im Vergleich zueinander.

```

mIL-23R ...VRCQETGKRNWQPWSSPFVHQTS-QETGKRNWQPWSSPFVHQTS-QTVSQVTAKSS-HEPQKMEMLSATIFRGHPASGNH-QDIGLL...
hIL-23R ...VRCQETGKRYWQPWSSPFFHKTP-----ETVPQVTSKAEQHDWTWNSGLTVASISTGHLTSDNRGDIIGLL...
hIL-6R  ...RAQEEFGQGEWSEWSP EAMGTPW          TESTSPPAENEVSTPMQALTTNKDDDNILFRDSANATSLPVQDSSSVPLPTFLVAG

```

Abbildung 34: Vergleich der hIL-23R, mIL-23R und hIL-6R Proteinsequenzen

Ein Vergleich der hIL-23R-, mIL-23R- und hIL-6R-Proteinsequenzen ist dargestellt. Grün hinterlegt ist der Abschnitt der Domäne 3, der das WQWPS-Motiv enthält, welches unterstrichen ist. Grau dargestellt ist der verlängerte *stalk*, schwarz zeigt die konventionelle *stalk* Region und die in lila dargestellte Sequenz entspricht der Transmembrandomäne.

Der humane und murine IL-23 Rezeptor und der IL-6 Rezeptor sowie die IL-12-Familie und die IL-6-Familie weisen viele Gemeinsamkeiten auf. Der IL-6 *stalk* könnte dafür verwendet werden, den Einfluss der Aminosäuresequenz des *stalk* auf die Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion herauszufinden. Entsprechende *stalk* Chimäre wurden in der AG kloniert. Im Gegensatz zu den zuvor klonierten Deletionsvarianten war dieser *stalk* länger und sollte ebenfalls im Hinblick auf seinen Einfluss auf das Proliferations- und Aktivierungsverhalten stabil transduzierter Ba/F3-Zellen untersucht werden. Dies wurde in der Masterarbeit von Marco Schönberg und der Dissertation von Thorben Hummel weiter untersucht.

Baran und Mitarbeiter zeigten, dass die *stalk* Region des IL-6 Rezeptors vor allem zwei Aufgaben hat. Zum einen reguliert sie innerhalb des IL-6-*Trans-signaling* die Proteolyse durch ADAM10 und ADAM17. Zum anderen fungiert die IL-6 *stalk* Region innerhalb der klassischen Signaltransduktion als *spacer*, um die richtige Konformation des IL-6R-gp130-Rezeptorkomplexes zu gewährleisten (84).

Der IL-23R enthält ebenfalls kritische Determinanten des ADAM10- und ADAM17-vermittelten Ektodomänensheddings. Kürzlich wurde mithilfe der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten IL-23R Deletionsvarianten gezeigt, dass sich die ADAM17-Spaltstelle im Bereich der AS-Reste 333 - 342 des murinen IL-23R und im Bereich der AS Reste 323 - 333 des humanen IL-23R befindet (87). Dabei wurde das ADAM17-vermittelte *shedding* durch die *stalk*-Deletion stärker beeinflusst, als das ADAM10-vermittelte *shedding*. Letzteres zeigte erst bei Deletion des juxtamembranen Bereichs eine verringerte Proteolyse (84). So lässt sich vermuten, dass die *stalk* Region des IL-23R

ähnlich der Funktion des IL-6 Rezeptors sowohl als *spacer* daran beteiligt ist Autoaktivierung zu verhindern, darüber hinaus aber ebenfalls das *shedding* beeinflusst.

4.3 Beeinflusst die Länge des *stalk* die Oberflächenexpression?

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Oberflächenexpression der IL-23R auf allen transduzierten Ba/F3-Zellen kontrolliert. Der positive Nachweis der IL-23-Rezeptoren auf der Zelloberfläche war Voraussetzung für weitere Untersuchungen. Alle getesteten murinen Varianten zeigten eine gleichermaßen ausgeprägte Oberflächenexpression der entsprechenden Rezeptoren. Der von Gregor Ciupka beschriebene Zusammenhang zwischen der Länge der *stalk* Region, dem Auftreten der 20 AS langen Duplikation und einer erfolgreichen Rezeptorexpression wurde somit widerlegt. Ciupka zeigte, dass die Zellreihen, die den mL-23R Δ 317-372 und den mL-23R Δ 317-336 exprimierten, eine stark verminderte Oberflächenexpression zeigten. In Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation wurden zwar geringe interzelluläre Abweichungen in der Stärke der Oberflächenexpression nachgewiesen, diese ließen aber keinen Schluss auf eine Regelmäßigkeit oder einen Zusammenhang mit der *stalk* Länge zu. Darüber hinaus war bei allen Zelllinien ein ausreichender *shift* nachweisbar, sodass trotz unterschiedlich starker Emission sicher von einer erfolgreichen Oberflächenexpression ausgegangen werden konnte.

Auch bei den weiteren, im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Rezeptorvarianten (murine Rezeptorvarianten ohne IL-12R β 1-Coexpression und die humanen WT-Varianten sowie die humanen Deletionsvarianten und die murin/humanen-Rezeptorvarianten) wurde eine Oberflächenexpression der entsprechenden Rezeptoren nachgewiesen. Unterschiede in der Stärke des *shifts*, wie es die humanen Rezeptoren im hIL-12R β 1-Nachweis zeigten, können im Zusammenhang mit dem verwendeten AK stehen und nur innerhalb der Zelllinie bei gleichem AK auf eine stärkere Oberflächenexpression schließen lassen.

4.4 Beeinflusst die Duplikatur die biologische Aktivität?

Der extrazelluläre Teil des IL-23R setzt sich, wie bereits beschrieben, aus einer IG-ähnlichen Domäne (D1), zwei Zytokin-Rezeptor Domänen (D2, D3) und der 37 AS langen humanen bzw. 36 AS langen murinen *stalk* Region zusammen (30). Dabei enthält die Domäne 3 das WQPWS-Motiv, welches Ähnlichkeiten zu dem WSXWS-Motiv anderer Rezeptoren der IL-12-Familie aufweist (30). Dieses WSXWS-Motiv ist vermutlich an der effizienten Rezeptorfaltung und der Zytokinerkennung beteiligt (42).

Die 20 AS lange Duplikatur, die sich nur bei dem murinen Rezeptor wiederfindet, enthält ebenfalls das WQPWS Motiv. Es ist allerdings unklar, ob diese Duplikatur zu der *stalk* Region oder zu Domäne 3 gehört. Um den Einfluss der Duplikatur auf das Proliferationsverhalten zu klären, wurden insgesamt drei Zelllinien generiert. Die Variante mL-23RΔ317-372 enthielt weder den *stalk* noch die 20 AS lange Duplikatur. Die Variante mL-23RΔ317-336 enthielt den kompletten, 36 AS langen *stalk* aber keine Duplikatur und die Variante mL-23RΔ333-372 enthielt keinen *stalk*, aber die komplette Duplikatur (vgl. Abbildung 35).

	D3 Region	stalk-Region
Murin WT	...VRCQETGKRNWQPWSSPFVHQTS-QETGKRNWQPWSSPFVHQTS	QTVSQVTAKSS-HEPQKMEMLSATIFRGHPASGNH-QDIGLLS...
Δ333-372	...VRCQETGKRNWQPWSSPFVHQTS-QETGKRNWQPWSSPFV-----	IGLLS...
Δ317-372	...VRCQETGKRNWQPWSSPFVHQTS-----	IGLLS...
Δ317-336	...VRCQETGKRNWQPWSSPFVHQTS-----	QTVSQVTAKSS-HEPQKMEMLSATIFRGHPASGNH-QDIGLLS...

Abbildung 35: Deletionsvarianten, die den Einfluss der Duplikatur analysieren sollten

Dargestellt ist anteilig die Aminosäuresequenz von drei verschiedenen IL-23R-Deletionsvarianten. Die Variante mL-23RΔ333-372 enthielt keinen *stalk*, aber die komplette 20 AS lange Duplikatur. Die Variante mL-23RΔ317-372 enthielt weder *stalk* noch Duplikatur und mL-23RΔ317-336 wies keine Duplikatur, aber den kompletten *stalk* auf. Grün hinterlegt ist der Abschnitt der Domäne 3, der das WQWPS-Motiv enthält, welches unterstrichen ist. Grau dargestellt ist der verlängerte *stalk*, schwarz zeigt die konventionelle *stalk* Region und die in lila dargestellte Sequenz entspricht der Transmembrandomäne.

Die vollständige Deletion der *stalk* Region des hIL-23R führte zu einer autonomen, ligandenunabhängigen Rezeptoraktivierung, wohingegen die reine Deletion des murinen *stalk* (mL-23RΔ333-372) dieses Verhalten nicht zeigte. Erst die zusätzliche Deletion des verlängerten *stalks*, bestehend aus dem konventionellem *stalk* und der 20 AS langen WSXWS-Duplikatur (mL-23RΔ317-336) führte zu einer ligandenunabhängigen, autonomen Rezeptoraktivierung. Die Deletion ausschließlich dieser Duplikatur bei komplett erhaltenem *stalk* (mL-23RΔ317-336) störte die IL-23-induzierte Signalgebung nicht, was nahelegt, dass das Motiv kein integraler Bestandteil von D3 ist (82).

Innerhalb der Duplikatur befindet sich das WQPWS-Motiv. Die Domäne 3 ist an der Rezeptorbindung beteiligt. Es kann vermutet werden, dass ein Einschneiden in diese Domäne 3 und eine gleichzeitige Deletion der WQPWS-tragenden Duplikatur zu einem veränderten Zytokinbindungsverhalten führen kann. Der exemplarische Nachweis des Zytokin-Bindungsverhaltens der Varianten mL-23RΔ333-372 und mL-23RΔ317-372 mittels Immunopräzipitation und Western Blot konnte allerdings zeigen, dass die

Deletion keinen Einfluss auf die Zytokinbindungsfähigkeit und damit auf die Rezeptorfaltung hat.

In der Literatur ist die Funktion dieser Duplikatur und des WQPWS-Motivs weiter ungeklärt. Lediglich die Ähnlichkeit des WQPWS-Motivs zu dem WSXWS-Motiv anderer Zytokine wurde beschrieben (30).

4.5 Ist ausschließlich der *stalk* für die Ergebnisse verantwortlich?

Wie bereits beschrieben sind die Domänen 2 und 3 an der Zytokinbindung beteiligt. In den vorliegenden Untersuchungen wurden jeweils 10 AS der IL-23R *stalk* Region deletiert. Dabei wurden bei den humanen und murinen Deletionsvarianten mit komplett deletiertem *stalk* anteilig Aminosäuren der Domäne D3 deletiert (siehe Abbildung 36).



Abbildung 36: Deletionsvarianten mit anteiliger Deletion der Domäne 3

Dargestellt sind die humanen und murinen Rezeptorvarianten, die zusätzlich zu der Deletion der *stalk* Region eine anteilige Deletion der Domäne 3 aufwiesen. Die Variante hIL-23R Δ 313-353 enthielt zusätzlich zu der *stalk* Deletion eine Deletion von 4 AS der Domäne 3. Bei den murinen Varianten mIL-23R Δ 333-372 und mIL-23R Δ 317-372 wurde zusätzlich zu dem *stalk* 3 AS bzw. die in D3 liegende Duplikatur entfernt. Grün hinterlegt ist der Abschnitt der Domäne 3, der das WQPWS-Motiv enthält, welches unterstrichen ist. Grau dargestellt ist der verlängerte *stalk*, schwarz zeigt die konventionelle *stalk* Region und die in lila dargestellte Sequenz entspricht der Transmembrandomäne.

Inwieweit eine unvollständige Domäne D3 einen Einfluss auf die IL-23 Signaltransduktion hat, wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die Vermutung liegt nahe, dass eine unvollständige zytokinbindende Domäne zu einer

Rezeptorfehlfaltung und damit zu einer eingeschränkten Zytokinbindung führt. Dies wurde allerdings durch die Koimmunpräzipitation (vgl. 3.3) eindeutig widerlegt, da eine uneingeschränkte Zytokinbindung für die murinen Varianten mL-23R Δ 333-372 und mL-23R Δ 317-372 nachgewiesen wurde (vgl. Abbildung 15). Dieses Experiment wurde für die humanen Varianten nicht durchgeführt. Aufgrund des vergleichbaren Verhaltens der murinen und humanen Rezeptorvarianten in allen durchgeführten Untersuchungen wurde jedoch von einem ähnlichen Verhalten dieser Varianten ausgegangen. Fraglich bleibt hingegen, ob die Duplikatur integraler Bestandteil von D3 ist (82).

4.6 Prolin gegen Leucin- beeinflusst der SNP die Rezeptorfunktion?

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) sind mit ca. 90% die am meist verbreitetsten Sequenz-Variationen, die im Genom vorkommen und treten alle 500-1000 Basenpaare auf (47). Diese SNPs können die Antwort des Individuums auf äußere Einflüsse verändern und sind damit ein interessanter Ansatzpunkt zur Untersuchung von Autoimmunerkrankungen. Verschiedene SNPs wurden innerhalb des IL-23R Gens im Zusammenhang mit IL-23-getriggerten Autoimmunerkrankungen identifiziert (57, 81).

Dabei wurden ebenfalls SNPs beschrieben, die protektiv auf das Auftreten verschiedener Autoimmunerkrankungen wirken. Zu diesen zählt beispielsweise der Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin an Position 381 R381Q. Der Aminosäureaustausch L310P, bei dem Leucin an Position 310 durch Prolin ersetzt wurde, zählt ebenfalls zu den protektiven SNPs und soll im Rahmen von Psoriasis-erkrankungen einen protektiven Einfluss haben (57).

Viele Autoimmunerkrankungen zeigen eine Assoziation mit SNPs des IL-23R Gens, so etwa Psoriasis (88-90) Rheumatoide Arthritis (91, 92), Morbus Behcet (93), Ankylosierende Spondylitis (94, 95), Morbus Alzheimer (96), Koronararterienerkrankungen (97) und Allergische Rhinitis (98).

Die P310L-Variante wurde von Gregor Ciupka durch eine zielgerichtete Mutagenese-PCR kloniert (73) und im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Ba/F3-Zellen transduziert. Als Ausgangs-DNA diente dabei die p409-mL-23R Δ 317-336-Variante, die durch die Deletion der Duplikatur der humanen Variante am ähnlichsten war.

Huber und Mitarbeiter vermuteten einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Morbus Basedow und dem SNP P310L (46). Die Studie konnte einen signifikanten Zusammenhang zwischen verschiedenen SNP-Mutationen und dem Auftreten von Morbus Basedow zeigen. Dabei könnte die Nähe des SNP P310L zu dem WQPWS-

Motiv und somit die Veränderung der Affinität von IL-23 zu seinem Rezeptor ein ausschlaggebender Faktor gewesen sein (46).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen konnten einen geringfügigen Unterschied des zytokinunabhängigen Wachstums der Ba/F3-Zellen mit SNP-Variante zeigen.

Weitere Untersuchungen zur Bestätigung der These von Huber und Mitarbeitern wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

4.7 IL-12R β 1 – Welche Rolle spielt der Co-Rezeptor bei der autonomen Rezeptoraktivierung?

Im Rahmen der Arbeit wurde gezeigt, dass die autonome, ligandenunabhängige Rezeptoraktivierung unabhängig von IL-12R β 1 war. Die molekulare Grundlage für diese IL-12R β 1-unabhängige sowie zytokinunabhängige Aktivierung konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden und war Bestandteil der Dissertation von Thorben Hummel.

Die Aktivierung der Januskinasen Jak2 und Tyk2 führt zu einer Aktivierung von STATs (64). IL-23 aktiviert vor allem STAT3, IL-12 hingegen aktiviert hauptsächlich STAT4. Darüber hinaus induziert die IL-23-Signaltransduktion in geringerem Ausmaß auch STAT1, STAT4 und STAT5 (30). Bindet IL-23 seinen Rezeptor, kommt es zu einer Heterodimerisierung der α -Kette IL-23R und der β -Kette IL-12R β 1 und in der Zelle wird der oben beschriebene JAK-STAT-Signalweg aktiviert (30).

Für den IL-6 Rezeptor gp130 konnten Rebouissou und Mitarbeiter bereits einen Zusammenhang zwischen Mutationen in dem IL-6 Rezeptorkomplex und dem Auftreten des inflammatorischen Leberzellkarzinoms nachweisen. Die Arbeitsgruppe identifizierte Mutationen in dem für den IL-6-Co-Rezeptor gp130 kodierenden IL-6ST-Gen, die in Patientengruppen mit Inflammatorischem Leberzellkarzinom auftraten. Für 60% der Karzinome ließ sich eine Mutation nachweisen, die die Bindungsstelle von gp130 zu IL-6 betrifft und zu einer ligandenunabhängigen STAT3-Aktivierung führte. Diese ligandenunabhängige STAT3-Aktivierung wies die Gruppe *in vitro* für gp130-Deletionsvarianten nach, nachdem die Mutationsvarianten *in vivo* identifiziert wurden (99). Ein vielversprechender Ansatz für weiterführende Forschungsprojekte, um die Relevanz der ligandenunabhängigen IL-23R-STAT3-Aktivierung darzustellen, wäre ein entsprechender Nachweis dieser konstitutiven IL-23R-Aktivierung im Patientenmodell. Die IL-6-Familie und die IL-12-Familie stehen durch strukturelle Gemeinsamkeiten ihrer Zytokine und Rezeptoren in einem engen Zusammenhang. IL-35 ist ein erstes interfamiliäres Zytokin, das sowohl der IL-6- als auch der IL-12-Familie angehört (10).

Dabei weisen der IL-12R β 1 und der, an der IL-6 vermittelten Signaltransduktion beteiligte gp130, starke Homologien auf (100). Baran und Mitarbeiter zeigten darüber hinaus Homologien zwischen der IL-23- und IL-6 Signaltransduktion und der *stalk*-Funktion. Im Gegensatz zu dem IL-6 Rezeptor ist der IL-23R jedoch über seinen intrazellulären Teil direkt an der Signaltransduktion beteiligt (30, 101). Dies ist vermutlich dafür verantwortlich, dass der IL-23R effektiver auf Mutationen und Deletionen reagiert. Deletionen könnten dann dazu führen, dass der IL-23R als signaltransduzierender Teil des Rezeptorkomplexes auch ohne β -Kette die Signalweiterleitung über eine Homodimerisierung ermöglicht. Abbildung 37 verdeutlicht das Modell der Homodimerisierung des IL-23R. Viele Zytokinrezeptoren scheinen als inaktive Komplexe an der Zelloberfläche vorzuliegen (82), so beispielsweise der Erythropoetin-Rezeptor (102-104), der Wachstumshormon-Rezeptor (105), der Gamma-Interferon-Rezeptor (106), der IL-6R und gp130 (107-109).

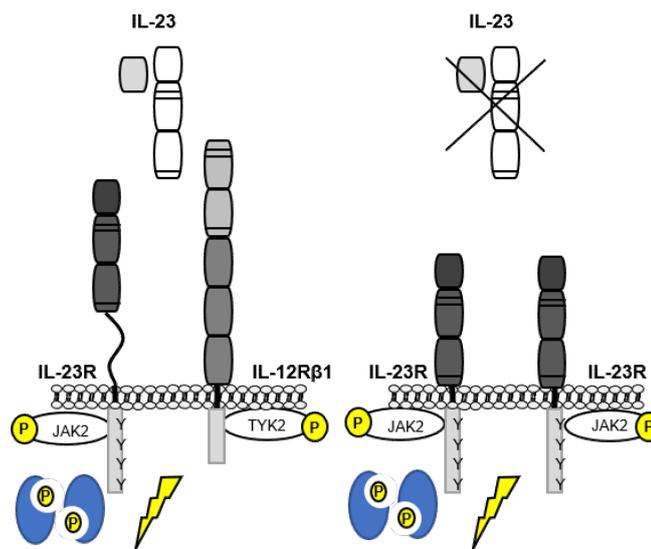


Abbildung 37: Modell der Homodimerisierung des *stalk*-defizienten IL-23R

Dargestellt ist ein mögliches Modell der Homodimerisierung des IL-23R. Der signalvermittelnde IL-23R besitzt eine JAK- und STAT-Bindestelle. In blau dargestellt sind die nach Rezeptoraktivierung dimerisierten und phosphorylierten STAT3-Moleküle. Nach *stalk* Deletion aktiviert sich der IL-23R sowohl unabhängig vom Zytokin, als auch unabhängig von dem Co-Rezeptor IL-12R β 1. Die linke Abbildung zeigt die Signaltransduktion der WT-Rezeptoren und die rechte Abbildung das Modell unter *stalk*-Deletion.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die IL-12R β 1-unabhängige Autoaktivierung der Deletionsvarianten nicht für die humanen Varianten überprüft. Allerdings sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für ein ähnliches Verhalten der humanen und murinen Rezeptorvarianten, trotz unterschiedlich langer *stalk* Region.

4.8 Welche Relevanz haben die Ergebnisse dieser Forschung für die Klinik?

Die Therapie von Autoimmunerkrankungen gestaltet sich aufgrund von interfamiliären Kreuzreaktionen und sowohl positiven als auch negativen Effekten der einzelnen Interleukine auf das Immunsystem als besonders schwierig. Die vollständige Charakterisierung des IL-23R ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von Medikamenten, die spezifischer und damit nebenwirkungsärmer wirken.

Die in dieser Arbeit *in vitro* gezeigten Grundlagen der IL-23R-*stalk*-Funktion sind dabei ein wichtiger Ausgangspunkt. Falls in weiterführenden Studien gezeigt wird, dass der IL-23R *stalk* auch *in vivo* an dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen beteiligt ist, könnten auf dieser Basis spezifische Medikamente entwickelt werden. Ein aussichtsreicher Ansatz für weitere Untersuchungen ist der Nachweis von *stalk* Deletions- und Mutationsvarianten in Patienten mit Autoimmunerkrankungen.

In der Literatur und der Klinik gibt es bereits Ansätze den IL-23R und sein Zytokin als zentrale Struktur im Auftreten von Autoimmunerkrankungen zu hemmen. Diese Ansätze fokussierten sich allerdings bisher auf das Zytokin selbst sowie den Rezeptorkomplex. Die Funktion der *stalk* Region wurde bisher nicht bedacht. Ein Großteil heutiger Therapiestrategien zielt als *p19*- oder *p40*-AK auf das Zytokin selbst ab. Dies ist vor allem durch die Struktur der IL-12 Familie problematisch. Die Verwendung der unterschiedlichen Untereinheiten innerhalb der IL-12 Familie führt zu unspezifischen Nebenwirkungen der gegen die IL-23- und IL-12-Untereinheiten gerichteten AK. Diese Nebenwirkungen beziehen sich dabei nicht allein auf die IL-23-vermittelte Signalkaskade, sondern ebenfalls auf die IL-12-Signaltransduktion (14).

Ein Beispiel für einen bereits in der Klinik vertetenen AK gegen die *p40* Untereinheit ist Ustekinumab. Ustekinumab ist ein humaner monoklonaler AK, der an die *p40*-Untereinheit von IL-12 bindet (110). Dieser AK interagiert mit dem IL-12R und dem IL-23R und greift darüber in die IL-23/17 Achse ein. Aktuelle Studien sprechen für den Erfolg von Ustekinumab und so wird er unter anderem bei MS, Rheumatoider Arthritis, Psoriasis und Morbus Crohn eingesetzt (111). Außerdem wird er als effektiver und sicherer Wirkstoff in der Therapie der axialen Spondyloarthritis beschrieben (112). Ein weiteres vielversprechendes Medikament ist der monoklonale AK Briakinumab, welcher gegen die *p40* UE gerichtet ist und bereits die Phase III klinischer Studien abgeschlossen hat (113).

Ein anderer Ansatz sind Alphabodies™, die bestimmte Antigene auf IL-23 binden. Durch ihre geringere Größe und höhere Spezifität haben sie Vorteile gegenüber den konventionellen oben genannten AK und können effektiver IL-23 neutralisieren (114).

p19-AK hingegen wirken spezifisch gegen IL-23 und wurden von Chen und Mitarbeitern auf ihre Wirksamkeit überprüft. Dabei zeigte sich ein positiver Einfluss der *p19*-AK im Hinblick auf die Entzündungsparameter bei induzierter Multipler Sklerose im Mausmodell. Der Erfolg der anti-IL-23-Therapie zeigte sich über eine Inhibierung der Invasion von T-Zellen und inflammatorischen Makrophagen in das zentrale Nervensystem (ZNS) sowie einer Reduktion der IL-17-produzierende Zellen in der mit *p19*-AK behandelten Mausgruppe gegenüber der Kontrollgruppe (115).

Insgesamt ist die Rolle von IL-23 im Zusammenhang mit Tumorentwicklung und Infektionen noch nicht zufriedenstellend geklärt. Dies erschwert eine Prognose der durch ein Hemmen der *p19* Untereinheit induzierten Nebenwirkungen. Neben den spezifischen Nebenwirkungen verursachen Antikörperbehandlungen auch unspezifische Nebenwirkungen, wie beispielsweise den anaphylaktischen Schock oder negative Immunantworten auf die fremden AK, die den Therapieerfolg negativ beeinflussen können (116).

Im Jahr 2006 durchgeführte Studien von Chen und Mitarbeitern zeigten Vorteile der *p19*-AK. Um die IL-23-Immunantwort gezielt zu blockieren, generierte die Gruppe anti-IL-23p19-spezifische AK und testeten, ob die Blockierung der IL-23-Funktion die experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (EAE), ein präklinisches Tiermodell der humanen Multiplen Sklerose, hemmen kann. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit Anti-IL-23p19 den Serumspiegel sowie die Expression im zentralen Nervensystem von IL-23-abhängigen, pathogenen T-Zellprodukten reduzierte. Darüber hinaus inhibierte die therapeutische Behandlung mit IL-23p19-AK während der aktiven Erkrankung die Ausbreitung des Proteolipidproteins (PLP) sowie ein Rezidiv der Erkrankung (115).

Es wurden jedoch ebenfalls Erfolge von monoklonalen AK gegen die IL-12- und IL-23-Untereinheit *p40* in Phase II Studien gezeigt. Die Behandlung von Patienten mit aktivem Morbus Crohn unter *p40*-Antikörpertherapie führte dabei neben einer Verbesserung der klinischen Symptome und labormikroskopischen Werten auch zu einer Verminderung von T_H1-vermittelten Zytokinen (117).

Alternative Therapiemöglichkeiten sind lösliche Rezeptoren. Diese sind bereits 2010 durch Yu und Gallagher beschrieben. Grundlage der Arbeit waren natürlich

vorkommende, humane IL-23R mRNA-Transkriptionsvarianten, denen das Exon 9 fehlt. Diese „Δ9“-Variante führte über die Antagonisierung des IL-23R zu einer Hemmung der T_H17-Zellreife (118).

Ein Problem, das allen immunmodulierenden Therapien gemeinsam ist und somit alle Hemmstoffe der IL-12 Familie betrifft, ist die fehlende Abwehr des Systems gegenüber externen Krankheitserregern. So führt beispielsweise die TNF-Blockade als ein Behandlungsansatz der Rheumatoiden Arthritis zu einem erhöhten Auftreten opportunistischer Infektionen (119). Dies ist ein Problem, das durch spezifischere Hemmstoffe zwar verbessert, aber nicht ausgeschaltet werden kann. Durch eine erhöhte Spezifität sollen zytokinübergreifende Nebenwirkungen reduziert werden. Hierfür ist die vollständige Charakterisierung des IL-23R eine wichtige Basis.

IL-23-spezifische Therapeutika könnten im Hinblick auf die Funktion der *stalk* Region, dem durch Franke gezeigten *shedding* (87) und den Ergebnissen dieser Doktorarbeit ein wichtiger Ansatz für die Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen sein.

5 Schlussfolgerungen

Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit war es, die *stalk* Region des IL-23R anhand von murinen und humanen Deletionsvarianten zu charakterisieren und die Rolle des *stalk* innerhalb der IL-23-abhängigen Signaltransduktion zu definieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu folgenden Erkenntnissen:

Eine mindestens 26 AS lange murine und 27 AS lange humane *stalk* Region ist obligat für eine uneingeschränkte Signaltransduktion. Weitere Deletionen des murinen *stalks* führen zu einem Nicht-Ansprechen der Zellen auf IL-23, wohingegen weitere Deletionen des humanen *stalk* zu uneinheitlichen Ergebnissen führen. Dies bedarf weiterer Untersuchungen.

Die komplette Deletion des humanen *stalk* sowie die komplette Deletion des murinen *stalk* bei gleichzeitiger Deletion der im murinen Rezeptor vorkommenden 20 AS langen Duplikatur der zytokinbindenden Domäne 3 induziert eine ligandenunabhängige, autonome Rezeptoraktivierung. Diese Autoaktivierung ist innerhalb des murinen Rezeptors Zytokin- und IL-12R β 1-unabhängig. Die Zytokinbindung hingegen bleibt von der Deletion unbeeinflusst.

Weder der AS-Austausch P310L noch die alleinige Deletion der Duplikatur zeigen Einschränkungen der IL-23-abhängigen Signaltransduktion. Allerdings führt der SNP P310L zu einer geringfügig erhöhten Hintergrundaktivität im Proliferationsassay. Dies könnte ein Hinweis auf einen wie von Huber und Mitarbeitern vermuteten Zusammenhang zwischen SNPs und Autoimmunerkrankungen sein.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Deletion der IL-23R *stalk* Region zu autoaktiven Zellen führt und diese Autonomie vermutlich durch eine Homodimerisierung der alpha-Rezeptorketten verursacht wird. In weiteren Forschungsarbeiten ist zu klären, welche Rolle die Aminosäuresequenz der *stalk* Region spielt sowie welche molekularen Prozesse hinter der hier gezeigten Autoaktivierung stehen. Dies war Thema weiterer Untersuchungen in der AG Scheller.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine bedeutsame Grundlage zur Charakterisierung der IL-23R *stalk* Region im Kontext von Autoimmunerkrankungen geschaffen werden. Die vollständige Analyse der Funktion der humanen IL-23R *stalk* Region stellt eine wichtige Basis zum Verständnis von Autoimmunerkrankungen dar. Ergebnisse weiterer Studien liefern entscheidende Erkenntnisse zur Generierung von neuen, effektiven und nebenwirkungsarmen Therapiemöglichkeiten von Autoimmunerkrankungen.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Zytokine der IL-12 Familie.....	3
Abbildung 2: Primärstruktur des humanen und des murinen IL-23R.....	6
Abbildung 3: Schematischer Ablauf der IL-23 vermittelten Signaltransduktion	10
Abbildung 4: Schematische Übersicht zur T-Zelldifferenzierung.....	13
Abbildung 5: SOE-PCR am Beispiel der IL-23 Deletionsvarianten	37
Abbildung 6: Aufbau des semi-dry Western Blot Verfahrens	45
Abbildung 7: Schematische Darstellung der murinen IL-23R-stalk-Deletionsvarianten	48
Abbildung 8: Erzeugung von IL-23 responsiven Ba/F3-Zellen	49
Abbildung 9: Analyse der Oberflächenexpression der verschiedenen Ba/F3-gp130 Zelllinien	50
Abbildung 10: Analyse der IL-23-abhängigen Zellproliferation von Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1 Zellen mit verschiedenen IL-23R stalk Deletionsvarianten.....	52
Abbildung 11: STAT3-Aktivierung von stimulierten Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen.....	54
Abbildung 12: Analyse der Oberflächenexpression der Ba/F3-gp130-mIL-23R Zellen mittels Durchflusszytometrie.....	56
Abbildung 13: Analyse der IL-23-abhängigen Zellproliferation von Ba/F3-gp130-mIL-23R-Zellen mit verschiedenen IL-23R-stalk-Deletionsvarianten	57
Abbildung 14: STAT3-Aktivierung von stimulierten Ba/F3-gp130-mIL-23R-Zellen mit verschiedenen IL-23R stalk Deletionsvarianten	58
Abbildung 15: Nachweis des Zytokin-Bindungsverhaltens der mIL-23R-Varianten mIL-23R Δ 333-372 und mIL-23R Δ 317-372 mittels Koproteinpräzipitation.	60
Abbildung 16: Vergleich der Primärstruktur von humanem und murinem IL-23R	61
Abbildung 17: Klonierung der hIL-23R und hIL-12R β 1 Varianten in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1	63
Abbildung 18: Übersicht der klonierten hIL-23R-Deletionsvarianten.....	64
Abbildung 19: Klonierung der Deletionsvarianten des hIL-23R in den Klonierungsvektor pCR-Script.....	65
Abbildung 20: Klonierung der Rezeptorvarianten in den Vektor p409.....	67
Abbildung 21: Testexpression des humanen IL-12R β 1 und der humanen IL-23R Varianten in COS-7-Zellen	69
Abbildung 22: Experimenteller Aufbau der Ba/F3-Zelltransduktion.....	70

Abbildung 23: Analyse der Oberflächenexpression der verschiedenen Ba/F3-gp130 Zelllinien mit den humanen Rezeptorvarianten hIL-12R β 1 und hIL-23R-WT mittels Durchflusszytometrie	72
Abbildung 24: Analyse der Oberflächenexpression der verschiedenen Ba/F3-gp130 Zelllinien mit den hIL-12R β 1, hIL-23R-WT und hIL-23R Deletionsvarianten mittels Durchflusszytometrie	74
Abbildung 25: Analyse der Ba/F3-gp130-hIL12R β 1-hIL-23R-WT Zellproliferation in Abhängigkeit von HIL-23	76
Abbildung 26: Analyse der IL-23-abhängigen Zellproliferation von Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1 Zellen mit verschiedenen IL-23R stalk Deletionsvarianten.....	77
Abbildung 27: STAT3-Aktivierung von stimulierten Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1-hIL-23R-Zellen.....	78
Abbildung 28: Die Unterdrückung der Signaltransduktion mittels JAK-Inhibitor in der Immunopräzipitation	80
Abbildung 29: Analyse der Oberflächenexpression der verschiedenen Ba/F3-gp130 Zelllinien mit den hIL-23R-WT und hIL-23R Deletionsvarianten mittels Durchflusszytometrie	81
Abbildung 30: Proliferationsverhalten der Ba/F3-gp130-hIL-23R-Zellen ohne hIL12R β 1-Co-Expression.....	82
Abbildung 31: Vergleich der IL-23R Proteinsequenz verschiedener Spezies	83
Abbildung 32: Analyse der Oberflächenexpression der Rezeptorvarianten mL-12R β 1 und hIL-23R-WT mittels Durchflusszytometrie	84
Abbildung 33: Analyse der IL-23-abhängigen Zellproliferation von Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-hIL-23R-Zellen.....	85
Abbildung 34: Vergleich der hIL-23R, mL-23R und hIL-6R Proteinsequenzen	89
Abbildung 35: Deletionsvarianten, die den Einfluss der Duplikatur analysieren sollten	91
Abbildung 36: Deletionsvarianten mit anteiliger Deletion der Domäne 3	92
Abbildung 37: Modell der Homodimerisierung des stalk-defizienten IL-23R	95

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Zelllinien	16
Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien.....	17
Tabelle 3: Liste der verwendeten Kits	20
Tabelle 4: Zusammensetzung der Puffer S1 -3 für die Minipräparation und DNA-Analyse	21
Tabelle 5: Puffer für die Western Blot Analysen.....	21
Tabelle 6: Gele für die Western Blot Analysen.....	22
Tabelle 7: Puffer und Lösungen für die IP	23
Tabelle 8: Sonstige Puffer und Lösungen	23
Tabelle 9: Liste verwendeter Medien.....	24
Tabelle 10: Liste verwendeter Antibiotika und Bakterienkulturen.....	24
Tabelle 11: Liste verwendeter Zytokine.....	25
Tabelle 12: Liste verwendeter AK.....	25
Tabelle 13 Liste der verwendeten Primer.....	27
Tabelle 14: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	28
Tabelle 15: Liste der verwendeten Geräte	29
Tabelle 16: Liste verwendeter Plasmide.....	31
Tabelle 17: Übersicht der verwendeten Softwares und Datenbanken	32
Tabelle 18: Standard-PCR Programm.....	35
Tabelle 19: PCR-Mastermix	36
Tabelle 20: PCR-Ansatz der flankierenden-PCR	37
Tabelle 21: Transduktionstabelle.....	71

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *The journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S53-72.
2. Brocker C, Thompson D, Matsumoto A, Nebert DW, Vasiliou V. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Human genomics*. 2010;5(1):30-55.
3. Bazan JF. A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989;164(2):788-95.
4. Boulay JL, O'Shea JJ, Paul WE. Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. *Immunity*. 2003;19(2):159-63.
5. Hymowitz SG1, Filvaroff EH, Yin JP, Lee J, Cai L, Risser P, Maruoka M, Mao W, Foster J, Kelley RF, Pan G, Gurney AL, de Vos AM, Starovasnik MA. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *The EMBO journal*. 2001;20(19):5332-41.
6. McDonald NQ, Hendrickson WA. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell*. 1993;73(3):421-4.
7. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annual review of immunology*. 1998;16:293-322.
8. Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *The journal of clinical investigation*. 2011;121(9):3375-83.
9. Akdis M1, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, Klunker S, Meyer N, O'Mahony L, Palomares O, Rhyner C, Ouaked N, Schaffartzik A, Van De Veen W, Zeller S, Zimmermann M, Akdis CA. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *The journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(3):701-21.e1-70.
10. Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, Muller-Newen G, Grotzinger J, Rose-John S, Scheller J. Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine growth factor rev*. 2012;23(3):85-97.
11. 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. *Frontiers in immunology*. 2016;7:479.
12. Jones LL, Vignali DA. Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunologic research*. 2011;51(1):5-14.

13. Skiniotis G, Lupardus PJ, Martick M, Walz T, Garcia KC. Structural organization of a full-length gp130/LIF-R cytokine receptor transmembrane complex. *Molecular cell*. 2008;31(5):737-48.
14. 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, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, 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. *Immunity*. 2000;13(5):715-25.
15. Gee K, Guzzo C, Che Mat NF, Ma W, Kumar A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflammation & allergy drug targets*. 2009;8(1):40-52.
16. Kobayashi M FL, Ryan M, Hewick RM, Clark S, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchierit A. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 1989 Sep 1; 170(3): 827–845. 1989.
17. Gately MK1, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annual review of immunology*. 1998;16:495-521.
18. 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. *The journal of biological chemistry*. 2003;278(3):1910-4.
19. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends in immunology*. 2006;27(1):17-23.
20. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, McClanahan TK, O'Shea JJ, Cua DJ. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nature immunology*. 2009;10(3):314-24.
21. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nature reviews immunology*. 2014;14(9):585-600.
22. 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. *Immunity* 2002;16(6):779-90.
23. Wojno ED, Hunter CA. New directions in the basic and translational biology of interleukin-27. *Trends in immunology*. 2012;33(2):91-7.

24. Collison LW¹, 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. *Nature*. 2007;450(7169):566-9.
25. Lupardus PJ, Garcia KC. The structure of interleukin-23 reveals the molecular basis of p40 subunit sharing with interleukin-12. *Journal of molecular biology*. 2008;382(4):931-41.
26. Vignali DAA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Immunology*. 2012;13(8):722-8.
27. 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. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*. 1996;93(24):14002-7.
28. O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*. 2002;109 Suppl:S121-31.
29. 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. *The journal of experimental medicine*. 1995;181(1):399-404.
30. 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 AM, 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-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;168(11):5699-708.
31. Floss DM, Schroder J, Franke M, Scheller J. Insights into IL-23 biology: From structure to function. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(5):569-78.
32. 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;172(4):2225-31.
33. Collison LW¹, 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. *Nature Immunology*. 2012;13(3):290-9.
34. Wang RX, Yu CR, Dambuza IM, Mahdi RM, Dolinska MB, Sergeev YV, Wingfield PT, Kim SH, Egwuagu CE. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nature medicine*. 2014;20(6):633-41.

35. Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Cua DJ. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunological reviews*. 2004;202:96-105.
36. Van de Vosse E, Lichtenauer-Kaligis EG, van Dissel JT, Ottenhoff TH. Genetic variations in the interleukin-12/interleukin-23 receptor (beta1) chain, and implications for IL-12 and IL-23 receptor structure and function. *Immunogenetics*. 2003;54(12):817-29.
37. Yoon C, Johnston SC, Tang J, Stahl M, Tobin JF, Somers WS. Charged residues dominate a unique interlocking topography in the heterodimeric cytokine interleukin-12. *The EMBO journal*. 2000;19(14):3530-41.
38. Schroder J, Moll JM, Baran P, Grotzinger J, Scheller J, Floss DM. Non-canonical interleukin 23 receptor complex assembly: p40 protein recruits interleukin 12 receptor beta1 via site II and induces p19/interleukin 23 receptor interaction via site III. *The journal of biological chemistry*. 2015;290(1):359-70.
39. Torti DC, Feldman SR. Interleukin-12, interleukin-23, and psoriasis: current prospects. *Journal of the american academy of dermatology*. 2007;57(6):1059-68.
40. Beyer BM, Ingram R, Ramanathan L, Reichert P, Le HV, Madison V, Orth P. Crystal structures of the pro-inflammatory cytokine interleukin-23 and its complex with a high-affinity neutralizing antibody. *Journal of molecular biology*. 2008;382(4):942-55.
41. Bloch Y, Bouchareychas L, Merceron R, Skladanowska K, Van den Bossche L, Detry S, Govindarajan S, Elewaut D, Haerynck F, Dullaers M, Adamopoulos IE, Savvides SN. Structural Activation of Pro-inflammatory Human Cytokine IL-23 by Cognate IL-23 Receptor Enables Recruitment of the Shared Receptor IL-12Rbeta1. *Immunity*. 2018;48(1):45-58 e6.
42. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*. 1990;87(18):6934-8.
43. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The biochemical journal*. 1998;334 (Pt 2):297-314.
44. 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. *The journal of biological chemistry*. 2013;288(27):19386-400.
45. 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 beta1 and interleukin 23 receptor to Janus kinases. *Molecular biology of the cell*. 2016;27(14):2301-16.

46. Huber AK, Jacobson EM, Jazdzewski K, Concepcion ES, Tomer Y. Interleukin (IL)-23 receptor is a major susceptibility gene for Graves' ophthalmopathy: the IL-23/T-helper 17 axis extends to thyroid autoimmunity. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(3):1077-81.
47. Wang X, Tomso DJ, Liu X, Bell DA. Single nucleotide polymorphism in transcriptional regulatory regions and expression of environmentally responsive genes. *Toxicology and applied pharmacology*. 2005;207(2 Suppl):84-90.
48. Duerr RH1, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006;314(5804):1461-3.
49. Lu ZK, Chen ZR, Zhu JY, Xu Y, Hua X. Analysis of the association of single nucleotide polymorphisms of interleukin-23 receptor (IL-23R) and inflammatory bowel disease in a Chinese Han cohort. *Oncotarget*. 2016;7(42):67851-6.
50. Cho ML1, Kang JW, Moon YM, Nam HJ, Jhun JY, Heo SB, Jin HT, Min SY, Ju JH, Park KS, Cho YG, Yoon CH, Park SH, Sung YC, Kim HY. STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;176(9):5652-61.
51. Zou J, Presky DH, Wu CY, Gubler U. Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases. *The journal of biological chemistry*. 1997;272(9):6073-7.
52. Chua AO, Wilkinson VL, Presky DH, Gubler U. Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1995;155(9):4286-94.
53. Collison LW, Vignali DA. Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunological reviews*. 2008;226:248-62.
54. Wu C, Wang X, Gadina M, O'Shea JJ, Presky DH, Magram J. IL-12 receptor beta 2 (IL-12R beta 2)-deficient mice are defective in IL-12-mediated signaling despite the presence of high affinity IL-12 binding sites. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2000;165(11):6221-8.
55. Usacheva A1, Sandoval R, Domanski P, Kotenko SV, Nelms K, Goldsmith MA, Colamonici OR. Contribution of the Box 1 and Box 2 motifs of cytokine receptors to Jak1 association and activation. *The journal of biological chemistry*. 2002;277(50):48220-6.
56. Faragó B1, Magyar L, Sáfrány E, Csöngéi V, Járomi L, Horvatovich K, Sipeky C, Maász A, Radics J, Gyetvai A, Szekanecz Z, Czirják L, Melegh B. Functional

variants of interleukin-23 receptor gene confer risk for rheumatoid arthritis but not for systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008;67(2):248-50.

57. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *The journal of investigative dermatology*. 2009;129(6):1339-50.
58. Orange JS, Biron CA. Characterization of early IL-12, IFN- α , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1996;156(12):4746-56.
59. 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. *Nature*. 2003;421(6924):744-8.
60. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science (New York, NY)*. 1993;260(5107):547-9.
61. Scharon-Kersten T, Afonso LC, Wsocka M, Trinchieri G, Scott P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1995;154(10):5320-30.
62. Decken K, Kohler G, Palmer-Lehmann K, Wunderlin A, Mattner F, Magram J, Gately MK, Alber G. Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*. 1998;66(10):4994-5000.
63. 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. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(12):1951-7.
64. Lankford CS, Frucht DM. A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity. *Journal of leukocyte biology*. 2003;73(1):49-56.
65. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology*. 1989;7:145-73.
66. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1986;136(7):2348-57.
67. Schmitt N, Ueno H. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. *Current opinion in immunology*. 2015;34:130-6.

68. Basu R, Hatton RD, Weaver CT. The Th17 family: flexibility follows function. *Immunological reviews*. 2013;252(1):89-103.
69. Harrington LE1, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology*. 2005;6(11):1123-32.
70. 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. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(2):233-40.
71. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology*. 2005;6(11):1133-41.
72. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2000;165(11):6107-15.
73. Ciupka G. Funktionelle Charakterisierung der stalk-Region des Interleukin 23 Rezeptors in der Signaltransduktion. 2014.
74. Ketteler R, Glaser S, Sandra O, Martens UM, Klingmuller U. Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene therapy*. 2002;9(8):477-87.
75. Gearing DP, Ziegler SF, Comeau MR, Friend D, Thoma B, Cosman D, Park L, Mosley B.. Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*. 1994;91(3):1119-23.
76. Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff JP, Kallen KJ, Wollmer A, Grötzinger J, Rose-John S. I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nature biotechnology*. 1997;15(2):142-5.
77. Althoff K, Mullberg J, Aasland D, Voltz N, Kallen K, Grotzinger J, Rose-John S. Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins. *The biochemical journal*. 2001;353(Pt 3):663-72.
78. 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. *Molecular biology of the cell*. 2010;21(15):2797-807.

79. Dagil R, Knudsen MJ, Olsen JG, O'Shea C, Franzmann M, Goffin V, Teilum K, Breinholt J, Kragelund BB. The WSXWS motif in cytokine receptors is a molecular switch involved in receptor activation: insight from structures of the prolactin receptor. *Structure* (London, England : 1993). 2012;20(2):270-82.
80. 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. *Cell*. 1985;41(3):727-34.
81. de Paus RA, van de Wetering D, van Dissel JT, van de Vosse E. IL-23 and IL-12 responses in activated human T cells retrovirally transduced with IL-23 receptor variants. *Molecular immunology*. 2008;45(15):3889-95.
82. Hummel TM, Ackfeld T, Schonberg M, Ciupka G, Schulz F, Oberdoerster A, Grötzinger J, Scheller J, Floss DM. Synthetic Deletion of the Interleukin 23 Receptor (IL-23R) Stalk Region Led to Autonomous IL-23R Homodimerization and Activation. *Molecular and cellular biology*. 2017;37(17).
83. Vignali DA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature immunology*. 2012;13(8):722-8.
84. Baran P, Nitz R, Grotzinger J, Scheller J, Garbers C. Minimal interleukin 6 (IL-6) receptor stalk composition for IL-6 receptor shedding and IL-6 classic signaling. *The journal of biological chemistry*. 2013;288(21):14756-68.
85. Skiniotis G, Boulanger MJ, Garcia KC, Walz T. Signaling conformations of the tall cytokine receptor gp130 when in complex with IL-6 and IL-6 receptor. *Nature structural & molecular biology*. 2005;12(6):545-51.
86. Sprecher CA, Grant FJ, Baumgartner JW, Presnell SR, Schrader SK, Yamagiwa T, Whitmore TE, O'Hara PJ, Foster DF. Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;246(1):82-90.
87. Franke M, Schroder J, Monhasery N, Ackfeld T, Hummel TM, Rabe B, Garbers C, Becker-Paully C, Floss DM, Scheller J. Human and murine Interleukin 23 receptors are novel substrates for a disintegrin and metalloproteases ADAM10 and ADAM17. *The journal of biological chemistry*. 2016.
88. Capon F, Di Meglio P, Szaub J, Prescott NJ, Dunster C, Baumber L, Timms K, Gutin A, Abkevic V, Burden AD, Lanchbury J, Barker JN, Trembath RC, Nestle FO. Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. *Human genetics*. 2007;122(2):201-6.
89. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP, Matsunami N, Ardlie KG, Civello D, Catanese JJ, Leong DU, Panko JM, McAllister LB, Hansen CB, Papenfuss J, Prescott SM, White TJ, Leppert MF, Krueger GG, Begovich AB. A large-

scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *American journal of human genetics*. 2007;80(2):273-90.

90. Nair RP, Ruether A, Stuart PE, Jenisch S, Tejasvi T, Hiremagalore R, Schreiber S, Kabelitz D, Lim HW, Voorhees JJ, Christophers E, Elder JT, Weichenthal M. Polymorphisms of the IL12B and IL23R genes are associated with psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128(7):1653-61.

91. Hollis-Moffatt JE, Merriman ME, Rodger RA, Rowley KA, Chapman PT, Dalbeth N, Gow PJ, Harrison AA, Highton J, Jones PBB, O'Donnell JL, Stamp LK, Merriman TR. Evidence for association of an interleukin 23 receptor variant independent of the R381Q variant with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(8):1340-4.

92. Hamdy G, Darweesh H, Khattab EA, Fawzy S, Fawzy E, Sheta M. Evidence of association of interleukin-23 receptor gene polymorphisms with Egyptian rheumatoid arthritis patients. *Human immunology*. 2015;76(6):417-20.

93. Yalcin B, Atakan N, Dogan S. Association of interleukin-23 receptor gene polymorphism with Behcet disease. *Clinical and experimental dermatology*. 2014;39(8):881-7.

94. Dong H, Li Q, Zhang Y, Tan W, Jiang Z. IL23R gene confers susceptibility to ankylosing spondylitis concomitant with uveitis in a Han Chinese population. *PloS one*. 2013;8(6):e67505.

95. Xu B, Ma JX, Ma XL, Jia HB, Feng R, Xu LY. Association between rs7517847 and rs2201841 polymorphisms in IL-23 receptor gene and risk of ankylosing spondylitis: a meta-analysis. *PeerJ*. 2015;3:e910.

96. Liu Y, Yu JT, Zhang W, Zong Y, Lu RC, Zhou J, Tan L. Interleukin-23 receptor polymorphisms are associated with Alzheimer's disease in Han Chinese. *Journal of neuroimmunology*. 2014;271(1-2):43-8.

97. Zhang M, Cai ZR, Zhang B, Cai X, Li W, Guo Z, Lan M. Functional polymorphisms in interleukin-23 receptor and susceptibility to coronary artery disease. *DNA and cell biology*. 2014;33(12):891-7.

98. Hu D, Hu G, Zhu J, Shen Y, Kang H, Hong S. Association between polymorphisms of the IL-23R gene and allergic rhinitis in a Chinese Han population. *PloS one*. 2013;8(5):e63858.

99. 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. *Nature*. 2009;457(7226):200-4.

100. Chua AO, Chizzonite R, Desai BB, Truitt TP, Nunes P, Minetti LJ, Warriar 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1994;153(1):128-36.

101. Saito M, Yoshida K, Hibi M, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1992;148(12):4066-71.

102. Constantinescu SN, Keren T, Socolovsky M, Nam H, Henis YI, Lodish HF. Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*. 2001;98(8):4379-84.

103. Livnah O, Stura EA, Middleton SA, Johnson DL, Jolliffe LK, Wilson IA. Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science (New York, NY)*. 1999;283(5404):987-90.

104. Remy I, Wilson IA, Michnick SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science (New York, NY)*. 1999;283(5404):990-3.

105. Frank SJ. Receptor dimerization in GH and erythropoietin action--it takes two to tango, but how? *Endocrinology*. 2002;143(1):2-10.

106. Krause CD, Mei E, Xie J, Jia Y, Bopp MA, Hochstrasser RM, Pestka S. Seeing the light: preassembly and ligand-induced changes of the interferon gamma receptor complex in cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2002;1(10):805-15.

107. Giese B, Roderburg C, Sommerauer M, Wortmann SB, Metz S, Heinrich PC, Müller-Newen G. Dimerization of the cytokine receptors gp130 and LIFR analysed in single cells. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 21):5129-40.

108. Schuster B, Meinert W, Rose-John S, Kallen KJ. The human interleukin-6 (IL-6) receptor exists as a preformed dimer in the plasma membrane. *FEBS letters*. 2003;538(1-3):113-6.

109. Tenhumberg S, Schuster B, Zhu L, Kovaleva M, Scheller J, Kallen KJ, Rose-John S, Kovaleva M. gp130 dimerization in the absence of ligand: preformed cytokine receptor complexes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;346(3):649-57.

110. 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. *Nature biotechnology*. 2011;29(7):615-24.

111. Tang C, Chen S, Qian H, Huang W. Interleukin-23: as a drug target for autoimmune inflammatory diseases. *Immunology*. 2012;135(2):112-24.

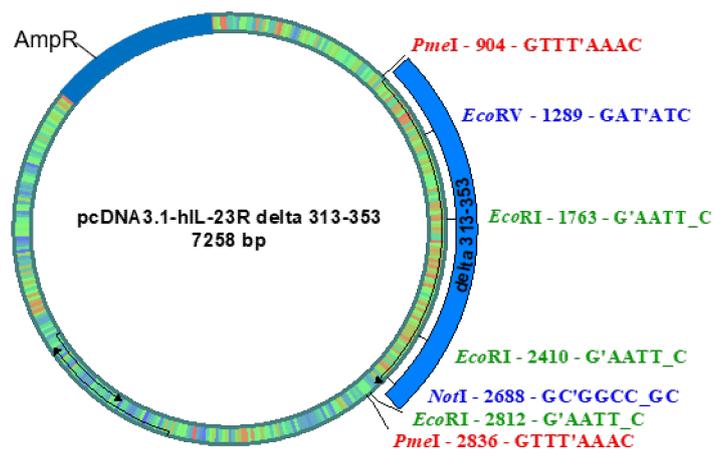
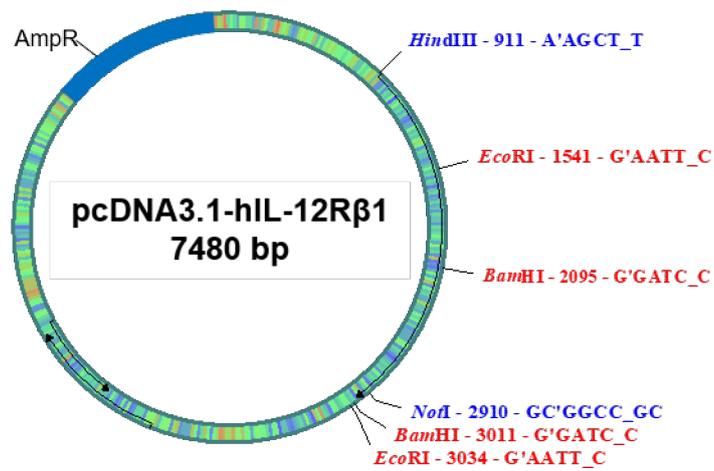
112. Paine A, Ritchlin CT. Targeting the interleukin-23/17 axis in axial spondyloarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*. 9000;Publish Ahead of Print.

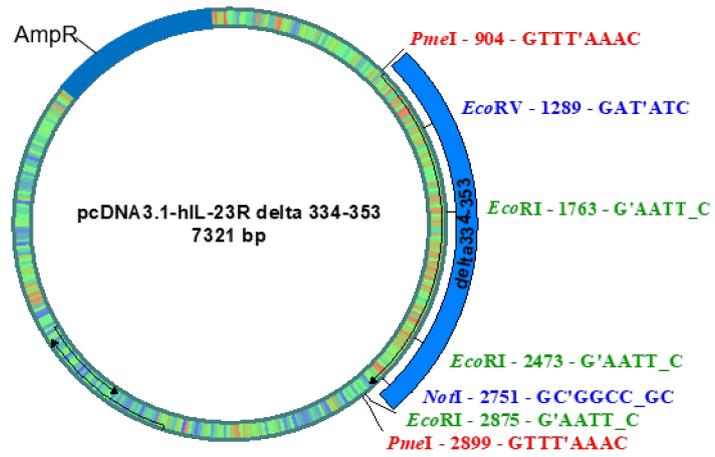
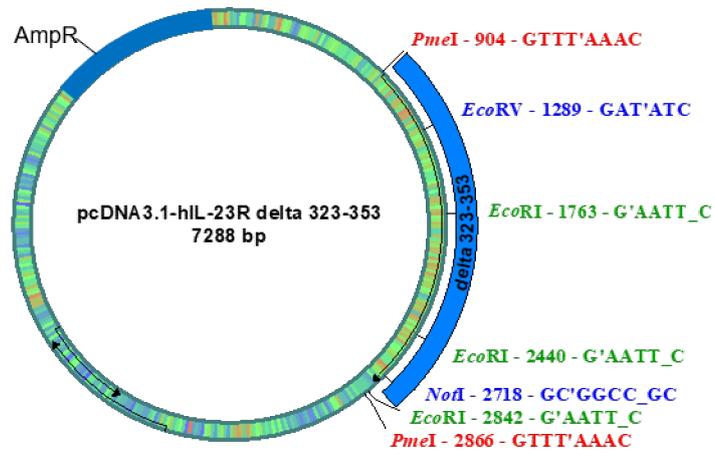
113. Croxford AL, Kulig P, Becher B. IL-12-and IL-23 in health and disease. *Cytokine growth factor Review* 2014; 25(4):415-21.
114. Desmet J, Henderikx MP, Somers K, Loverix S, Vaeck M, Lasters I. Polypeptides specifically binding to IL-23. United States 2015.
115. Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh 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. *The journal of clinical investigation*. 2006;116(5):1317-26.
116. Gallagher G, Yu R, Brazaitis J. Novel Polypeptides That Bound to IL-23 Receptor and Inhibit Binding of IL-23 and Cell Signaling Thereof. United States patent application publication.
117. Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezado M, Yang Z, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U, Strober W; Anti-IL-12 Crohn's Disease Study Group. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *The new england journal of medicine*. 2004;351(20):2069-79.
118. Yu RY, Gallagher G. A naturally occurring, soluble antagonist of human IL-23 inhibits the development and in vitro function of human Th17 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;185(12):7302-8.
119. Gardam MA, Keystone EC, Menzies R, Manners S, Skamene E, Long R, Vinh DC. Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. *The lancet infectious diseases*. 2003;3(3):148-55.

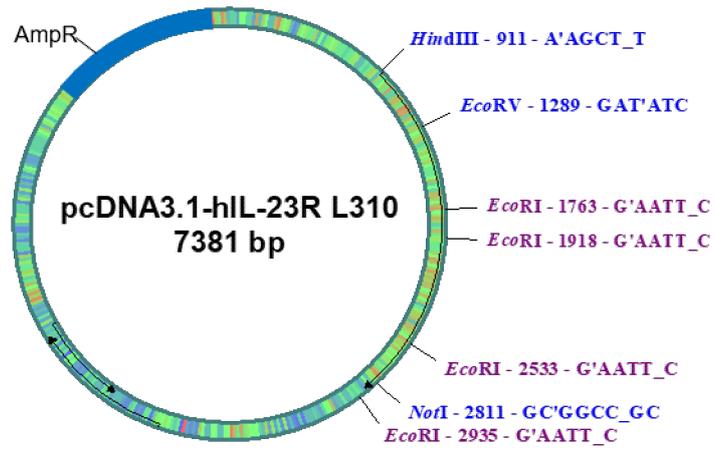
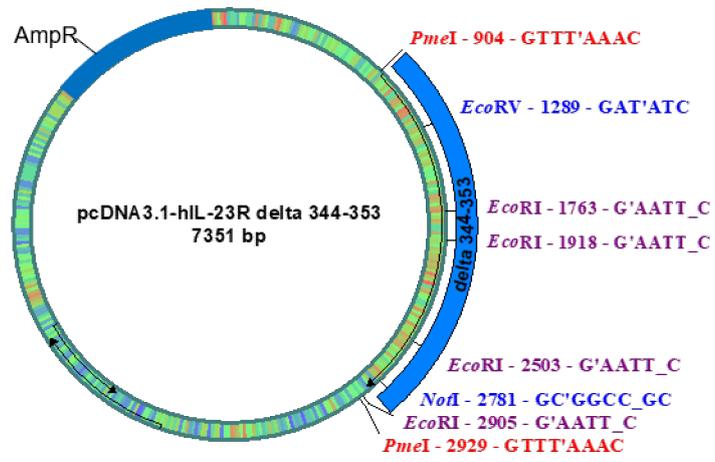
9 Anhang

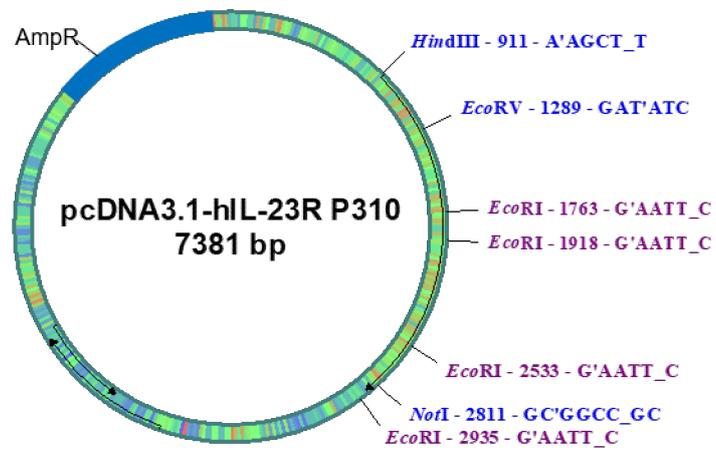
Vektorkarten

Im Folgenden gezeigt sind die Deletionsvarianten des humanen IL-23R in dem pcDNA3.1 Vektor.









Danksagung

Mein Dank gilt in allererster Linie meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Scheller, welcher stets für mich erreichbar war und mir mit wertvollen Ratschlägen zur Seite stand. Nie habe ich dies als selbstverständlich angesehen. Vielen Dank.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Doreen M. Floss für die hervorragende wissenschaftliche sowie menschliche Zusammenarbeit bedanken. Zu jeder Zeit war sie für mich erreichbar und hat mich stets motiviert und inspiriert.

Besonders danken möchte ich der gesamten AG Scheller. Dank der hervorragenden Zusammenarbeit war die Zeit im Labor für mich extrem bereichernd. Es war mir eine große Freude mit ihnen zusammenzuarbeiten. Herzlichen Dank.

Ein besonderer Dank gilt darüberhinaus meinen Freunden. Insbesondere nennen möchte ich dabei: Kim Kotte, Aline Kaletsch, Eva Waltermann, Henrike Papenbrock, Svenja Niebel und Maria-Louise Friess. Ihre Unterstützung in allen Lebenslagen war nicht nur für die Fertigung dieser Doktorarbeit unerlässlich, sondern wird es auch in Zukunft in allen beruflichen und privaten Schritten bleiben.

Mein größtes Dankeschön geht an meine Familie. Meine Eltern sowie Regina Löseke haben mir dieses Studium ermöglicht und mir dadurch die Türen zu der Welt der Wissenschaft geöffnet. Ihre bedingungslose Liebe sowie der Ehrgeiz und Wissensdurst, den sie mir vorgelebt haben, haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Brüdern Daniel und Robin von ganzem Herzen danken. Sie haben mir immer zur Seite gestanden und mich gelehrt was Teamarbeit bedeutet. -Danke.

Eidesstattliche Versicherung

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

19.09.2020, Theresa ACKFELD
