

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

Erzeugung konstitutiv aktiver IL-23-Rezeptoren durch Deletion der *stalk*-Region

Dissertation

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

vorgelegt von
Thorben Hummel

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit 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. med. Bodo Levkau

Für Franziska und Frida

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Franke, M., Schroder, J., Monhasery, N., Ackfeld, T., Hummel, T. M., Rabe, B., Garbers, C., Becker-Pauly, C., Floss, D. M. & Scheller, J., (2016), Human and murine Interleukin 23 receptors are novel substrates for a disintegrin and metalloproteases ADAM10 and ADAM17. *Journal of Biological Chemistry*, (291) 10551-10561

Hummel, T. M., Ackfeld, T., Schonberg, M., Ciupka, G., Schulz, F., Oberdoerster, A., Grotzinger, J., Scheller J. & Floss, D. M., (2017), Synthetic deletion of the Interleukin 23 receptor (IL-23R) stalk region led to autonomous IL-23R homodimerization and activation. *Molecular and Cellular Biology*, (37) e00014-17

Auszüge dieser Arbeit wurden auf dem Symposium der Medical Research School der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im April 2017 vorgestellt und mit dem Preis „Bestes Poster“ ausgezeichnet.

Zusammenfassung dt.

Zytokine sind wichtige Vermittler der Kommunikation zwischen Zellen. Als Mitglied der Interleukin (IL)-12-Zytokinfamilie ist das Zytokin IL-23 an der physiologischen und pathologischen Immunantwort beteiligt. Zudem steht es in Zusammenhang mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Krebs. Die Untereinheiten p19 und p40 bilden das heterodimere Zytokin IL-23, das ebenfalls an einen heterodimeren Rezeptorkomplex aus IL-12R β 1 und IL-23R bindet. Innerhalb des IL-23R befindet sich eine unstrukturierte *stalk*-Region, deren Funktion bisher nur unvollständig geklärt ist. Bereits innerhalb der AG Scheller erhobene Daten zur Bedeutung der IL-23R-*stalk*-Region wurden im Rahmen dieser Arbeit verifiziert und vervollständigt. Weiterhin wurden neue Erkenntnisse bezüglich einer ligandenunabhängigen, autonomen Rezeptoraktivität von *stalk*-Deletionsvarianten des IL-23R beschrieben. Einige der durchgeführten Untersuchungen basierten auf einer Analyse der Jak/STAT-vermittelten IL-23-Signaltransduktion mithilfe IL-23-responsiver Ba/F3-gp130-Zelllinien, die bestimmte Rezeptorvarianten des IL-23R exprimierten. Die transduzierten Ba/F3-gp130-Zelllinien wurden hinsichtlich der IL-23-abhängigen Zellproliferation sowie der Aktivierung von STAT3 untersucht. Zugleich wurde eine potentielle IL-23R-Homodimerisierung in Co-Immunoprecipitationsexperimenten analysiert und bestätigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Länge der IL-23R-*stalk*-Region entscheidend für die IL-23-Signaltransduktion ist. Für eine Aktivierung des Rezeptors wurden mindestens 27 AS der hIL-23R- bzw. 26 AS der mIL-23R-*stalk*-Region benötigt.

Eine vollständige Deletion der *stalk*-Region (hIL-23R) beziehungsweise der „erweiterten“ *stalk*-Region (mIL-23R) führte zu einer konstitutiven Rezeptoraktivierung. Diese wurde zusätzlich in transient transfizierten Fibrosarkomzellen (U4C-Zellen) bestätigt und erfolgte ohne Beteiligung des IL-12R β 1 durch Homodimerisierung des IL-23R. Letztendlich wurde mit dem Nachweis biologisch aktiver IL-23R-Homodimere ein neuer Rezeptorkomplex der IL-12-Familie beschrieben.

Zusammenfassung engl.

Cytokines are important mediators of cell-to-cell communication. Interleukin (IL)-23 is a member of the IL-12 cytokine family which is crucially involved in immune responses under physiological and pathological conditions. Moreover, IL-23 is associated with pathogenesis of autoimmune disorders and cancer. The heterodimeric cytokine IL-23 (p19 + p40) binds the heterodimeric receptor complex consisting of IL-12R β 1 and IL-23R. The receptor subunit IL-23R contains a structurally undefined stalk region. Already published data by the Institute of Biochemistry and Molecular Biology II, HHU, Düsseldorf concerning the IL-23R stalk region could be verified and completed within this thesis. Furthermore, ligand independent autonomous receptor activity was detected in IL-23R stalk deletion variants and analyzed. Jak/STAT mediated IL-23 signaling was examined in IL-23-responsive Ba/F3-gp130 cell lines stably expressing variants of the IL-23R by analyzing IL-23-dependent cell proliferation and STAT3 activation. Additionally, potential IL-23R homodimerization was confirmed using coimmunoprecipitation.

The results demonstrate that the length of the IL-23R stalk region is essential for IL-23 signal transduction. At least 27 aa (hIL-23R) or 26 aa (mIL-23R) of the stalk region are mandatory to achieve full signaling activity.

Moreover, complete deletion of the human IL-23R stalk region or the extended murine IL-23R stalk region induced constitutive receptor activation which was verified in transiently transfected fibrosarcoma cells (U4C cells). Autonomous receptor activity was caused by IL-23R homodimerization independently of IL-12R β 1. In conclusion, biological active IL-23R homodimers form a novel receptor complex of the IL-12 cytokine family.

Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen/Codierungen von chemischen Molekülen und Aminosäuren richten sich nach den Nomenklaturen der IUPAC und IUBMB und werden im Folgenden nicht aufgeführt. SI-Einheiten und gebräuchliche Nicht-SI-Einheiten sind ebenfalls nicht gelistet.

Abb.	Abbildung	ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ad	bis zu einem Endvolumen von	et al.	<i>et aliae/ et alii</i>
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>	EZD	Extrazelluläre Domänen
AG	Arbeitsgruppe	FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
AKT	Proteinkinase B	FCS	Fötales Kälberserum
ALL	Akute lymphatische Leukämie	FNIII	Fibronektin Typ III
Amp (R)	Ampicillin (Resistenz)	G418	Geneticin
AP	Alkalische Phosphatase	GFP	<i>green fluorescent protein</i>
APC	antigenpräsentierende Zelle	GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
APS	Ammoniumpersulfat	gp 130	Glykoprotein 130
AS	Aminosäure(n)	GPL	<i>gp130-like receptor</i>
BCA	Bicinchoninsäure	h	human
BCL-2	<i>B-cell-lymphoma</i> -Protein 2	H₂O_{dd}	Zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaar(e)	HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin	HIL-23	Hyper-Interleukin-23
bzw.	beziehungsweise	HIL-6	Hyper-Interleukin-6
ca.	circa	HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>	hygro	Hygromycin B
CD	<i>cluster of differentiation</i>	IFN(-γ)	Interferon(-gamma)
cDNA	<i>complementary DNA</i>	Ig	Immunglobulin
D 1/2/3	Domäne 1/2/3	IHCA	Inflammatorisches hepatozelluläres Adenom
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	IL	Interleukin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	IL-12Rβ1	Interleukin-12-Rezeptor beta 1
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	IL-12Rβ2	Interleukin-12-Rezeptor beta 2
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	IL-15Rα	Interleukin-15-Rezeptor alpha
EBI3	<i>Epstein-Barr virus induced gene 3</i>	IL-23R	Interleukin-23-Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
EpoR	Erythropoetin-Rezeptor	IL-7R	Interleukin-7-Rezeptor

<i>in vivo</i>	am lebenden Objekt (beobachtet oder durchgeführt)	rpm	<i>rounds per minute</i>
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular</i>	RT	Raumtemperatur
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	s.o.	siehe oben
IZD	Intrazelluläre Domänen	s.u.	siehe unten
Jak	Januskinase	SDS	Natriumdodecylsulfat
k.A.	keine Angabe	SH2	<i>src-homology 2</i>
Kan	Kanamycin	SI	<i>Système international d'unités</i>
kb	Kilobase(n)	βc	<i>common beta chain</i> -Untereinheit der Rezeptorkomplexe von IL-3, IL-5 und GM-CSF
kDa	Kilodalton	STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
kond.	konditioniert	TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA</i>
LB	Luria-Bertani	TBS	<i>Tris buffered saline</i>
LIFR	<i>leukemia inhibitory factor receptor</i>	TBS-T	<i>Tris buffered saline with Tween® 20</i>
m	murin	TEMED	Tetramethylethylendiamin
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>	TGF-β	<i>transforming growth factor-β</i>
NHS	<i>N-Hydroxysuccinimid</i>	T_H-Zellen	T-Helferzellen
OSMR	<i>oncostatin M receptor</i>	THPOR	Thrombopoietin-Rezeptor
PAA	Polyacrylamid	TM	Transmembrandomäne
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion	Tyk	Tyrosinkinase
PDGFRβ	platelet-derived growth factor receptor beta	U	Units: Enzymeinheit oder Internationale Einheit
pEGFP	pEGFP-N1	UV	ultraviolett
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>	VEGFR2	<i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	well	Vertiefung einer 6/96- <i>well</i> -Zellkulturschale
POD	Peroxidase	WSX-1	Interleukin-27-Rezeptor alpha
pSTAT3	<i>phospho-STAT3</i>	WT	Wildtyp
puro	Puromycin	ZBD	zytokinbindende Domänen
PVDF	Polyvinylidenfluorid	Δ	Deletion
R	Rezeptor		
RNA	Ribonukleinsäure		
RNase	Ribonuklease		
RORγt	<i>retinoic acid receptor-related orphan receptor-gamma t</i>		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Interleukine - Zytokine des Immunsystems.....	1
1.2	Die heterodimeren Zytokine der IL-12-Familie - Aufbau und Funktion.....	2
1.3	Aufbau des Interleukin-23-Rezeptorkomplexes	5
1.4	Interleukin-23 vermittelte Signaltransduktion.....	9
1.5	Interleukin-23 - ein wichtiger Mediator des Immunsystems	11
1.6	Mutationen lösen eine ligandenunabhängige Aktivierung von Zytokinrezeptoren aus	14
1.7	Ziele dieser Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Material.....	18
2.1.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien & Kits.....	18
2.1.2	Puffer und Lösungen	20
2.1.3	Medien und Antibiotika.....	22
2.1.4	Enzyme	23
2.1.5	Geräte.....	23
2.1.6	Plasmide.....	24
2.1.7	Oligonukleotide	25
2.1.8	Bakterienstämme & Zelllinien.....	26
2.1.9	Antikörper.....	27
2.1.10	Zytokine.....	28
2.2	Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1	Transformation chemisch-kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	28
2.2.2	Präparation von Plasmid-DNA	29
2.2.3	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	30
2.2.4	Agarosegelelektrophorese	30
2.2.5	Restriktionsspaltung von DNA.....	30
2.2.6	Reinigung von DNA-Fragmenten	31
2.2.7	Dephosphorylierung der 5'Enden von DNA-Fragmenten.....	31
2.2.8	Klenow-Behandlung des pMOWS-Vektors	32
2.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	32
2.2.10	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	33
2.2.11	DNA-Sequenzierung	34
2.3	Zellbiologische Methoden	34
2.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	34
2.3.2	Aussaat und Transfektion eukaryotischer Zellen	35
2.3.3	Retrovirale Transduktion von Ba/F3-Zellen.....	36

2.3.4	Durchflusszytometrie.....	36
2.3.5	Proliferationsassay.....	37
2.3.6	Stimulationsassay.....	37
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	38
2.4.1	Herstellung von Zelllysaten.....	38
2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	39
2.4.3	Western Blot.....	39
2.4.4	Co-Immunopräzipitation (Nanotrap).....	40
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Analyse der IL-23R- <i>stalk</i> -Region.....	43
3.2	Deletionen der <i>stalk</i> -Region des murinen und humanen IL-23R induzieren eine ligandenunabhängige Rezeptoraktivierung.....	44
3.2.1	Generierung von Deletionsvarianten des humanen IL-23R.....	44
3.2.2	Humane IL-23-Rezeptoren ohne <i>stalk</i> -Region zeigen eine ligandenunabhängige Aktivierung.....	50
3.2.3	Die ligandenunabhängige Aktivierung benötigt nicht den hIL-12R β 1.....	57
3.2.4	Generierung von Deletionsvarianten des murinen IL-23R.....	60
3.2.5	Die Deletion der „erweiterten“ <i>stalk</i> -Region des murinen IL-23R führt zu ligandenunabhängiger Rezeptoraktivierung.....	65
3.2.6	Der mIL-12R β 1 wird für die ligandenunabhängige Aktivierung nicht benötigt.....	69
3.2.7	Bestätigung der ligandenunabhängigen Aktivierung des mIL-23R in transient transfizierten Fibrosarkomzellen.....	72
3.3	Ligandenunabhängige Aktivierung des IL-23R beruht auf der Homodimerisierung des Rezeptors.....	73
3.3.1	Klonierung von murinen IL-23R-Varianten mit GFP- und FLAG- <i>tag</i>	73
3.3.2	Der Wildtyp mIL-23R und die <i>stalk</i> -Deletionsvariante bilden Homodimere.....	77
4	Diskussion.....	79
4.1	Die Länge der <i>stalk</i> -Region ist entscheidend für die IL-23-Signaltransduktion.....	79
4.2	Das Entfernen der <i>stalk</i> -Region (hIL-23R) bzw. der „erweiterten“ <i>stalk</i> -Region (mIL-23R) führt zu einer ligandenunabhängigen Rezeptoraktivierung.....	84
4.3	Eine konstitutive Rezeptoraktivierung kann durch die künstliche Dimerisierung von Rezeptoren hervorgerufen werden.....	88
4.4	IL-23R-Homodimere induzieren eine (ligandenunabhängige) IL-23-Signaltransduktion.....	92
4.5	Konstitutiv aktive Rezeptoren als Krankheitsursachen, Hilfsmittel und Therapeutika.....	95
4.6	Schlussfolgerungen.....	98
5	Literatur und Quellenangabe.....	99
6	Anhang.....	111

1 Einleitung

1.1 Interleukine - Zytokine des Immunsystems

Vielzellige Organismen sind auf eine wirksame zelluläre Kommunikation angewiesen. Dabei spielen neben Zelldirektverbindungen (Gap Junctions) und Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakten, die über Adhäsionsmoleküle vermittelt werden, insbesondere extrazelluläre Signalmoleküle eine wesentliche Rolle für die Kommunikation zwischen Zellen (Rassow *et al.*, 2012). Ein Hauptvertreter dieser Moleküle ist die Gruppe der Zytokine, die unter anderem die Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose von Zielzellen steuern (Tato & Cua, 2008a, Tato & Cua, 2008b, Tato & Cua, 2008c, Tato & Cua, 2008d). Damit unterscheiden sich Zytokine von den klassischen Hormonen, die vor allem Stoffwechselfvorgänge sowie metabolische und physiologische Anpassungsmechanismen des Körpers an wechselnde Umweltbedingungen beeinflussen (Rassow *et al.*, 2012). Zytokine werden von einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen ausgeschüttet und erreichen die Zielzelle vorwiegend über die autokrine oder parakrine Signalweiterleitung (Garbers *et al.*, 2012). Auf diese Weise wirkt eine sezernierende Zelle auf sich selbst und nächstgelegene Zellen der gleichen Art (autokrine Signalweiterleitung) oder auf benachbarte andersartige Zellen (parakrine Signalweiterleitung) (Rassow *et al.*, 2012). Die Vielzahl bekannter Zytokine, die mitunter große molekulare und funktionelle Unterschiede aufweisen, werden anhand ihrer biologischen Funktionen in Interferone, Chemokine, Wachstumsfaktoren und Interleukine eingeteilt (Heinrich *et al.*, 2014). Die große Familie der Interleukine (IL) besteht aus verschiedenen Unterfamilien, deren Unterteilung über Sequenzhomologien, gleichartige sowie gemeinsame Rezeptorbestandteile oder funktionelle Merkmale erfolgt (Akdis *et al.*, 2011). Eine dieser Unterfamilien ist die IL-12-Zytokinfamilie (s.u.).

Interleukine beeinflussen die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen. Zudem gehören sie neben Interferonen, Chemokinen, und Tumornekrosefaktoren zu den Zytokinen des Immunsystems (Rassow *et al.*, 2012). Als Reaktion auf spezifische Stimuli werden Interleukine von immunologischen Zellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen sowie B- und T-Zellen sezerniert und koordinieren daraufhin die physiologische Immunantwort. Eine überschießende beziehungsweise fehlgeleitete Immunantwort kann zu chronischen Entzündungen, Autoimmunerkrankungen und Krebs führen (Akdis *et al.*, 2011,

Floss *et al.*, 2015). Hierzu wurden in den letzten Jahren einige therapeutische Konzepte für diverse Krankheitsbilder auf Grundlage der Zytokinforschung entwickelt (Floss *et al.*, 2015, Tsai & Tsai, 2017, Neurath, 2019, Tait Wojno *et al.*, 2019).

Eine Voraussetzung für die Signalübertragung von Zytokinen ist die Expression spezifischer Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Floss & Scheller, 2019). Diese werden nach strukturellen Gemeinsamkeiten in sieben Hauptfamilien eingeteilt, zu denen Rezeptortyrosinkinasen, Klasse-I- und Klasse-II-Zytokinrezeptoren, Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptoren, IL-1-/Toll-like-Rezeptoren, IL-17-Rezeptoren, *transforming growth factor* (TGF)- β -Rezeptoren und G-Protein-gekoppelte (Chemokin)-Rezeptoren gehören. Dabei werden je nach Rezeptortyp verschiedene intrazelluläre Signalwege initiiert. Interleukine vermitteln ihre Wirkung größtenteils über Klasse-I-Rezeptoren (Hämatopoetin-Rezeptoren). Diese sind mit spezifischen Rezeptorkinasen assoziiert, die nach Zytokinstimulation unter anderem den Jak/STAT-Signalweg auslösen (Floss & Scheller, 2019).

1.2 Die heterodimeren Zytokine der IL-12-Familie - Aufbau und Funktion

IL-23 gehört zur IL-12-Zytokinfamilie (siehe Abb. 1), die eine zentrale Rolle bei der physiologischen Immunantwort einnimmt und an zahlreichen pathologischen Immunreaktionen beteiligt ist (Hasegawa *et al.*, 2016). Aufgrund von Gemeinsamkeiten beim Aufbau der Zytokine und der Rezeptorkomplexe werden die IL-12- und IL-6-Zytokinfamilien zur IL-6/IL-12-Superfamilie zusammengefasst (Rose-John *et al.*, 2015). Aktuell besteht die IL-12-Zytokinfamilie aus fünf Mitgliedern, IL-12, IL-23, IL-27, IL-35 und IL-39, allerdings wird von der Existenz weiterer Mitglieder ausgegangen (Hasegawa *et al.*, 2016, Floss *et al.*, 2017, Detry *et al.*, 2019). Das natürliche Vorkommen eines synthetisch hergestellten Zytokins IL-Y wurde bisher noch nicht gezeigt (Wang *et al.*, 2012, Flores *et al.*, 2015). Außerdem wurde IL-39 nach aktuellem Wissensstand ausschließlich in Mäusen und nicht im Menschen nachgewiesen (Bridgewood *et al.*, 2019).

Zytokine der IL-12-Familie sind charakteristischerweise Heterodimere, bestehend aus zwei löslichen Untereinheiten, die innerhalb der Familie geteilt werden (Hasegawa *et al.*, 2016). So entstehen aus den α -Untereinheiten (p19, p28 und p35) und β -Untereinheiten (p40 und EBI3) die Zytokine IL-12 (p35/p40) (Kobayashi *et al.*, 1989, Wolf *et al.*, 1991), IL-23 (p19/p40) (Oppmann *et al.*, 2000), IL-27 (p28/EBI3) (Pflanz *et al.*, 2002), IL-35 (p35/EBI3) (Collison *et*

al., 2007, Niedbala *et al.*, 2007), IL-39 (p19/EBI3) (Wang *et al.*, 2016) und theoretisch IL-Y (p28/p40) (Wang *et al.*, 2012, Flores *et al.*, 2015) (siehe Abb. 1).

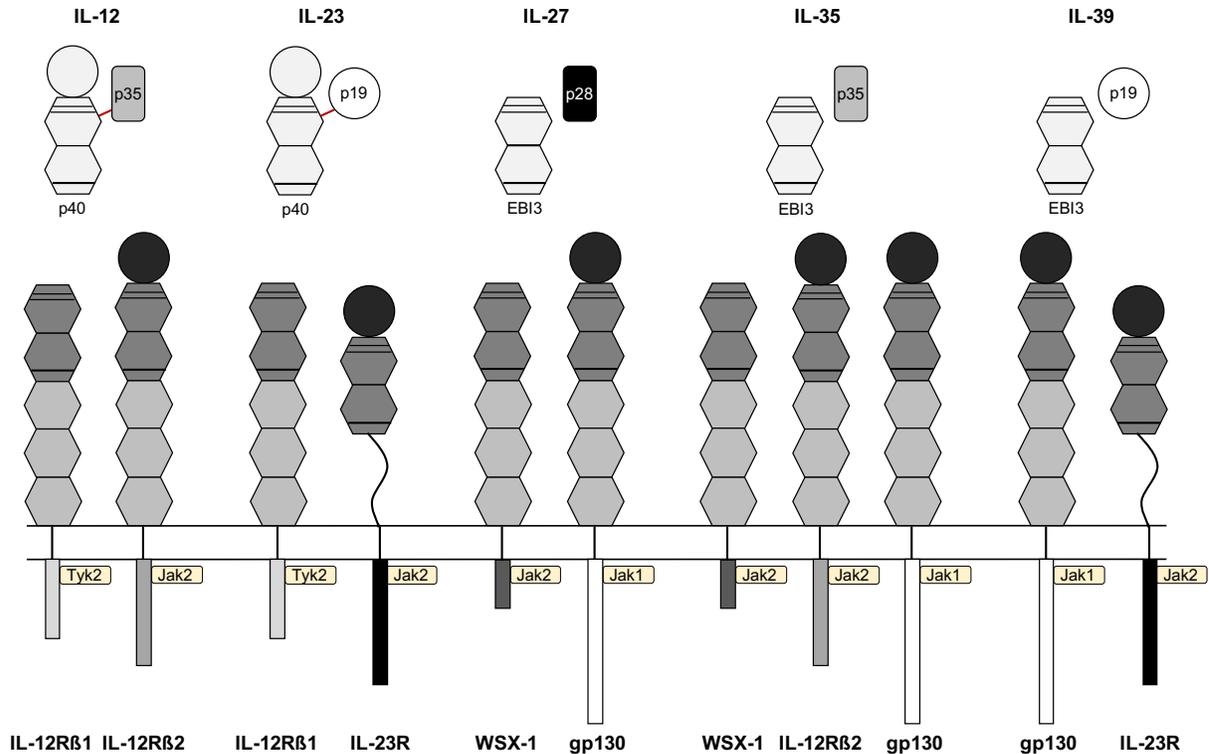


Abb. 1: Gegenüberstellung der Zytokine der IL-12 Familie. Die IL-12-Zytokine und die zugehörigen Rezeptoruntereinheiten zeichnen sich durch einen heterodimeren Aufbau aus geteilten Untereinheiten aus. IL-12 (p35/p40) bindet an einen Rezeptorkomplex aus IL-12Rβ1 und IL-12Rβ2, IL-23 (p19/p40) wirkt über IL-12Rβ1/IL-23R, IL-27 (p28/EBI3) vermittelt seine Signale über WSX-1/gp130 und IL-39 (p19/EBI3) interagiert mit gp130/IL-23R. Für IL-35 (p35/EBI3) sind mehrere signalgebende Rezeptorkombinationen aus IL-12Rβ2/gp130, IL-12Rβ2/IL-12Rβ2, gp130/gp130 oder IL-12Rβ2/WSX-1 möglich. Die Untereinheiten von IL-12 und IL-23 sind über Disulfidbrücken (rote Balken) verbunden. Die Rezeptoren und β-Untereinheiten der Zytokine enthalten konservierte Cysteine (dünne Linien) sowie das WSXWS-Motiv (dicke Linien). Die intrazellulären Rezeptordomänen sind mit Januskinasen (Jak1, Jak2, Tyk2) assoziiert, die die Phosphorylierung und Aktivierung bestimmter STAT-Moleküle bewirken. Die Abbildung wurde modifiziert nach Jones & Vignali (2011), Vignali & Kuchroo (2012) und Floss *et al.* (2017).

Im Gegensatz zu IL-27 und IL-35 bilden die Untereinheiten von IL-12 und IL-23 Disulfidbrücken aus (siehe Abb. 1) (Vignali & Kuchroo, 2012).

Die α-Untereinheiten teilen die einzigartige *up-up-down-down* Vier-Helix-Bündel Struktur, die auch die Zytokine der verwandten IL-6-Familie aufweisen. Aufgrund dieser

Struktur werden beide Familien den Typ-I-Zytokinen zugeordnet. Die β -Untereinheiten der IL-12-Familie (p40 und EBI3) sind homolog zu den Extrazellulardomänen der membrangebundenen α -Rezeptoren der IL-6-Familie aufgebaut. Sie weisen konservierte Cysteine sowie das charakteristische WSXWS-Motiv auf, das an der Rezeptorfaltung und der Rezeptoraktivierung beteiligt ist (siehe Abb. 1) (Bazan, 1990, Jones & Vignali, 2011, Dagil *et al.*, 2012).

Analog zum Aufbau der Zytokine besitzen auch die Rezeptoren der IL-12-Familie Rezeptoruntereinheiten, die innerhalb der Familie geteilt werden und Homo- oder Heterodimere bilden (siehe Abb. 1). Der Rezeptorkomplex von IL-12 besteht aus IL-12R β 1 und IL-12R β 2 (Presky *et al.*, 1996), der zu IL-23 gehörige aus IL-12R β 1 und IL-23R (Parham *et al.*, 2002). Die Signaltransduktion von IL-27 erfolgt über gp130 und WSX-1 (Pflanz *et al.*, 2004). IL-35 leitet seine Signale über vier unterschiedliche Rezeptorkombinationen (IL-12R β 2/gp130, IL-12R β 2/IL-12R β 2, gp130/gp130 und IL-12R β 2/WSX-1) weiter (Garbers *et al.*, 2012, Floss *et al.*, 2017). Das Heterodimer aus IL-23R/gp130 vermittelt die Signalgebung von IL-39 (Wang *et al.*, 2016). Zusätzlich wurden zwei synthetisch hergestellte Rezeptorkomplexe mit biologischer Aktivität innerhalb der Rezeptoren der IL-12-Familie identifiziert (gp130/IL-12R β 1 und IL-23R/IL-12R β 2). Gleichzeitig wird vermutet, dass zwei weitere potentielle Kombinationen aus WSX-1/IL-12R β 1 und WSX-1/IL-23R ebenfalls biologisch aktiv sind. Jedoch wurde diese Aktivität noch nicht bestätigt (Floss *et al.*, 2017). IL-Y wirkt möglicherweise über Rezeptorkomplexe, die aus IL-12R β 1/gp130 und WSX-1/IL-12R β 1 bestehen (Hasegawa *et al.*, 2016, Floss *et al.*, 2017). Die Verwendung der signaltransduzierenden Komponente des IL-6-Rezeptorkomplexes gp130 verdeutlicht die nahe Verwandtschaft der IL-12- und IL-6-Familien (Garbers *et al.*, 2012).

Trotz der Gemeinsamkeiten im Aufbau der Zytokin- und Rezeptorstrukturen weisen die Zytokine der IL-12-Familie deutliche Unterschiede hinsichtlich der biologischen Effekte und der Expression auf (Vignali & Kuchroo, 2012).

Während IL-12, IL-23 und IL-27 von aktivierten antigenpräsentierenden Zellen (APCs), wie dendritischen Zellen und Makrophagen ausgeschüttet werden, erfolgt die Expression von IL-35 durch regulatorische T-Zellen (T_{reg}) (Jones & Vignali, 2011). IL-39 wird von aktivierten B-Zellen exprimiert (Wang *et al.*, 2016).

IL-12 und IL-23 haben überwiegend proinflammatorische Eigenschaften. Sie tragen maßgeblich zur Entwicklung von T-Helferzellen, genauer den Untergruppen T_H1 (IL-12) und T_H17 (IL-23)

bei (Vignali & Kuchroo, 2012). Als Interferon- γ -produzierende Zellen lösen T_H1-Zellen Immunreaktionen zur Bekämpfung von Pathogenen und malignen Tumoren aus. T_H17-Zellen sind an der Entwicklung von chronisch entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen beteiligt (Hasegawa *et al.*, 2016). Auch dem Zytokin IL-39 werden überwiegend proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. IL-39 wirkt entzündungsförderlich in Mäusen mit Lupus erythematoses-artigem Syndrom (Hasegawa *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2016). IL-27 als immunregulatorisches Zytokin weist pro- und antiinflammatorische Eigenschaften auf (Wojno & Hunter, 2012, Hasegawa *et al.*, 2016). Beispielsweise hemmt und stimuliert IL-27 die Proliferation, Differenzierung, Zytokinproduktion und Zellfunktionen von T-Zellen. Zusätzlich bremst es die Differenzierung und Funktion von T_H17-Zellen (Hasegawa *et al.*, 2016). Das von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) ausgeschüttete IL-35 steuert die Konversion von konventionellen T-Zellen in regulatorische T-Zellen und verfügt über weitgehend antiinflammatorische Effekte (Collison & Vignali, 2008, Vignali & Kuchroo, 2012, Hasegawa *et al.*, 2016). Ein weiteres antiinflammatorisches Zytokin wäre IL-Y, das die Differenzierung von T_H1- und T_H17-Zellen hemmt (Wang *et al.*, 2012, Flores *et al.*, 2015, Hasegawa *et al.*, 2016).

1.3 Aufbau des Interleukin-23-Rezeptorkomplexes

Der IL-23-Rezeptorkomplex besteht aus IL-12R β 1 und IL-23R

Alle Rezeptoren der IL-12 Familie verbindet die strukturelle Ähnlichkeit zur IL-6R-Untereinheit gp130. Diese besteht aus einer N-terminalen Ig-Domäne, 5 FNIII-Domänen, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne mit fünf Tyrosinresten. Die zwei N-terminalen FNIII-Domänen bilden eine hoch konservierte Region, die für die Bindung der Zytokine verantwortlich ist (zytokinbindende Domänen), während die restlichen drei FNIII-Domänen an der Signaltransduktion beteiligt sind (siehe Abb. 1) (Grotzinger *et al.*, 1999, Jones & Vignali, 2011).

Der Rezeptor für IL-23 besteht aus den Untereinheiten IL-12R β 1 und IL-23R (siehe Abb. 2) (Parham *et al.*, 2002).

Der IL-12R β 1 enthält ebenfalls fünf extrazelluläre FNIII-Domänen und gleichartig aufgebaute zytokinbindende Domänen, besitzt allerdings keine N-terminale Ig-Domäne (siehe Abb. 2) (Jones & Vignali, 2011). Gegenüber gp130 verfügt der murine Rezeptor (mIL-12R β 1)

lediglich über einen intrazellulären Tyrosinrest (Y635), der allerdings keinen Beitrag zur Bindung und Aktivierung von STAT-Proteinen leistet. Der humane IL-12R β 1 (hIL-12R β 1) weist keine zytosolischen Tyrosinreste auf (Chua *et al.*, 1995, Floss *et al.*, 2016).

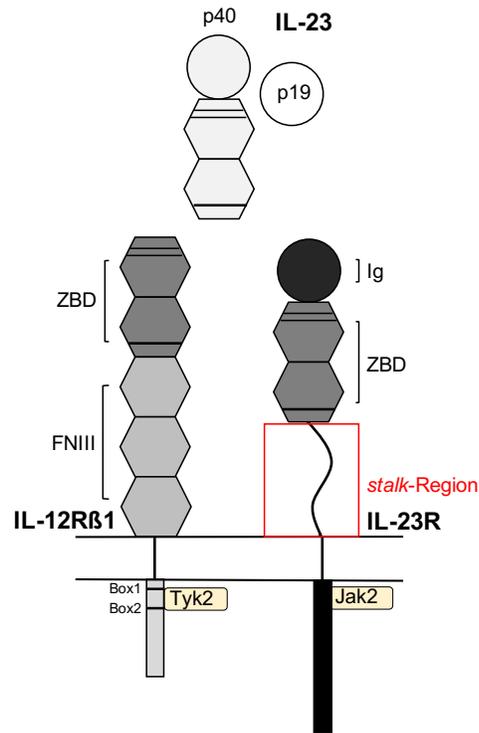


Abb. 2: Schematische Darstellung des IL-23-Rezeptorkomplexes. Die Untereinheiten p19 und p40 bilden das Zytokin IL-23, dessen Signaltransduktion über die Rezeptoruntereinheiten IL-12R β 1 und IL-23R erfolgt. Der extrazelluläre Abschnitt des IL-12R β 1 besitzt fünf FNIII-Domänen, von denen Domäne D1 und D2 die zytokinbindenden Domänen (ZBD) darstellen, der intrazelluläre Teil des Rezeptors weist Box1- und Box2-Motive auf und ist mit der Januskinase Tyk2 assoziiert. Der extrazelluläre IL-23R besteht aus einer N-terminalen Ig-Domäne, den zytokinbindenden FNIII-Domänen D2 und D3 (ZBD) und der *stalk*-Region. Weiterhin ist der IL-23R mit der Januskinase Jak2 assoziiert. Beide Rezeptoren sowie die IL-23-Untereinheit p40 enthalten konservierte Cysteine (dünne Linien) und das WSXWS/WQPWS-Motiv (dicke Linien). Die Abbildung wurde modifiziert nach Jones & Vignali (2011), Vignali & Kuchroo (2012) und Hummel *et al.* (2017).

Vielmehr befinden sich konservierte Box1- und Box2-Motive innerhalb der intrazellulären Rezeptordomäne des IL-12R β 1 (siehe Abb. 2). Diese Bereiche sind entscheidend für die Bindung und Wirksamkeit von Januskinasen (Murakami *et al.*, 1991, Ihle & Kerr, 1995, Floss *et al.*, 2016). Über das Box1-Motiv assoziiert die entsprechende Januskinase mit dem Rezeptor (Tanner *et al.*, 1995). Gebildet wird es aus einer Prolin-reichen Aminosäuresequenz in der Nähe

der Transmembrandomäne. Die entsprechende Konsensussequenz enthält die Aminosäuren (AS) $\phi\phi\text{PX(I/V)PXP(E/K)}$ (hydrophobe AS sind mit ϕ gekennzeichnet) (Usacheva *et al.*, 2002). Weiter C-terminal befindet sich das Box2-Motiv mit der Konsensussequenz $\phi\text{E}\phi\phi$, wobei am häufigsten die Aminosäuresequenz (V/L)E(V/L)L gefunden wurde (Usacheva *et al.*, 2002). Eine vollständige Aktivierung der Januskinasen wird erst mithilfe des Box2-Motives ermöglicht (Fukunaga *et al.*, 1991, Colosi *et al.*, 1993, Usacheva *et al.*, 2002).

Der IL-23R setzt sich aus einem extrazellulären Bereich bestehend aus einer N-terminalen Ig-Domäne D1, den zytokinbindenden FNIII-Domänen D2 und D3 und einer 37 (hIL-23R) bzw. 36 (mIL-23R) AS langen unstrukturierten *stalk*-Region zusammen (siehe Abb. 2). Die Transmembrandomäne und die intrazelluläre Domäne schließen sich an (Parham *et al.*, 2002, Schroder *et al.*, 2015). Zusätzlich weist der mIL-23R eine 20 AS umfassende Duplikation (WQPWS-Duplikation) der Domäne D3 auf, von der unklar ist, ob sie der Domäne D3 oder der *stalk*-Region zuzuschreiben ist (Parham *et al.*, 2002, Hummel *et al.*, 2017).

Die intrazelluläre Domäne beinhaltet sieben Tyrosinreste (Parham *et al.*, 2002). Für den murinen und humanen Rezeptor standen jeweils drei der Tyrosinreste im Verdacht, an der IL-23-Signaltransduktion beteiligt zu sein. Bei diesen handelte es sich um die AS Y416, Y504 und Y626 (mIL-23R) oder Y397, Y484 und Y611 (hIL-23R) (Parham *et al.*, 2002, Case *et al.*, 1994, Heinrich *et al.*, 1998, Wiederkehr-Adam *et al.*, 2003, Naeger *et al.*, 1999, Yao *et al.*, 1999). Die Bindung und Aktivierung von STAT3, als wesentlichen Vermittler der IL-23-Signaltransduktion über die Tyrosinreste Y504, Y626 (mIL-23R) und Y484, Y611 (hIL-23R) sowie die ungewöhnliche Sequenz Y542PNFQ (mIL-23R) wurden belegt. STAT3 wurde außerdem Tyrosin-unabhängig über ein spezifisches 17 AS umfassendes Motiv zwischen den AS 554 und 570 aktiviert (mIL-23R). Jak/STAT-unabhängige Signalwege (PI3K/AKT und MAPK/ERK) wurden über die AS Y416 (mIL-23R) und Y397 (hIL-23R) vermittelt (Floss *et al.*, 2013). Zwar weist der IL-23R im Gegensatz zu IL-12R β 1 keine Box1- und Box2-Motive auf, allerdings fungierte der Bereich von E455 bis E479 (mIL-23R) als Bindestelle für Jak2. Zudem war der Abschnitt von N396 bis T503 bedeutsam für die Aktivierung der Januskinase (Floss *et al.*, 2016).

Der IL-23R enthält eine unvollständig charakterisierte stalk-Region

Gegenüber Rezeptoren vom gp130-Typ fehlen dem IL-23R die 3 FNIII-Domänen, die die zytokinbindenden Domänen mit der Transmembrandomäne verbinden und wichtig für die

Signaltransduktion nach Zytokinbindung sind. Stattdessen befindet sich dort eine vermutlich unstrukturierte Region, die als *stalk*-Region bezeichnet wird (siehe Abb. 2) (Jones & Vignali, 2011, Schroder *et al.*, 2015). Eine *stalk*-Region mit ähnlicher Länge (52 AS) weist auch der humane IL-6R (hIL-6R) auf (Baran *et al.*, 2013). Bisher ist die Funktion der *stalk*-Region unvollständig geklärt. Die Aminosäuresequenzen des mIL-23R (644 AS) und hIL-23R (629 AS) zeigen deutlich weniger Übereinstimmungen im Bereich der *stalk*-Region (37,8%) als im gesamten Rezeptor (66%). Ein ähnliches Bild zeichnet sich bei Vergleich des mIL-6R mit dem hIL-6R ab. Hier beträgt die Homologie der AS im Bereich der *stalk*-Regionen 34,5% und im gesamten Rezeptor 53,4%. Aufgrund der geringeren Homologie ist eine Mitwirkung der *stalk*-Region bei der Zytokinbindung unwahrscheinlich (Hummel *et al.*, 2017).

Jedoch wurde ein Beitrag der *stalk*-Region beim *ectodomain shedding* nachgewiesen. Unter *ectodomain shedding* wird die Abspaltung der extrazellulären Domäne durch Proteasen (Sheddasen) verstanden, wodurch sich die Zelloberflächenexpression der Rezeptoren reduziert und lösliche Rezeptoren mit unterschiedlichen und teilweise antagonistischen Eigenschaften entstehen. Die Proteasen zählen zu den *a disintegrin and metalloproteases* (ADAMs), von denen ADAM10 und ADAM17 beim *ectodomain shedding* des IL-23R beteiligt sind. Die Bereiche von AS 333 bis 342 (mIL-23R) sowie AS 323 bis 333 (hIL-23R) innerhalb der *stalk*-Region wurden als Schnittstellen von ADAM17 charakterisiert (Franke *et al.*, 2016). Eine Beteiligung der IL-6R-*stalk*-Region beim *ectodomain shedding* durch ADAMs wurde ebenfalls nachgewiesen (Garbers *et al.*, 2011, Baran *et al.*, 2013).

Weiterhin wurde gezeigt, dass der Erhalt von mindestens 22 AS der IL-6R-*stalk*-Region für die IL-6-Signaltransduktion erforderlich ist (Baran *et al.*, 2013). IL-6 vermittelt seine Signale über gp130 und IL-6R, die zusammen mit IL-6 ein Hexamer (2xIL-6, 2xIL-6R, 2xgp130) bilden (Skinotis *et al.*, 2005). Eine ausreichend lange *stalk*-Region brachte die Domänen D1-D3 des IL-6R in die richtige Position für eine Komplexbildung von IL-6 mit dem IL-6R und schließlich mit den zytokinbindenden Domänen beider gp130-Rezeptoren (Baran *et al.*, 2013). Ähnliche Ergebnisse wurden im Rahmen der Masterarbeit von Gregor Ciupka und der Dissertation von T. Ackfeld hinsichtlich des IL-23R erzielt: Für eine IL-23-Signalweiterleitung waren für den mIL-23R und hIL-23R jeweils *stalk*-Regionen mit einer minimalen Länge von 6 AS erforderlich (Ciupka, 2014, Ackfeld, 2020, Hummel *et al.*, 2017). Der *stalk*-Region wurde daher die Rolle eines Distanzhalters zugesprochen, der die Bildung des Zytokin-Rezeptorkomplexes durch Ausrichtung der extrazellulären Domänen in einem bestimmten Abstand zur Plasmamembran

und somit die Signaltransduktion ermöglicht (Baran *et al.*, 2013, Ciupka, 2014, Ackfeld, 2020). Schließlich wiesen spezifische Deletionsvarianten ohne *stalk*-Regionen des murinen und humanen IL-23R eine ligandenunabhängige Rezeptoraktivierung auf (Ciupka, 2014, Ackfeld, 2020, Hummel *et al.*, 2017).

1.4 Interleukin-23 vermittelte Signaltransduktion

IL-23 leitet seine Signale über einen Rezeptorkomplex bestehend aus IL-23R und IL-12R β 1 weiter (Parham *et al.*, 2002). Beide Rezeptoren weisen keine eigene Tyrosinkinaseaktivität auf (Floss & Scheller, 2019). Stattdessen befinden sie sich in einer Assoziation mit Tyrosinkinasen der Familie der Januskinasen. Der IL-12R β 1 ist mit der Januskinase Tyk2 (Bacon *et al.*, 1995, Zou *et al.*, 1997), der IL-23R mit der Januskinase Jak2 assoziiert (siehe Abb. 3) (Parham *et al.*, 2002).

Die Bindung von IL-23 an den entsprechenden Rezeptorkomplex bewirkt eine Heterodimersierung der Rezeptoruntereinheiten (IL-23R und IL-12R β 1) (Parham *et al.*, 2002). So gelangen die jeweiligen intrazellulären Rezeptordomänen in räumliche Nähe, wodurch sich die assoziierten Januskinasen gegenseitig aktivieren (Transphosphorylierung). Daraufhin phosphorylieren die aktivierten Januskinasen Tyrosinreste im intrazellulären Teil der Rezeptoren. An diese Phosphotyrosinreste binden die *signal transducers and activators of transcription* (STAT)-Proteine über ihre SH2-Domäne. Die Januskinasen phosphorylieren die STAT-Proteine, die sich infolgedessen von den Rezeptoren lösen, Dimere bilden und in den Zellkern diffundieren. Dort koordinieren sie als Transkriptionsfaktor die Expression spezifischer Gene (siehe Abb. 3) (Becerra-Diaz *et al.*, 2011). Ein alternativer Weg der Signaltransduktion, der ohne intrazelluläre Tyrosinreste („non kanonisch“) zur Aktivierung von STAT-Molekülen führt, wurde ebenfalls für den mIL-23R beschrieben. Für die Aktivierung war der intrazelluläre Rezeptorbereich zwischen den AS 554 und 570 entscheidend (Floss *et al.*, 2013).

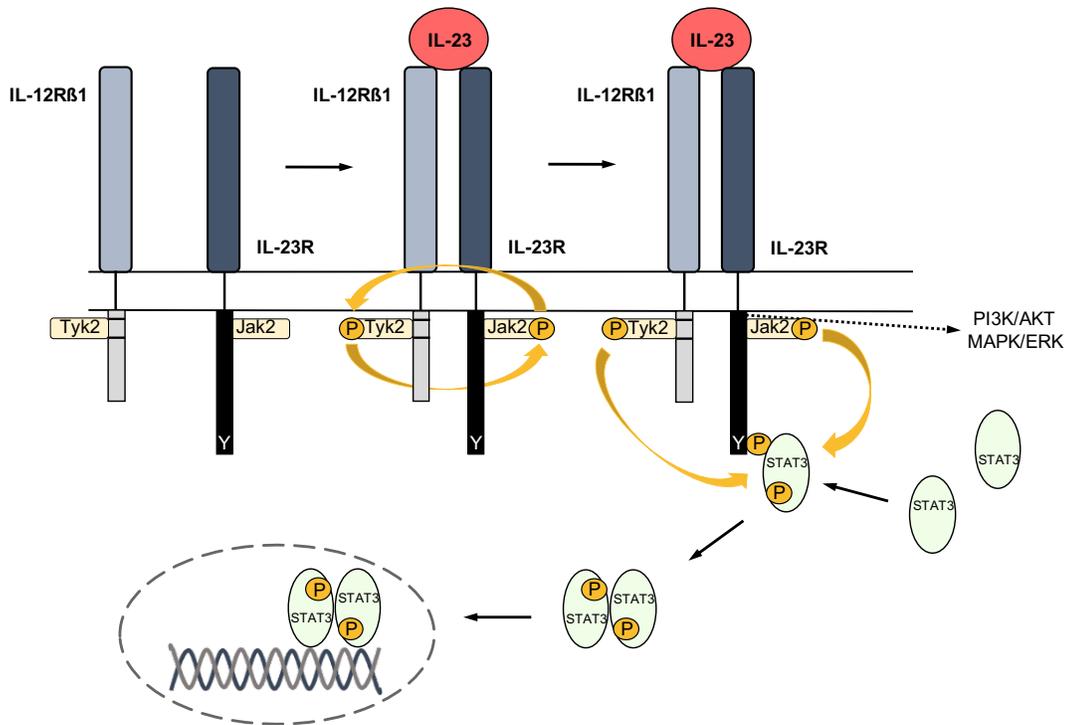


Abb. 3: Prinzip des durch IL-23 induzierten Jak/STAT-Signalwegs. Die Bindung von IL-23 an den spezifischen Rezeptorkomplex führt über eine Heterodimerisierung der Untereinheiten IL-12RB1 und IL-23R zur Transphosphorylierung und Aktivierung der assoziierten Januskinasen (Jak2, Tyk2). Diese phosphorylieren intrazelluläre Rezeptortyrosinreste (Y), die eine Bindestelle für STAT-Moleküle, mit STAT3 als Hauptvertreter, bilden. Gebundene STAT3-Proteine werden ebenfalls phosphoryliert (P) und aktiviert, woraufhin sie sich vom Rezeptor lösen, dimerisieren und als Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen im Zellkern induzieren. Zusätzlich werden nach Stimulation durch IL-23 die Signalwege PI3K/AKT und MAPK/ERK über intrazelluläre Tyrosinreste des IL-23R vermittelt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Di Cesare *et al.* (2009) und Floss *et al.* (2013).

Der sogenannte Jak/STAT-Weg (s.o.) ist der Hauptsignalweg für eine Vielzahl von Zytokinen und kann die Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose der Zielzellen zu Folge haben (Rawlings *et al.*, 2004). Alle Zytokine der IL-12-Familie aktivieren den Jak/STAT-Signalweg. Nach Stimulation durch IL-12 oder IL-23 werden hauptsächlich STAT4 (IL-12) bzw. STAT3 (IL-23), in geringerem Maß auch weitere STATs (STAT1, STAT3, STAT4 und STAT5), phosphoryliert. Die Signaltransduktion von IL-27 wird weitgehend über STAT1 und STAT3 vermittelt (Collison & Vignali, 2008). IL-35 leitet Signale vorwiegend über STAT1 und STAT4, teilweise auch über STAT3 weiter (Collison *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2014). IL-39 führt zur Aktivierung von STAT1 und STAT3 (Wang *et al.*, 2016), IL-Y zur

Phosphorylierung von STAT3 (Flores *et al.*, 2015). STAT3 spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von T_H17 Zellen, indem es unter anderem die Expression des zellinienspezifischen Transkriptionsfaktor *retinoic acid receptor-related orphan receptor-γt* (RORγt) steuert (Yang *et al.*, 2007). Weiterhin beeinflusst STAT3 die T-Zell-vermittelte Homöostase, proinflammatorische Prozesse und die Entstehung von Autoimmunerkrankungen (Durant *et al.*, 2010).

Auffällig ist eine langsamer einsetzende und länger anhaltende Aktivierung von STAT3, die IL-23 verglichen mit IL-6 bei entsprechenden Zielzellen auslöst. Diese Eigenschaft ist vermutlich auf den fehlenden Einfluss inhibierender *suppressor of cytokine signaling* (SOCS)-Proteine zurückzuführen (Floss *et al.*, 2013, Engelowski *et al.*, 2018).

Durch die Stimulation von IL-23 werden neben dem Jak/STAT-Weg auch weitere Signalwege in Gang gesetzt, die über *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase* (MAPK/ERK), *phosphatidylinositol 3-kinase*/Proteinkinase B (PI3K/AKT) oder *nuclear factor of 'κ-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFκB) vermittelt werden (Cho *et al.*, 2006, Floss *et al.*, 2013). Die Untersuchungen im Verlaufe dieser Arbeit beschränken sich jedoch ausschließlich auf den Nachweis einer STAT3-Aktivierung.

Zwischenzeitlich wurde der IL-12Rβ1 als ein Rezeptor, der nur an der Zytokinbindung und nicht an der Signalweiterleitung beteiligt ist, betrachtet (Wu *et al.*, 2000, Collison & Vignali, 2008). Jedoch wurde eine physiologische Zellmigration von Makrophagen, die durch chemotaktisch wirksames p40 induziert wurde, IL-23R-unabhängig über den IL-12Rβ1 vermittelt (Ha *et al.*, 1999, Russell *et al.*, 2003). Zudem wurde in den letzten Jahren ein entscheidender Beitrag des IL-12Rβ1 zur Aktivierung der Januskinase Tyk2 nachgewiesen (Floss *et al.*, 2016). Allerdings wurde auch gezeigt, dass die Assoziation von Tyk2 mit dem Rezeptor IL-12Rβ1 weniger bedeutsam als die von Jak2 mit IL-23R für die Signaltransduktion ist (Floss *et al.*, 2016).

1.5 Interleukin-23 - ein wichtiger Mediator des Immunsystems

IL-23 fördert die Entwicklung von T_H17-Zellen, die sich durch die Expression eines spezifischen Typs proinflammatorischer Zytokine inklusive IL-17 auszeichnen (siehe Abb. 4) (Gaffen *et al.*, 2014). Dieser IL-23-IL-17-Signalweg mit Beteiligung von T_H17-Zellen wirkt einerseits schützend, in dem er eine regelrechte Immunantwort gegen verschiedene Pathogene

auslöst (Khader & Gopal, 2010) sowie zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Barrierschutzes epithelialer und mukosaler Oberflächen beiträgt (Marks & Craft, 2009). Andererseits werden T_{H17} -Zellen mit chronisch entzündlichen Vorgängen, Autoimmunerkrankungen und Krebs assoziiert (Wu *et al.*, 2009, Grivennikov *et al.*, 2012, Croxford *et al.*, 2012).

Gleichfalls stimuliert IL-23 verschiedene Zellen des angeborenen Immunsystems. Dazu gehören spezifische T-Zell-Subpopulationen ($\gamma\delta$ -T-Zellen), natürliche Killer-T-Zellen (NKT) und *innate lymphoid cells* (ILCs), die sich analog zu den T_{H17} -Zellen durch die Expression des Transkriptionsfaktor ROR γ t auszeichnen und mittels proinflammatorischer Zytokine vom T_{H17} -Typ eine lokal begrenzte Entzündungsreaktion auslösen (Gaffen *et al.*, 2014).

Zu Beginn einer Immunantwort koordinieren bestimmte antigenpräsentierende Zellen (APCs) über verschiedene Mechanismen den Übergang vom angeborenen in das erworbene Immunsystem (Croxford *et al.*, 2012). Auf der Zelloberfläche von APCs, zu denen dendritische Zellen und Gewebsmakrophagen gehören, befinden sich Toll-like-Rezeptoren. Nach Aktivierung dieser durch exogene oder endogene Pathogene schütten die Zellen lösliche Faktoren aus, über die sie die Differenzierung von T-Zellen steuern. Zu diesen Faktoren gehört unter anderem IL-23 (siehe Abb. 4) (Re & Strominger, 2001, Verreck *et al.*, 2004, Zuniga *et al.*, 2013).

Die initiale Differenzierung von naiven T Zellen zu IL-17-produzierenden T_{H17} -Zellen beginnt mit der Aktivierung durch *transforming growth factor- β* (TGF- β) und IL-6 (siehe Abb. 4). Entscheidend sind hierbei geringe Konzentrationen von TGF- β . Hohe Konzentrationen führen zur Entstehung regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) anstelle von T_{H17} -Zellen (Zuniga *et al.*, 2013). IL-6 aktiviert STAT3, woraufhin spezifische Gene, die unter anderem für den Transkriptionsfaktor ROR γ t kodieren, exprimiert werden und die Zellen den IL-23R auf ihrer Zelloberfläche ausbilden (Yang *et al.*, 2007, Durant *et al.*, 2010). Die vollständige Differenzierung zu T_{H17} -Zellen mit potentiell pathogenen Eigenschaften und die Aufrechterhaltung dieses Zelltyps (Langrish *et al.*, 2005) erfolgen schließlich durch eine Stimulation mit IL-23 (siehe Abb. 4). Reife T_{H17} -Zellen produzieren eine Reihe von charakteristischen Zytokinen mit proinflammatorischen Eigenschaften, zu denen IL-17, IL-22, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und Interferon- γ (IFN- γ) gehören (McGeachy *et al.*, 2009, Zuniga *et al.*, 2013).

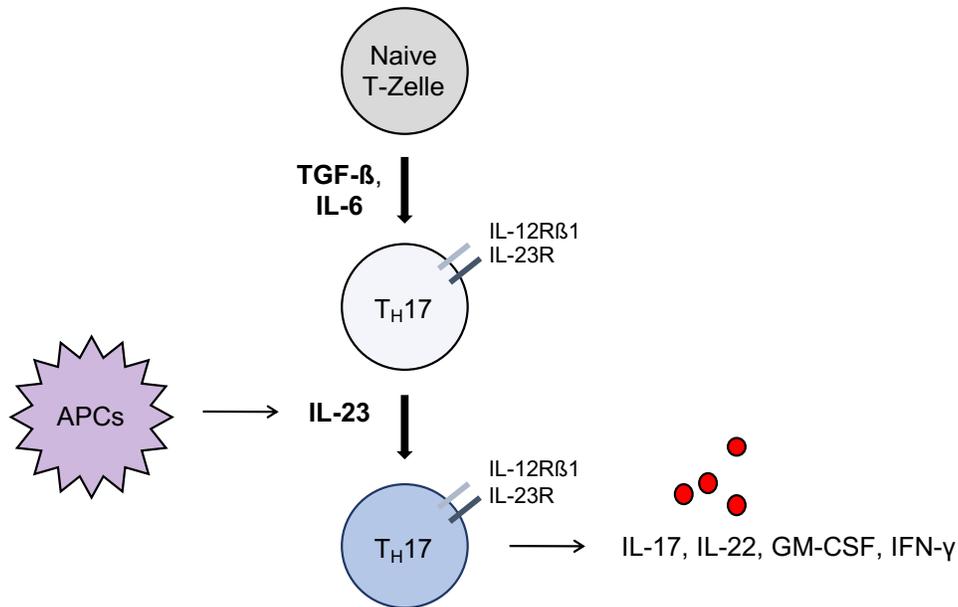


Abb. 4: Schematische Darstellung der Differenzierung naiver T-Zellen zu T_H17-Zellen. Die initiale Differenzierung von naiven T Zellen zu IL-17-produzierenden T_H17-Zellen erfolgt durch TGF-β und IL-6. IL-23 führt zur vollständigen Differenzierung und Aufrechterhaltung des spezifischen Zelltyps. T_H17-Zellen sezernieren eine Vielzahl proinflammatorischer Zytokine (IL-17, IL-22, GM-CSF, IFN-γ) und sind sowohl an der physiologischen Immunantwort gegen verschiedene Pathogene als auch an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Di Cesare *et al.* (2009).

Der Beitrag von IL-23 zur Entstehung und Progredienz organspezifischer Autoimmunerkrankungen wurde erstmals 2003 anhand von p19^{-/-} Mäusen beschrieben. Diese Mäuse zeigten keine Anfälligkeit im Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einer mit der Multiplen Sklerose beim Menschen vergleichbaren, künstlich herbeigeführten Erkrankung des zentralen Nervensystems (Cua *et al.*, 2003). Infolgedessen wurde IL-23 mit der Entstehung und Funktionalität einer pathogenen Subpopulation von T-Zellen (T_H17-Zellen) in Zusammenhang gebracht (Langrish *et al.*, 2005, Park *et al.*, 2005, Harrington *et al.*, 2005). Anhand weiterer Mausmodelle wurde die proinflammatorische Rolle des Zytokins untermauert. Dort stand der Einfluss von IL-23 in Zusammenhang mit Erkrankungen wie *collagen-induced arthritis* (CIA) (Murphy *et al.*, 2003), Spondyloarthritis (Sherlock *et al.*, 2012) und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Hue *et al.*, 2006, Ahern *et al.*, 2010, Neurath, 2019). Überdies wurde ein förderlicher Effekt des Zytokins auf die Inzidenz und das Wachstum verschiedener Tumore demonstriert (Langowski *et al.*, 2006, Teng *et al.*, 2010, Chan *et al.*, 2014).

Auch beim Menschen wurde eine Beteiligung von IL-23 an verschiedenen Krankheitsbildern nachgewiesen. Zu diesen gehörten beispielsweise Psoriasis (Wilson *et al.*, 2007), Rheumatoide Arthritis (Rasmussen *et al.*, 2010), Multiple Sklerose (Vaknin-Dembinsky *et al.*, 2006, Wen *et al.*, 2012), chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Liu *et al.*, 2011, Neurath, 2019) oder Krebs (Yan *et al.*, 2018, Neurath, 2019). Weiterhin wurden *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) des IL-23R bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (Hollis-Moffatt *et al.*, 2009), koronarer Herzkrankheit (Zhang *et al.*, 2014), Alzheimer (Liu *et al.*, 2014) und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Cummings *et al.*, 2007, Neurath, 2019) gefunden. Das genaue Verständnis der IL-23-Signaltransduktion ist ein wichtiger Schritt in der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten.

1.6 Mutationen lösen eine ligandenunabhängige Aktivierung von Zytokinrezeptoren aus

In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von Mutationen identifiziert, die in einer konstitutiven Aktivierung von Zytokinrezeptoren resultieren. Eine derartige kontinuierliche Rezeptorstimulation führt ohne die Beteiligung eines Liganden zu einer gesteigerten Aktivierung intrazellulärer Signalwege und somit zu einer veränderten Genexpression. Diese kann die Entstehung schwerwiegender Krankheiten, wie chronisch entzündlicher Erkrankungen und Krebs, begünstigen (Floss & Scheller, 2019).

Grundsätzlich können verschiedene Auslöser, wie *gain-of-function*-Mutationen, genomische Amplifikationen, chromosomale Neuankordnungen oder autokrine Aktivierungen eine konstitutive Rezeptoraktivierung verursachen (Du & Lovly, 2018). Im Gegensatz zu *loss-of-function*-Mutationen, die in funktionslosen Proteinen resultieren, verstärken *gain-of-function*-Mutationen den Effekt der mutanten Proteine. Die Ursachen der *gain-of-function*-Mutationen beruhen auf Veränderungen der DNA, die beispielsweise zum Auftreten von Punktmutationen (z.B. Entstehung eines Cysteins) oder Deletionen in den entsprechenden Proteinen führen (Du & Lovly, 2018, Floss & Scheller, 2019). Solche Mutationen können natürlich entstehen oder synthetisch über verschiedene molekulare Prinzipien herbeigeführt werden. Natürlich vorkommende *gain-of-function*-Mutationen mit der Folge von konstitutiv aktiven Rezeptoren wurden für unterschiedlichste Zytokinrezeptoren beim Menschen identifiziert (Floss & Scheller, 2019).

Die Identifikation bei den jeweiligen Patienten erfolgte aufgrund des direkten Beitrags der Rezeptormutanten zur Krankheitsentstehung (Floss & Scheller, 2019). Beispielsweise besitzen ungefähr 60% der inflammatorischen hepatozellulären Adenome (IHCA) somatische Mutationen in den Exons, die für gp130, den Rezeptor der IL-6-Zytokinfamilie, kodieren. Einige dieser gp130-Rezeptoren inklusive der am häufigsten vorkommenden IHCA-assoziierten Mutante gp130 Δ Y186-Y190 (Rebouissou *et al.*, 2009) wiesen eine konstitutive Aktivität auf (Rebouissou *et al.*, 2009, Poussin *et al.*, 2013, Pilati & Zucman-Rossi, 2015). Weiterhin wurden konstitutiv aktive THPO-Rezeptoren in Erkrankungen, wie einer familiären Form der essentiellen Thrombozythämie (THPOR-S505N) und myeloproliferativen Neoplasien (THPOR-W515K) identifiziert (Ding *et al.*, 2004, Defour *et al.*, 2013). Außerdem lösten IL-7R-Varianten mit autonomer Signalgebung die Entwicklung einer akuten lymphatischen Leukämie aus (Oliveira *et al.*, 2019).

Nebenbei war eine konstitutive Aktivierung der genannten Zytokinrezeptoren in einigen Fällen auf eine spontane Rezeptorhomodimerisierung zurückzuführen. Mithilfe unterschiedlicher Methoden wurden außerdem synthetische Rezeptorvarianten des gp130, THPOR und IL-7R mit konstitutiver Rezeptoraktivität erstellt (Floss & Scheller, 2019).

In letzter Zeit gibt eine neue Form der Immuntherapie Anlass für große Hoffnung in der modernen Onkologie. Diese sogenannte *chimeric antigen receptor* (CAR)-T-Zell-Therapie beruht auf synthetisch generierten Rezeptoren und wurde 2017 erstmals für refraktäre oder rezidierte diffus großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL) und refraktäre oder rezidierte akute lymphatische Leukämien (ALL) zugelassen (Charrot & Hallam, 2019, Si *et al.*, 2018). Ein CAR besteht aus einem extrazellulären *single chain variable fragment* (scFv)-Antikörper, der mit intrazellulären T-Zell-Rezeptordomänen verbunden ist, und wird von spezifischen T-Lymphozyten exprimiert. Während der extrazelluläre scFv-Antikörper ein tumorspezifisches Antigen erkennt, leiten die intrazellulären Domänen die äußeren Stimuli als T-Zellsignale weiter, woraufhin die aktivierte CAR-T-Zelle die entsprechende Tumorzellen zerstört und eine Remission bewirkt (Si *et al.*, 2018). Trotz eindrucksvoller klinischer Erfolge gibt es einigen Bedarf an Verbesserungen dieser Strategie hinsichtlich Effizienz und Nebenwirkungen, für die möglicherweise konstitutiv aktive Zytokinrezeptoren ein geeignetes Mittel sind (Floss & Scheller, 2019). Erstaunlicherweise zeigten CAR-T-Zellen, die neben tumorspezifischen CARs zusätzlich konstitutiv aktive IL-7Rs co-exprimierten, eine gesteigerte T-Zell-Proliferation, ein verlängertes Überleben sowie eine stärkere antitumorale Aktivität in Mausmodellen (Shum *et*

al., 2017). Weitere Anwendungsmöglichkeiten von konstitutiv aktiven Rezeptoren als Ergänzung einer konventionellen CAR-T-Zell-Therapie sind daher denkbar.

Natürlich vorkommende konstitutiv aktive Rezeptoren der IL-12-Familie sind bisher nicht bekannt (Floss & Scheller, 2019). Allerdings wurde eine ligandenunabhängige Aktivierung des murinen und humanen IL-23R durch spezifische Deletionen innerhalb der extrazellulären Rezeptordomänen herbeigeführt (Ciupka, 2014, Ackfeld, 2020). Zudem führte ein funktionales IL-23R-Homodimer, das durch eine Fusion von IL-15 mit der Transmembran- und intrazellulären Domäne des Rezeptors erzeugt wurde, zu einem konstitutiv aktiven Rezeptor (Suthaus *et al.*, 2010, Hummel *et al.*, 2017).

1.7 Ziele dieser Arbeit

Die vorausgehenden Daten der Masterarbeit von Gregor Ciupka und der Dissertation von Theresa Ackfeld deuten darauf hin, dass die Länge der *stalk*-Region des IL-23R entscheidend für die IL-23-Signaltransduktion ist. Eine aus 6 AS bestehende *stalk*-Region (Δ 343-372) des murinen IL-23R bzw. eine 6 AS umfassende *stalk*-Region (Δ 323-353) des humanen IL-23R waren ausreichend, um die IL-23-Signalweiterleitung zu ermöglichen (Ciupka, 2014, Ackfeld, 2020, Hummel *et al.*, 2017). Ähnliche Ergebnisse wurde bereits für die IL-6R-*stalk*-Region gezeigt (Baran *et al.*, 2013). Weiterhin leitete das Entfernen der „erweiterten“ *stalk*-Region des mIL-23R bzw. der vollständigen hIL-23R-*stalk*-Region die Bildung eines konstitutiv aktiven IL-23R ein. Diese ligandenunabhängige Rezeptoraktivierung wurde ohne die Beteiligung des IL-12R β 1 ausgelöst (Ciupka, 2014, Ackfeld, 2020, Hummel *et al.*, 2017). Konstitutiv aktive Rezeptorvarianten sind als Ursache diverser Krankheiten, vorwiegend aus dem Kreis der Autoimmun- und Krebserkrankungen, bekannt (Floss & Scheller, 2019).

Ziel dieser Doktorarbeit ist die Vervollständigung der Charakterisierung der *stalk*-Region des humanen und murinen IL-23R sowie deren Einfluss auf eine potentielle Homodimerisierung der Rezeptoren. Hierfür sollen weitere IL-23R-Deletionsvarianten kloniert werden. Anschließend sollen entsprechende IL-23-responsive Ba/F3-gp130-Zelllinien, die die Rezeptorvarianten exprimieren, hergestellt werden. Die erzeugten Ba/F3-gp130-Zelllinien sollen hinsichtlich der Zelloberflächenexpression der beiden Rezeptorketten, auf die IL-23-abhängige Zellproliferation sowie die Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges analysiert werden. Hierbei steht STAT3 im Vordergrund. Die im Rahmen der Arbeit erhaltenen Daten sollen mit den bereits existierenden Daten der humanen und murinen IL-23Rs verglichen werden. Weiterhin konnte bisher keine Bildung von aktiven IL-23R-Homodimeren nachgewiesen werden, von denen bekannt ist, dass sie zu einer ligandenunabhängigen Signaltransduktion führen können (Suthaus *et al.*, 2010). Daher soll im Rahmen dieser Arbeit die IL-23R-Homodimerisierung mithilfe von Co-Immunopräzipitationsexperimenten demonstriert werden. Bislang sind beim Menschen keine natürlich vorkommenden Mutationen bekannt, die in konstitutiv aktiven IL-23Rs, möglicherweise in Form von IL-23R-Homodimeren, resultieren (Floss & Scheller, 2019). Die Identifikation solcher wäre ein großer Beitrag zum Verständnis von IL-23-assoziierten Erkrankungen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien & Kits

Chemikalien, die für diese Arbeit benötigt wurden, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid 30%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
dNTP Mix (25 mM)	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler™ Express DNA Ladder 100-5000 bp	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Glycerin (99%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
KCl	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
$MgCl_2$	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na_2HPO_4	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
NaF	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NHS-activated Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
NP-40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Orange G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Polybrene	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypan Blue	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
TurboFect™	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

In Tabelle 2 werden die in dieser Arbeit eingesetzten Verbrauchsmaterialien genannt.

Tabelle 2: Übersicht der benötigten Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
BD Falcon™ Reaktionsgefäße (15 ml und 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Cell Counting Slides for TC10™/TC20™ Cell Counter, Dual-Chamber	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Kryoröhrchen	VWR International GmbH, Langenfeld, Deutschland

Verbrauchsmaterial	Hersteller
MICRO-TOUCH [®] Nitra-Tex [®] EP [™] Handschuhe	Ansell Health Care, Brüssel, Belgien
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Roti [®] -PVDF-Transfermembran	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Sempercare [®] Premium Handschuhe	SATRA Technology Centre, Kettering, UK
Whatman [™] Papier	VWR International GmbH, Langenfeld, Deutschland
Zellkulturschale 10 cm (adhärente Zellen)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale 10 cm (Suspensionszellen)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale 6-well	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale 96-well	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

In Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit eingesetzten Kits verzeichnet.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Kits.

Kits	Hersteller
Amersham [™] ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
CellTiter-Blue [®] Cell Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
NucleoBond [®] Xtra Midi/Maxi	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin [®] Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Pierce [®] BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

2.1.2 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen für diese Arbeit sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
APS-Lösung (Western Blot)	10% APS
<i>blocking buffer</i> (Western Blot)	5% Magermilchpulver in TBS-T
BSA-Lösung 5%	5% BSA in TBS-T
FACS-Puffer	1% BSA in PBS

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Lämmli-Puffer (5x)	10% SDS 5% β -Mercaptoethanol 50% Glycerin 125 mM Tris-HCl pH 6,8 1 Spatelspitze Bromphenolblau
<i>lysis buffer</i> pSTAT3	150 mM NaCl 2 mM EDTA 50 mM Tris-HCl pH 7,5 1% Triton X-100 1% NP-40 1 mM Na_3VO_4 1 mM NaF 1 cOmplete™ Protease Inhibitor Tablette auf 50 ml
Magermilchpulverlösung 5%	5% Magermilchpulver in TBS-T (0,5%)
Nanotrap <i>dilution buffer</i>	20 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM Na_3VO_4 10 mM NaF 1 mM PMSF 1 cOmplete™ Protease Inhibitor Tablette auf 50 ml
Nanotrap <i>lysis buffer</i>	<i>Nanotrap dilution buffer</i> + 0,5% NP-40
Orange G Ladepuffer (6x)	30% Glycerin 50 mM EDTA 0,25% Orange G
PBS	1,5 mM KH_2PO_4 2,7 mM KCl 8,1 mM Na_2HPO_4 137 mM NaCl pH 7,4
S1-Puffer für Plasmid-DNA-Minipräparation	1 M Tris-HCl pH 7,4 0,5 M EDTA 4 M NaOH 10% SDS 1:1000 RNase
S2-Puffer für Plasmid-DNA-Minipräparation	0,2 M NaOH 1% SDS
S3-Puffer für Plasmid-DNA-Minipräparation	3 M Kaliumacetat
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% SDS
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl pH 8,3 192 mM Glycin 0,1% SDS

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
<i>stripping buffer</i>	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 2% SDS 0,1% β -Mercaptoethanol
TBS	5 M NaCl 200 mM Tris pH 7,5
TBS-T	5 M NaCl 200 mM Tris pH 7,5 0,05% Tween [®] 20
Transferpuffer	250 mM Tris-HCl pH 8,0 2 M Glycerin 0,01% SDS 5% Methanol
Trennpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4% SDS

2.1.3 Medien und Antibiotika

Medien für die Kultivierung der Bakterien wurden sterilisiert (20 min, 121°C, 2 bar). Antibiotika (siehe Tabelle 6) wurden steril filtriert und nach dem Abkühlen auf 50°C zugegeben. Alle in dieser Arbeit verwendeten Medien sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der benutzten Medien.

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
DMEM ^{-/-}	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium, high Glucose (4,5 g/l) with stable Glutamine</i>	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
DMEM ^{+/+}	DMEM ^{-/-} 10% fötales Kälberserum (FCS), 60 mg/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin	
Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 1% Trypton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Luria-Bertani-Agar (LB-Agar)	0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 1% Trypton, 1,5% Agar-Agar	

Die in dieser Arbeit eingesetzten Antibiotika werden in Tabelle 6 genannt.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Antibiotika.

Antibiotika	Arbeitskonzentration	Hersteller	Stammkonzentration
Ampicillin	200 μ g/ml für Agarplatten; 100 μ g/ml für Flüssigmedium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	100 mg/ml
G418 (Geneticin)	400 μ g/ml	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Deutschland	50 mg/ml
Hygromycin B	1 mg/ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	100 mg/ml
Kanamycin	100 μ g/ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	100 mg/ml

Antibiotika	Arbeitskonzentration	Hersteller	Stammkonzentration
Penicillin	60 mg/l	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Deutschland	10000 U/ml
Puromycin	1,5 µg/ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	1 mg/ml
Streptomycin	100 mg/l	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Deutschland	10 mg/ml

2.1.4 Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sowie die entsprechenden Puffer stammten von Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland.

2.1.5 Geräte

In Tabelle 7 sind die für diese Arbeit benutzten Geräte gelistet.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Geräte.

Geräte	Hersteller
Autoklav Laboklav 25	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle, Deutschland
BD FACSCanto™ II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BINDER CO2-Inkubator	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Biorad PowerPac™ HC	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gefrierschrank Forma™ 900	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Gelelektrophoresekammern	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Heizbad LAUDA Aqualine AL 12 & AL 25	LAUDA Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Inkubationsschüttler Infors HT Multitron®	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
INTAS ChemoCam Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
INTAS Gel iX Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Intelli Mixer	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Magnetrührer mit Heizung	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Mars Safety Class 2 Sterilbank	Scanlaf, Lyngø, Dänemark
Mikrowelle Optiquick	Moulinex, Offenbach, Deutschland
MiniPROTEAN® Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Geräte	Hersteller
Minizentrifuge	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
NanoDrop™ 2000c Spectrophometer	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
peqStar 2X Twin Block Thermal Cycler	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
pH-Meter	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Plattformschüttler Titramax 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Research® plus Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sterilbankpumpe	HLC BioTech, Göttingen, Deutschland
Taumelrollenmischer CAT RM 5-30V	M. Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen Deutschland
TC20™ Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Tecan infinite M200 PRO Reader	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Thermomixer® comfort & compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ Blotting System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland
Vortex Genie 2	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Waage EW 4200-2NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.6 Plasmide

Die in dieser Arbeit eingesetzten oder hergestellten Plasmide werden in Tabelle 8 genannt.

Tabelle 8: Aufzählung der verwendeten und generierten Plasmide.

Plasmide	Bakterielle Resistenz	Herkunft
pCR-Script	Amp	AG Scheller
pcDNA3.1	Amp	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland)
p409	Amp	Althoff <i>et al.</i> (2001)
pMOWS-puro-GFP	Amp	Ketteler <i>et al.</i> (2002)
pEGFP-N1	Kan	Clontech Laboratories, Takara Bio, Mountain View, CA, USA
pCR-Script-mIL-23RΔ336-372	Amp	AG Scheller

Plasmide	Bakterielle Resistenz	Herkunft
pCR-Script-mIL-23RΔ337-372	Amp	AG Scheller
pcDNA3.1-hIL-23RΔ313-318; 323-353	Amp	AG Scheller
pcDNA3.1-hIL-23RΔ319-353	Amp	AG Scheller
p409-hIL-23R	Amp	Franke <i>et al.</i> (2016), Ackfeld (2020)
p409-hIL-23RΔ344-353	Amp	Franke <i>et al.</i> (2016), Ackfeld (2020)
p409-hIL-23RΔ334-353	Amp	Franke <i>et al.</i> (2016), Ackfeld (2020)
p409-hIL-23RΔ323-353	Amp	Franke <i>et al.</i> (2016), Ackfeld (2020)
p409-hIL-23RΔ313-353	Amp	Ackfeld (2020)
p409-mIL-23R	Amp	Floss <i>et al.</i> (2013)
p409-mIL-12Rβ1	Amp	Floss <i>et al.</i> (2013)
p409-mIL-23RΔ363-372	Amp	Ciupka (2014)
p409-mIL-23RΔ353-372	Amp	Ciupka (2014)
p409-mIL-23RΔ343-372	Amp	Ciupka (2014)
p409-mIL-23RΔ333-372	Amp	Ciupka (2014)
p409-mIL-23RΔ317-372	Amp	Ciupka (2014)
p409-mIL-23RΔ317-336	Amp	Ciupka (2014)
p409-mIL-23R-GFP	Amp	AG Scheller
p409-FLAG-mIL-23R	Amp	AG Scheller
pMOWS-hIL-12Rβ1	Amp	Franke <i>et al.</i> (2016), Ackfeld (2020)
pMOWS-hIL-23RΔ344-353	Amp	Ackfeld (2020)
pMOWS-hIL-23RΔ334-353	Amp	Ackfeld (2020)
pMOWS-hIL-23RΔ323-353	Amp	Ackfeld (2020)
pMOWS-hIL-23RΔ313-353	Amp	Ackfeld (2020)
pMOWS-mIL-12Rβ1	Amp	Floss <i>et al.</i> (2013)

2.1.7 Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit für *colony*-PCRs oder zur Sequenzierung benötigten Oligonukleotide sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Zusammenstellung der verwendeten Oligonukleotide.

Nr.	Name	Sequenz (5'-3')
DF12	mIL-23R pF3	GCAAGCTTGCCACCATGAGTCACCTCACACTTCAGC

Nr.	Name	Sequenz (5'-3')
DF26	23A pR1	CAGATGGACGTGTAGTTGTTGTG
DF27	23B pF1	CAACTACACGTCCATCTGGATG
DF28	23B pR1	GCAACATGATGGCCAAGAAGAC
DF29	23C pF1	TGGTCTTCTTGGCCATCATGT
DF85	5' pMOWS	AGCCCTTTGTACACCCTAAGC
DF86	3' pMOWS	AGCAATAGCATGATACAAAGG
DF87	T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG
DF120	T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG
DF320	GFP-Afl-RP	GACCTTAAGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAG
DF332	hIL-23R-EcoRV-FP	CTTCTGGATATCCGCCAGATA
DF366	hIL-23R-EcoRV-FP2	CTTCTGGATATCCGCCAGATATTCCTG
	M13	TGTAACACGACGGCCAG
	M13r	CAGGAAACAGCTATGAC
	T7	TAATACGACTCACTATAGGG
	5'p40 Hind	GACAAGCTTGACTACAAAGA TGACGATG

2.1.8 Bakterienstämme & Zelllinien

Der *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm XL1-blue {recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proABlacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]} wurde als Wirtszelle für rekombinante DNA Moleküle verwendet.

Die für diese Arbeit verwendeten eukaryotischen Zelllinien sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 gelistet.

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Zellarten.

Zelllinie	Zellart	Ursprung	Hersteller
Ba/F3-gp130	Suspensionszellen	prä-B-Zellen, murin	Immunex, Seattle, WA, USA, Gearing <i>et al.</i> (1994)
COS-7 (ACC-60)	Adhärente Zellen	Nierenzellen, grüne Meerkatze	Leibniz Institut DSMZ, Braunschweig, Deutschland
CHO-K1 (ACC-110)	Adhärente Zellen	Ovarzellen, chinesischer Hamster	Leibniz Institut DSMZ, Braunschweig, Deutschland
Phoenix-Eco	Adhärente Zellen	Embryonale Nierenzellen, human	DKFZ, Heidelberg, Deutschland, Prof. Dr. Ursula Klingmüller, Ketteler <i>et al.</i> (2002)
U4C	Adhärente Zellen	Fibrosarkomzellen (Jak1 defizient), human	Floss <i>et al.</i> (2016)

Tabelle 11: Übersicht der Ba/F3-gp130-Zelllinien in dieser Arbeit.

Ba/F3-gp130-Zelllinie	Resistenz	Herkunft
Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R-P310	Puromycin, Hygromycin B	Ackfeld (2020)
Ba/F3-gp130-hIL-23R-P310	Puromycin	Ackfeld (2020)
Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 344-353	Puromycin	Ackfeld (2020)
Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 334-353	Puromycin	Ackfeld (2020)
Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 323-353	Puromycin	Ackfeld (2020)
Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 313-353	Puromycin	Ackfeld (2020)
Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R	Puromycin, Hygromycin B	Floss <i>et al.</i> (2013)
Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 317-372	Puromycin, Hygromycin B	Ackfeld (2020)
Ba/F3-gp130-mIL-23R	Puromycin	Floss <i>et al.</i> (2013)
Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 353-372	Puromycin	Ackfeld (2020)
Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 343-372	Puromycin	Ackfeld (2020)
Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 333-372	Puromycin	Ackfeld (2020)
Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 317-372	Puromycin	Ackfeld (2020)

2.1.9 Antikörper

Alle Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit benötigt wurden, sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Liste der verwendeten Antikörper.

Antikörper, Ursprung	Stammkonzentration	Verdünnung	Hersteller
Western Blot			
α -PSTAT3 IgG (Tyr705) (D3A7) XP [®] mAB #9145, Kaninchen	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland
α -STAT3 (124H6) mAB #9139, Maus	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland
α -Kaninchen IgG-HRP-konjugiert, Ziege	0,4 mg/ml	1:5000	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
α -Maus IgG HRP-konjugiert (31432), Ziege	0,4 mg/ml	1:5000	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
α -hIL-23R biotinyliert (BAF 1400), Ziege	0,2 mg/ml	1:1000	Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland
α -hIL-12R β 1 biotinyliert (BAF839), Ziege	50 μ g/ml	1:300	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
α -mIL-23R biotinyliert (BAF1686), Ziege	0,2 mg/ml	1:1000	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
α - mIL-12R β 1 biotinyliert (BAF1998), Ziege	0,2 mg/ml	1:300	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
α -GFP IgG ₁ κ mAB #11814460001, Maus	0,4 mg/ml	1:1000	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland

Antikörper, Ursprung	Stammkonzentration	Verdünnung	Hersteller
α -FLAG [®] , Kaninchen	k.A.	1:1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Durchflusszytometrie			
APC-Streptavidin (# 554067)	0,2 mg/ml	1:100	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
α -Ratte IgG Alexa Fluor 647 konjugiert, Ziege	1,6 mg/ml	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland
α -hIL-23R biotin (BAF 1400), Ziege	0,2 mg/ml	1:40	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
α -hIL-12R β 1 PE-konjugiert (FAB839P), Maus	k.A.	1:10	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
α -mIL-23R (MAB 1686), Ratte	0,2 mg/ml	1:20	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
α -mIL-12R β 1 PE-konjugiert (FAB 1998P), Ziege	50 μ g/ml	1:10	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

2.1.10 Zytokine

Tabelle 13 enthält eine Liste der in dieser Arbeit eingesetzten Zytokine.

Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Zytokine.

Zytokine	Stockkonzentration	Herkunft
kond. Zellkulturüberstand von CHO-K1-Zelllinie mit Hyper-IL-6 Expression (HIL-6)	5 μ g/ml	Floss <i>et al.</i> (2013)
kond. Zellkulturüberstand von CHO-K1-Zelllinie mit Hyper-IL-23 Expression (HIL-23)	5 μ g/ml	Floss <i>et al.</i> (2013)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation chemisch-kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurde die entsprechende DNA mithilfe eines Hitzeschocks in chemisch-kompetente *E. coli XL1 blue* eingebracht. Hierfür wurde den zuvor auf 30 μ l aliquotierten und bei -80°C gelagerten, chemisch kompetenten Bakterien, nach vollständigem Auftauen auf Eis (ca. 20 min), 1 μ l der Plasmid-DNA oder 10 μ l eines Ligationsansatzes hinzugegeben. Die Suspension wurde erst auf Eis (5 min) und später für die Transformation mittels Hitzeschock bei 42°C inkubiert (1 min). Nach erneuter Inkubation auf Eis (5 min) wurden 500 μ l erwärmtes LB-Medium (ca. 37°C) hinzugefügt und für 1 h bei 37°C und 1400 rpm geschüttelt. 100 μ l der Ansätze wurden gleichmäßig auf LB-Agarplatten mit dem entsprechendem Selektionsantibiotikum verteilt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

Das Gewinnen von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien erfolgte entweder als Plasmid-DNA-Mini- oder als -Midipräparation. Konnte mittels Plasmid-DNA-Minipräparation innerhalb kurzer Zeit eine große Anzahl von Bakterienkolonien untersucht werden, so war es Ziel einer darauffolgenden Plasmid-DNA-Midipräparation, möglichst große Mengen der gewünschten Plasmid-DNA in gereinigter Form zu isolieren.

Plasmid-DNA-Minipräparation

Eine Flüssigkultur aus 2 ml LB-Medium mit dem entsprechendem Selektionsantibiotikum wurde mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 1200 rpm inkubiert. 500 µl der Bakteriensuspension wurden für die Inokulation einer Flüssigkultur zur Plasmid-DNA-Midipräparation abgenommen und die restlichen 1500 µl 5 min bei Raumtemperatur (RT) und ca. 4000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 100 µl Solution S1 resuspendiert und 200 µl Solution S2 zur Lyse der Bakterien hinzugefügt. Nach kurzer Inkubation wurden 150 µl Solution S3 zur Neutralisation zugegeben und gemischt. Nach Inkubation auf Eis (10 min) und Zentrifugation (4°C, 10 min, 13000 rpm) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß mit 900 µl absolutem Ethanol überführt und für 5 min auf Eis gekühlt. Der durch Zentrifugation (RT, 15 min, 13000 rpm) erhaltene Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, das DNA-Pellet mit 500 µl 70% Ethanol versehen und erneut zentrifugiert (RT, 5 min, 13000 rpm). Der Überstand wurde komplett abgenommen und das Pellet für 5-20 min luftgetrocknet, bis kein Ethanol mehr vorhanden war. Zum vollständigen Lösen der DNA wurden den Reaktionsgefäßen 30 µl H₂O_{dd} hinzugegeben und diese bei 37°C für 10-15 min schüttelnd inkubiert. Für eine analytische Restriktion wurden 2 µl der gewonnen DNA verwendet (siehe 2.2.5).

Plasmid-DNA-Midipräparation

Ein Erlenmeyerkolben wurde mit 100 ml LB-Medium inklusive Selektionsantibiotikum und 50-150 µl der bereits mittels Plasmid-DNA-Minipräparation analysierten *E. coli*-Flüssigkulturen befüllt, mit Aluminiumfolie verschlossen und über Nacht (37°C, 12-16 h, 140 rpm) schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in ein 50 ml *Falcon*TM überführt und pelletiert (4°C, 10 min, 4000 rpm). Der Überstand wurde vollständig durch Abkippen entfernt und der Vorgang erneut mit den verbliebenen 50 ml der Bakterienkultur wiederholt, bis die

Zellen vollständig geerntet waren. Die weitere DNA-Präparation erfolgte mittels *NucleoBond® Xtra Midi/Maxi* Kit unter Befolgung der Herstellerangaben.

2.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von in H₂O_{dd} gelöster Plasmid-DNA wurde mithilfe eines Photometers mit UV-Lampe (*NanoDrop™ 2000c*) über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine Menge von 1 µl der Probe war ausreichend für die Analyse.

2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Restringierte DNA-Fragmente wurden nach analytischer oder präparativer Restriktion mittels Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt, visualisiert und gegebenenfalls isoliert (siehe 2.2.6). Hierfür wurde Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und in Gelform gegossen. Je nach Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente bestanden die Gele aus 1-2% Agarose. Um die DNA später unter der UV-Lampe identifizieren zu können, wurden die Agarosegele mit 0,0001% Ethidiumbromid versetzt. Nach Zugabe von *Orange G Ladepuffer (6x)* zu den entsprechenden Proben wurden die Taschen des Gels beladen. Ebenfalls aufgetragen wurden die DNA-Größenstandards *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* und *GeneRuler™ Express DNA Ladder*. Die Trennung der DNA-Fragmente nach Größe erfolgte bei einer Spannung von ca. 120 V. Zur Detektion wurde der *INTAS Gel iX Imager* verwendet.

2.2.5 Restriktionsspaltung von DNA

Plasmid-DNA wurde mittels enzymatischer Restriktion zur Überprüfung klonierter Vektoren (analytisch), und zur Isolierung einzelner DNA-Fragmente (präparativ) geschnitten. Alle verwendeten Restriktionsenzyme und Puffer wurden von der Firma *Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH* bezogen. Folgende Ansätze wurden verwendet:

Analytisch:

DNA	500 ng-1 µg
Restriktionsenzym	0,3-0,5 µl
10x Reaktionspuffer	2 µl
H ₂ O _{dd}	ad 20 µl

Präperativ:

DNA	10 µg
Restriktionsenzym	2 µl
10x Reaktionspuffer	4 µl
H ₂ O _{dd}	ad 40 µl

Eine Inkubation bei 37°C erfolgte für 1-2 h bei einer analytischen oder über Nacht im Falle einer präparativen Restriktion. Für eine Doppelrestriktion mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen wurden die beschriebenen Ansätze nach Angaben des Herstellers modifiziert (<https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html>). Alle restringierten DNA-Proben wurden mit *Orange G Ladepuffer (6x)* versetzt und mittels Agarosegelelektrophorese der Größe nach voneinander getrennt (siehe 2.2.4).

2.2.6 Reinigung von DNA-Fragmenten

Das Isolieren von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mittels *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* Kit unter Beachtung der Herstellerangaben. Das zu isolierende DNA-Fragment wurde zuvor mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Nach Extraktion der Plasmid-DNA aus dem Agarosestück wurde diese in 30 µl H₂O_{dd} gelöst und die Konzentration bestimmt (siehe 2.2.3).

2.2.7 Dephosphorylierung der 5'Enden von DNA-Fragmenten

Um einer erneuten Ligation eines Vektors, der zuvor mittels enzymatischer Restriktion geschnitten worden war (siehe 2.2.5), entgegenzuwirken, wurden die 5' Enden der DNA-Fragmente mit der alkalischen Phosphatase von *Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH* dephosphoryliert. Dieser Schritt ist notwendig nach der Linealisierung von Plasmiden sowie bei der Verwendung von Enzymen, die glatte Enden erzeugen. Hierzu wurde einem Restriktionsansatz (40 µl) folgender Ansatz hinzugefügt:

Fast-AP	3 µl
10x Fast-AP-Puffer	1 µl
H ₂ O _{dd}	ad 50 µl

Nach Inkubation (37°C, 2 h) wurde das Enzym durch Hitze (75°C, 5 min) inaktiviert.

2.2.8 Klenow-Behandlung des pMOWS-Vektors

Bei enzymatischer Restriktion des Vektors pMOWS-puro-GFP (pMOWS) (Ketteler *et al.*, 2002) mit den Restriktionsenzymen EcoNI und BamHI entstehen überhängende DNA-Einzelstränge, sogenannte *sticky ends*, die an den 5'Enden erweitert bzw. an den 3'Enden gekürzt werden müssen, um glatte Enden (*blunt ends*) zu erhalten. Erst dann war eine Ligation mit dem gewünschten *insert* (siehe 2.2.9), das ebenfalls glatte Enden besaß, nach vorheriger Dephosphorylierung (siehe 2.2.7) möglich. Diese als Klenow-Behandlung bezeichnete Reaktion erfolgte mit beschriebenen Ansatz (s.u.) bei 37°C (10 min) und wurde durch die Inkubation bei 95°C (10 min) beendet. Der Klenow-Ansatz beinhaltete:

DNA	0,1-4 µg
2 mM dNTP Mix	0,5 µl
10x Klenow-Puffer	3 µl
Klenow-Fragment	0,5 µl
H ₂ O _{dd}	ad 30 µl

2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Zum Klonieren von Plasmiden wurden sogenannte *inserts* mit der gewünschten Basensequenz in Zielvektoren eingefügt. Eine solche Vereinigung von *insert*-DNA und Vektor wird als Ligation bezeichnet. Hierfür wurde in dieser Arbeit das Enzym *T4 DNA Ligase* benutzt. Zur Berechnung der erforderlichen Menge an *insert*-DNA diente folgende Formel:

$$\frac{5 \times \text{Masse des Vektors [ng]} \times \text{Länge des } \textit{inserts} \text{ [bp]}}{\text{Länge des Vektors [bp]}}$$

Der Reaktionsansatz bestand aus:

Vektor-DNA	50-100 ng
10x Reaktionspuffer	2 µl
T4 DNA Ligase	2 µl
<i>insert</i> -DNA	x µl
PEG 4000 Lösung (nur bei einer <i>blunt end</i> Ligation)	2 µl
H ₂ O _{dd}	ad 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 1-2 h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C im Falle von *blunt end* Ligationen inkubiert. Mit 10 µl des Ligationsproduktes erfolgte dann die Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (siehe 2.2.1). Zur Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit ausschließlich Vektor-DNA (ohne *insert*) vorbereitet, der ebenfalls transformiert wurde.

2.2.10 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Basenabfolgen verwendet. Hierfür benötigt wurde eine thermostabile DNA-Polymerase, Ausgangs-DNA (*template*), Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), zwei geeignete Primer, Puffer und eine PCR-Maschine. In drei aufeinanderfolgenden, zu einem Zyklus zusammengefassten Reaktionsabläufen wurde erst die Ausgangs-DNA in Einzelstränge getrennt (Denaturierung), dann mit den im Überschuss vorhandenen Primern besetzt (*annealing*), die im letzten Schritt durch die Polymerase erweitert wurden (Elongation). In 30 Zyklen konnten auf diese Weise große Mengen der gleichen DNA gewonnen werden.

In dieser Arbeit wurde zur Analyse transformierter *E. coli*-Zellen die Methode der *colony*-PCR genutzt. Hierfür wurden einzelne Bakterienkolonien in separate PCR-Reaktionsgefäße mit 20 µl H₂O_{dd} gegeben. Zusätzlich wurde pro untersuchter Bakterienkolonie eine 2 ml LB-Flüssigkultur für eine Plasmid-DNA-Minipräparation angelegt (siehe 2.2.2). Nach einer Inkubation von 5 min bei 95°C wurde jedem PCR-Reaktionsgefäß folgender Ansatz hinzugefügt:

DreamTaq-Puffer	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
<i>forward</i> Primer (10 µM)	2,5 µl
<i>reverse</i> Primer (10 µM)	2,5 µl
dNTPs (jeweils 10 mM)	1 µl
Dream Taq (1 U/µl)	1 µl
H ₂ O _{dd}	<i>ad</i> 30 µl

Nach sorgfältigem Mischen der PCR-Reaktionsansätze wurde das im folgenden abgebildete PCR-Programm verwendet (Tabelle 14). Alle PCR-Reaktionen erfolgten im *peqStar 2X Twin Block Thermal Cycler*.

Tabelle 14: Darstellung des verwendeten PCR-Programms.

	Programmpunkt	Zeit	Temperatur	Zyklen
1)	Initiale Denaturierung	5 min	95°C	1
2.1)	Denaturierung	1 min	95°C	} 30
2.2)	<i>annealing</i>	1 min	60°C	
2.3)	Elongation	2 min/kb	72°C	
3)	Finale Elongation	10 min	72°C	1
4)	Kühlung	∞	4°C	1

Abschließend wurden die PCR-Produkte mit *Orange G Ladepuffer (6x)* versetzt und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (siehe 2.2.4)

2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der Basenabfolge von Plasmid-DNA erfolgte mittels Sequenzierung durch die Firma *Microsynth Seqlab* (Microsynth Seqlab, Göttingen, Deutschland). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 9 aufgelistet. Zur abschließenden Analyse wurden die Programme *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) und *Chromas Lite* (<https://chromas-lite.software.informer.com/2.1/>) verwendet.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium, high Glucose* (4,5 g/l) mit Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FCS), 60 mg/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin (DMEM^{+/+}) kultiviert. Die Inkubation erfolgte unter optimalen Wachstumsbedingungen von 37°C und 5% CO₂ in einem BINDER CO₂-Inkubator.

Adhärente Zellen (COS-7, Phoenix-Eco, U4C und CHO-K1) wurden in 10 cm Zellkulturschalen mit 10 ml DMEM^{+/+} kultiviert. Das Passagieren erfolgte zweimal pro Woche (COS-7 und Phoenix-Eco im Verhältnis 1:50, U4C im Verhältnis 1:10, CHO-K1 im Verhältnis 1:50). Hierbei wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA nach einer Inkubation von 5 min von der Platte gelöst. Im Falle der COS-7-Zellen erfolgte das Ablösen nach Inkubation bei 37°C, im Falle der Fibrosarkomzellen bei RT. Phoenix-Eco-Zellen

hingegen ließen sich bereits mit PBS von der Platte ablösen. Die Zellsuspensionen wurden jeweils zu 8 ml DMEM^{+/+} gegeben und auf neue Zellkulturschalen wie oben angegeben überführt. Bei U4C-Zellen erfolgte die Zugabe von 400 µg/ml G418.

Transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen mit 10 ml DMEM^{+/+} und 10 ng/ml Hyper-IL-6, gewonnen aus dem Zellkulturüberstand von stabilen HIL-6 sezernierenden CHO-K1-Zellen (Floss *et al.*, 2013), kultiviert. Die Zugabe von Hygromycin B (1 mg/ml) erfolgte bei den mit IL-12Rβ1 transduzierten Zellen bzw. von Puromycin bei den mit IL-23R transduzierten Zellen. Das Passagieren der Zellen erfolgte einmal wöchentlich im Verhältnis 1:10000.

2.3.2 Aussaat und Transfektion eukaryotischer Zellen

Am Tag vor der Transfektion wurden die benötigten Zellen in den angeführten Zellzahlen pro 10 cm Zellkulturschale mit 10 ml DMEM^{+/+} (COS-7, CHO-K1, U4C) bzw. pro *well* einer 6-*well*-Platte (Phoenix-Eco) mit 2 ml DMEM^{+/+} ausgesät:

COS-7-Zellen	1x10 ⁶ Zellen
CHO-K1	2x10 ⁶ Zellen
Phoenix-Eco-Zellen	8x10 ⁵ Zellen
U4C-Zellen	2x10 ⁶ Zellen

Am folgenden Tag erfolgte die Zugabe von 10 µl des Transfektionsreagenz *TurboFect*TM sowie 5 µg Plasmid-DNA in 1 ml Serum-freies Medium (DMEM^{-/-}). Für die Co-Transfektion wurden dem Serum-freien Medium (1 ml) 10 µl *TurboFect*TM und 2,5 µg DNA pro Plasmid zugesetzt. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde das Gemisch tropfenweise zu den Zellen einer 10 cm Schale gegeben und die Platte vorsichtig geschwenkt. Im Falle der Phoenix-Eco-Zellen wurde pro *well* einer 6-*well*-Platte 1 µg DNA mit 2 µl *TurboFect*TM in 200 µl DMEM^{-/-} benötigt. Die Zellen wurden für 6 h inkubiert, bevor das Medium abgenommen und durch frisches DMEM^{+/+} ersetzt wurde. Bei den Phoenix-Eco-Zellen wurde der Anteil des FCS auf 30% erhöht. Nach 48 h wurden Lysate transfizierter COS-7-, CHO-K1- und U4C-Zellen hergestellt (siehe 2.4.1), die Proteinkonzentration mittels BCA-Test bestimmt (siehe 2.4.2) und die Expression per Western Blot analysiert (siehe 2.4.3). Mit transfizierten Phoenix-Eco-Zellen hingegen wurde wie in 2.3.3 beschrieben weiter verfahren.

2.3.3 Retrovirale Transduktion von Ba/F3-Zellen

Phoenix-Eco-Zellen wurden als Helferzellen benutzt, um stabile Ba/F3-gp130-Zelllinien zu generieren. Bei Phoenix-Eco-Zellen handelt es sich um eine Verpackungszelllinie. Diese produziert nach Transfektion mit dem retroviralen Vektor pMOWS Viruspartikel, die RNA mit der Info für das zu exprimierende Protein enthalten. Die entsprechenden Viruspartikel infizieren Ba/F3-gp130-Zellen. Dort wird die RNA über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und in das Genom der Ba/F3-gp130-Zellen eingebaut.

Die Aussaat und Transfektion der Phoenix-Eco-Zellen erfolgte wie beschrieben (siehe 2.3.2). Nach Inkubation in DMEM^{+/+} mit 30% FCS über Nacht wurden Ba/F3-gp130-Zellen transduziert. Hierbei wurden die in 10 ml DMEM^{+/+} kultivierten Ba/F3-gp130-Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, pelletiert (5 min, 1000 rpm) und mit PBS gewaschen. Nach dem Bestimmen der Zellzahl mittels *TC20™ Automated Cell Counter* wurden 1×10^5 Ba/F3-gp130-Zellen mit 250 µl des Überstandes transfizierter Phoenix-Eco-Zellen und 800 µg/ml Polybrene in ein Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zentrifugation für 2 h bei 1800 rpm und 21°C wurden die Zellen in 5 ml DMEM^{+/+} und 10 ng/ml HIL-6 resuspendiert. Nach 48 h erfolgte die Zugabe des entsprechenden Selektionsantibiotikums (1 mg/ml Hygromycin B, 1,5 µg/ml Puromycin). Die auf diese Weise kultivierten Zellen konnten ab der dritten Woche mittels Durchflusszytometrie (siehe 2.3.4), Proliferationsassay (siehe 2.3.5) und Stimulationsassay (siehe 2.3.6) analysiert werden.

2.3.4 Durchflusszytometrie

Die Expression von Rezeptorproteinen auf der Zelloberfläche von Ba/F3-gp130-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierfür wurden 500.000 Ba/F3-gp130-Zellen pelletiert (4°C, 5 min, 2000 rpm), in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert, erneut pelletiert und in 100 µl FACS-Puffer mit dem entsprechendem Primärantikörper erneut resuspendiert. Auf Inkubation von 2 h auf Eis folgte ein weiterer Waschschriff mit FACS-Puffer, bevor die Zellen mit 100 µl FACS-Puffer und dem entsprechendem Sekundärantikörper versetzt und erneut inkubiert wurden (4°C, 1 h, lichtgeschützt). Erfolgte eine Detektion des humanen oder murinen IL-12Rβ1 wurde auf letztgenannten Schritt verzichtet, da in diesem Fall kein Sekundärantikörper benötigt wurde. Nach einem finalen Waschgang mit FACS-Puffer und Resuspension in 500 µl FACS-

Puffer, wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und mittels *BD FACSCanto™ II* analysiert. Die Auswertung erfolgt unter Verwendung des Programms *FCS Express*.

2.3.5 Proliferationsassay

Das zytokinabhängige Wachstum transduzierter Ba/F3-gp130-Zellen wurde über die Messung der von lebenden Zellen mittels *CellTiter-Blue®* Reagenz induzierten Fluoreszenz bei 590 nm mit dem *Tecan infinite M200 PRO Reader* bestimmt. *CellTiter-Blue®* Reagenz besteht aus dem blauen Farbstoff Resazurin mit geringer Eigenfluoreszenz. Metabolisch aktive Zellen reduzieren Resazurin irreversibel zu dem pinkfarbenen, stark fluoreszenten Farbstoff Resorufin. Die Menge an Resorufin (die gemessene Fluoreszenzintensität) ist daher proportional zur Anzahl der lebenden Zellen (<https://www.promega.de/resources/protocols/technical-bulletins/101/celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol/>).

Ba/F3-gp130-Zellen wurden von einer 10 cm Kulturschale in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei RT für 5 min zentrifugiert (1500 rpm). Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen mehrfach mit 10 ml PBS gewaschen und pelletiert (RT, 5 min, 1500 rpm), in 10 ml DMEM⁺⁺ resuspendiert und gezählt. Jeweils 5000 Zellen der Zellsuspension wurden in ein *well* einer 96-*well*-Platte überführt. Jede Zelllinie wurde in drei Varianten kultiviert: Der ersten Variante wurde kein Zytokin gegeben (Negativkontrolle), der zweiten 0,2% HIL-6 (10 ng/ml) (Positivkontrolle) und der dritten 0,2% HIL-23 (10 ng/ml). Vor Inkubation der Ba/F3-gp130-Zellen (37°C, 5% CO₂) wurden die *wells* am Mikroskop auf das Vorhandensein der Zellen überprüft. Nach 72 h folgte die Auswertung mithilfe des *CellTiter-Blue®* Reagenz und des *Tecan infinite M200 PRO Reader*. Unmittelbar nach Zugabe von 20 µl der *CellTiter-Blue®* Lösung wurde die Fluoreszenz zum Zeitpunkt 0 gemessen. Es folgten weitere Messungen im Abstand von 20 min bis 120 min.

2.3.6 Stimulationsassay

Sowohl transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen als auch co-transfizierte, adhärenente U4C-Zellen wurden bezüglich der IL-23-abhängigen Aktivierung von STAT3 untersucht.

Stimulationsassay von Ba/F3-gp130-Zellen

Zu Beginn durchliefen transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen drei Waschschrte mit PBS: Ba/F3-gp130-Zellen wurden von der 10 cm Zellkulturschale in ein 15 ml *Falcon™* überführt und

zentrifugiert (RT, 5 min, 1500 rpm). Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 10 ml PBS resuspendiert. Im Anschluss an den letzten Waschgang wurde erneut zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen in 4,5 ml DMEM^{-/-} resuspendiert. Pro Variante wurden 2 ml der Zellsuspension in die Vertiefung einer 6-well-Platte gegeben und für 4-6 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (*starving* der Zellen). Nach Stimulation mit 0,2% HIL-23 und Inkubation für 30 min wurden die Ba/F3-gp130-Zellen in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, pelletiert (RT, 5 min, 1500 rpm), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Lyse der Zellen erfolgte mit 150-200 µl *lysis buffer* pSTAT3 (siehe 2.4.1) und die Proteinkonzentrationsbestimmung der Lysate mithilfe des BCA-Tests (siehe 2.4.2). Die STAT3-Phosphorylierung wurde mittels Western Blot analysiert (siehe 2.4.3).

Stimulationsassay von adhärennten Zellen

2x10⁶ U4C-Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen ausgesät und wie unter 2.3.2 beschrieben transfiziert. Für die Co-Transfektion wurde pro Plasmid 2,5 µg DNA eingesetzt. Ca. 32 h nach Transfektion erfolgte das *starving* der Zellen in DMEM^{-/-} über Nacht (16 h), bevor die mit 0,2% HIL-23 versetzten Schalen für 30 min inkubiert wurden. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 1 ml PBS von der Platte geschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt, pelletiert (4°C, 5 min, 14000 rpm) und in *lysis buffer* pSTAT3 lysiert (siehe 2.4.1).

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Um die Zellen auf proteinbiochemischer Ebene zu analysieren (Western Blot), wurden Zelllysate hergestellt und mit Lämmli-Puffer (5x) versetzt.

Adhärennte Zellen wurden vom Medium befreit, mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS unter Verwendung eines Zellschabers von der Platte gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (4°C, 5 min, 14000 rpm) wurde der Überstand abgenommen, so dass nur das Zellpellet übrigblieb, das in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Gegebenenfalls erfolgte vor der eigentlichen Lyse (s.u.) eine Lagerung bei -80°C.

Die Lyse wurde für alle Zellen nach dem gleichen Prinzip durchgeführt: Nach Resuspension der Zellpellets in 150-200 µl *lysis buffer* pSTAT3 und Inkubation unter kontinuierlicher Bewegung (4°C, 2 h) wurde zentrifugiert (4°C, 20 min, 14000 rpm) und der

erhaltene Überstand in ein frisches, gekühltes Reaktionsgefäß gegeben. Die Lysate wurden bezüglich ihrer Proteinkonzentration untersucht (siehe 2.4.2), mit Lämmli-Puffer (5x) versetzt und für 10 min bei 95°C inkubiert. Anschließend konnten die Proben per Western Blot analysiert werden (siehe 2.4.3).

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Mithilfe des *Pierce*[®] *BCA Protein Assay Kits* wurde die Proteinkonzentration von Zelllysaten nach Protokoll des Herstellers ermittelt. Hierfür wurden in zweifacher Ausführung je 25 µl von BCA-Lösungen aufsteigender Konzentration (0-3000 µg/ml) und 25 µl von mit H₂O_{dd} verdünnten Zelllysaten (1:20) in die *wells* einer *96-well*-Platte gegeben. Anschließend wurde das Arbeitsreagenz hinzugefügt und die Platte für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch die Bindung von zweiwertigen Kupferionen an die Peptidbindung werden diese zu einwertigen Kupferionen reduziert. Einwertige Kupferionen bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex, dessen Absorption bei 562 nm mithilfe des *Tecan infinite M200 PRO Reader* bestimmt wurde. Die Extinktionswerte der BCA-Lösungen dienten dem Erstellen einer Eichgeraden mit deren Hilfe der Proteingehalt der Lysate berechnet wurde (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23227#/23227>).

2.4.3 Western Blot

Für die Detektion bestimmter Proteine mittels Western Blot mussten diese zunächst nach ihrem Molekulargewicht mithilfe einer diskontinuierlichen *sodium dodecyl sulfat polyacrylamid gel electrophoresis* (SDS-PAGE) getrennt werden. 10% SDS-Polyacrylamidgele einer Dicke von 1,5 mm mit 10 bzw. 15 Kammern, bestehend aus einer größeren Trenngelschicht und einer kleineren Sammelgelschicht, wurden nach folgendem Protokoll hergestellt:

Komponente	Trenngel	Sammelgel
H ₂ O	4,0 ml	2,28 ml
Acrylamid 30%	3,3 ml	0,67 ml
Puffer	2,6 ml	1,0 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml
APS	0,100 ml	0,04 ml

Die zu analysierenden Proben sowie der Proteingrößenstandard *PageRuler*[™] *Prestained Protein Ladder* wurden in die Kammern der ausgehärteten SDS-PAA-Gele gegeben und

mithilfe des *MiniPROTEAN*[®] *Tetra Systems* in SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 95 V innerhalb von ca. 2 h voneinander getrennt. Für das *immunoblotting* wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert, um im weiteren Verlauf mithilfe von spezifischen Antikörpern und des *INTAS ChemoCam Imager* detektiert werden zu können. Sowohl die Membran als auch das *Whatman*[™] Papier wurden auf die Größe des SDS-PAA-Gels zugeschnitten. Nach Aktivierung der Membran in Methanol (2 min) wurde diese in Transferpuffer gewaschen. Vier Lagen *Whatman*[™] Papier (getränkt in Transferpuffer), gefolgt von der PVDF-Transfermembran, dem SDS-PAA-Gel und vier weiteren Lagen *Whatman*[™] Papier (von unten nach oben) wurden als Stapel luftblasenfrei in die Transferschale des *Trans-Blot*[®] *Turbo*[™] *Blotting Systems* gelegt. Der Transfer erfolgte innerhalb von 60 min bei konstant 20 V. Anschließend wurde die Membran in 15 ml 5% Magermilchpulver in TBS mit 0,5% *Tween*[®] 20 für 2-3 h inkubiert, um freie Proteinbindestellen auf der Membran zu blockieren. Der entsprechende Primärantikörper wurde in 5% Magermilchpulverlösung oder 5% BSA in TBS-T verdünnt, auf die Membran gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. War der Antikörper in BSA-Lösung verdünnt, wurde die Membran zuvor dreimalig mit TBS-T gewaschen. Nach Inkubation erfolgten drei weitere Waschgänge mit TBS-T. Parallel wurde der Sekundärantikörper gelöst (HRP-konjugierte Immunglobuline 1:5000 in 5% Magermilchpulverlösung, Streptavidin-POD 1:200 in 5% BSA-Lösung) und die Membran zusammen mit dem entsprechendem Sekundärantikörper für 2 h oder im Falle von Streptavidin-POD für 1 h bei RT inkubiert. Nach zwei Waschgängen mit TBS-T und einem finalen Waschgang mit TBS erfolgte die Zugabe von *Amersham*[™] *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* und die Auswertung mit dem *INTAS ChemoCam Imager*. Für einen weiteren Proteinnachweis wurden die Membranen in *stripping buffer* mit 0,1% β -Mercaptoethanol inkubiert (60°C, 30 min), 3x mit TBS-T gewaschen und für 2-3 h mit 15 ml 5% Magermilchpulverlösung geblockt, bevor ein neuer Primärantikörper hinzugegeben wurde.

2.4.4 Co-Immunopräzipitation (Nanotrap)

Um die Dimerisierung von Rezeptorproteinen zu untersuchen, wurde eine Co-Immunopräzipitation unter Verwendung von Agarose und einem daran gebundenen GFP-Nanobody durchgeführt (Franke *et al.*, 2016). Hierfür wurden CHO-K1-Zellen mit den Vektoren für beide Rezeptorproteine co-transfiziert. Ein Rezeptor war C-terminal fusioniert mit GFP und der andere Rezeptor besaß einen N-terminalen FLAG-tag. Infolgedessen wurden auf

diese Weise direkt Rezeptoren mit C-terminalem GFP-*tag* an der Agarose immobilisiert, gleichzeitig interagierende Rezeptoren mit N-terminalem FLAG-*tag* ebenso (siehe Abb. 5). Die Auswertung erfolgte über die Detektion der FLAG-markierten Rezeptoren mittels Western Blot (siehe 2.4.3).

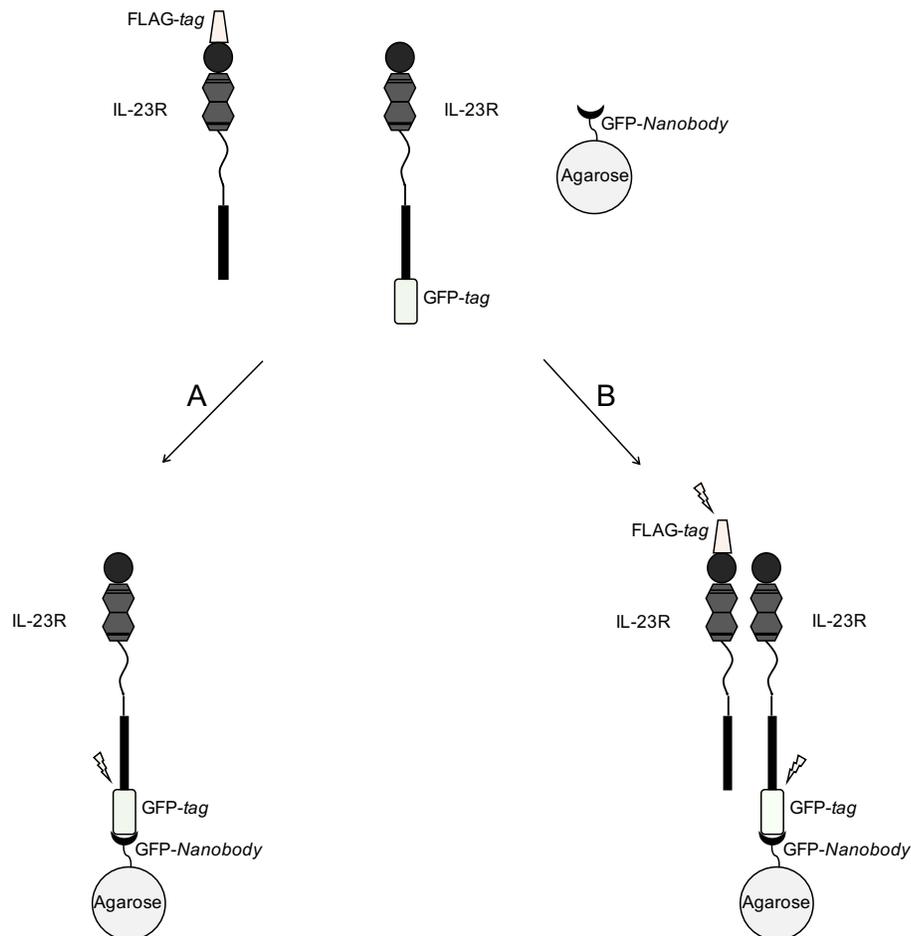


Abb. 5: Prinzip der Co-Immunopräzipitation unter Verwendung von Agarose beads mit GFP-bindenden Proteinen. Die durch Lyse co-transfizierter CHO-K1-Zellen erhaltenen Proteine sind hier beispielhaft als IL-23-Wildtyprezeptor dargestellt und lagen für die weitere Untersuchung mit N-terminalem FLAG-*tag* oder C-terminalen GFP-*tag* vor. Proteine mit GFP-*tag* wurden durch an Agarose gekoppelte GFP-Nanobodies (Franke *et al.*, 2016) nach gemeinsamer Inkubation (2 h, RT) gebunden (A). War zudem eine Interaktion zwischen den zu untersuchenden Proteinen erfolgt, wurden hierbei ebenfalls Proteine mit FLAG-*tag* immobilisiert (B). Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen mit Nanotrap *dilution buffer* entfernt und die verbliebene Agarose inklusive gekoppelter Proteine in Lämmli-Puffer (5x) 10 min bei 95°C inkubiert.

Co-transfizierte CHO-K1-Zellen wurden gewaschen, pelletiert, in 200 μ l Nanotrap *lysis buffer* resuspendiert, schüttelnd inkubiert (4°C, 2 h) und zentrifugiert (4°C, 15 min, 20000 g) (siehe 2.4.1). Das Zelllysate wurde als Überstand abgenommen und mit Nanotrap *dilution buffer* auf ein Gesamtvolumen von 500 μ l ergänzt. Ein Aliquot des Zelllysates wurde mit Lämmli-Puffer (5x) versetzt, 10 min bei 95°C inkubiert und als Kontrolle im Western Blot verwendet. Parallel erfolgten drei Waschgänge von der Agarose mit GFP-bindenden Proteinen (Franke *et al.*, 2016) mit jeweils 500 μ l eiskaltem Nanotrap *dilution buffer*. Hierbei wurde die gekoppelte NHS-Agarose zentrifugiert (4°C, 2 min, 2700 g) und der Überstand entfernt, bevor sich ein weiterer Waschgang anschloss. Pro Variante wurden 50 μ l gekoppelte Agarose eingesetzt. Die vorbereitete Agarose wurde mit dem entsprechendem Zelllysate versetzt und über Nacht bei 4°C in einem Rotator inkubiert. Anschließend wurde die Agarose zentrifugiert (4°C, 2 min, 2700 g). Das vom Überstand befreite Pellet wurde dreimal mit 200 μ l eiskaltem Nanotrap *dilution buffer* gewaschen, das Agarose-Pellet mit 50 μ l Lämmli-Puffer (5x) versetzt und 10 min bei 95°C inkubiert. Schließlich folgte eine Analyse mittels Western Blot unter Verwendung der Antikörper α -FLAG und α -GFP (siehe 2.4.3).

3 Ergebnisse

Ausgangspunkt dieser Dissertation waren die Ergebnisse der Masterarbeit von Gregor Ciupka (Ciupka, 2014) und der Dissertation von Theresa Ackfeld (Ackfeld, 2020). Aufbauend auf den Daten dieser Arbeiten wurden weitere IL-23R-Varianten erzeugt und analysiert.

3.1 Analyse der IL-23R-*stalk*-Region

	D3	<u>WQPWS-Duplikation</u>	<i>stalk</i>	TM
hIL-23R	...VRCQETGKRY WQPWS PFHKT	-----	ETVPQVTSKAFQHDWNSGLTVASISTGHLTSDNRGD	IGLLGMIVFAVMSILS...
mIL-23R	...VRCQETGKR WQPWS PFVHQTS	<u>QETGKRWQPWSPFVHQTS</u>	QTVSQVTAKSS-HEPQKMEMLSATIFRGHPASGNHQD	IGLLSGMVFLAIMLPIFS...
	***** * * * * *		** * * * *	* * * * * * * * * * *

Abb. 6: Vergleich der Aminosäuresequenzen des humanen und des murinen IL-23R. Der IL-23R besteht aus drei extrazellulären Domänen (D1, D2, D3), der *stalk*-Region (*stalk*), der Transmembrandomäne (TM) und der intrazellulären Domäne. Der mIL-23R besitzt zusätzlich eine 20 AS Duplikation von Domäne D3 (WQPWS-Duplikation). Abgebildet sind Ausschnitte der hIL-23R- und mIL-23R-Aminosäuresequenzen. Die Domäne D3 wird in schwarzen, die *stalk*-Region in roten und die Transmembrandomäne in grauen Buchstaben dargestellt. Die WQPWS-Duplikation ist unterstrichen, das WQPWS-Motiv in Domäne D3 und der WQPWS-Duplikation fett hervorgehoben. Mit Stern markiert sind identische Aminosäuren des humanen und murinen IL-23R. Bereiche in denen korrespondierende Aminosäuren fehlen sind mit Strichen veranschaulicht.

Der IL-23R wird aus drei extrazellulären Domänen (D1, D2, D3), der *stalk*-Region, sowie der Transmembrandomäne (TM) und der intrazellulären Domäne gebildet. Die Domänen D2 und D3 folgen der N-terminal gelegenen Ig-Domäne D1 und werden als zytokinbindende Domänen zusammengefasst (siehe 1.3). Die Rolle der angrenzenden *stalk*-Region war lange Zeit unklar und wurde in der AG Scheller im Rahmen der Masterarbeit von Gregor Ciupka und der Dissertation von Theresa Ackfeld untersucht (Ciupka, 2014, Ackfeld, 2020). Anknüpfend an die erhobenen Daten diente diese Dissertation vorwiegend der genaueren Charakterisierung der *stalk*-Region.

Im Gegensatz zur humanen IL-23R (hIL-23R)-*stalk*-Region weist der murine IL-23R (mIL-23R) zusätzlich eine 20 AS lange Duplikation (WQPWS-Duplikation) auf, von der nicht klar ist, ob sie der Domäne D3 oder der *stalk*-Region zuzuordnen ist (siehe 1.3). Der Bereich,

der diese WQPWS-Duplikation und zusätzlich die *stalk*-Region umfasst, wird im Folgenden als „erweiterte“ mIL-23R-*stalk*-Region bezeichnet.

In Abb. 6 sind Ausschnitte der Aminosäuresequenz des hIL-23R und mIL-23R schematisch dargestellt. Die Domäne D3 des hIL-23R endet mit P316 und die Domäne D3 des mIL-23R mit S316. Die jeweiligen *stalk*-Regionen umfassen den 37 AS langen Bereich von E317 bis D353 (hIL-23R) bzw. 36 oder 56 AS zwischen Q337 und D372 (mIL-23R) oder Q317 und D372 (mIL-23R mit „erweiterter“ *stalk*-Region). An die *stalk*-Regionen grenzen die Transmembrandomänen, beginnend mit I354 (hIL-23R) oder I373 (mIL-23R), deren AS Sequenz in Abb. 6 nicht vollständig aufgeführt wird (Hummel *et al.*, 2017). Aminosäuren, die an entsprechender Stelle im humanen und murinen Rezeptor identisch vorkommen, sind mit Stern markiert. Beide Rezeptoren besitzen weiterhin in Domäne D3 sowie in der 20 AS WQPWS-Duplikation der „erweiterten“ *stalk*-Region des mIL-23R das WQPWS-Motiv, das dem *cytokine receptor signature motif* WSXWS ähnelt und zur Proteinfaltung und Rezeptoraktivierung beitragen könnte (Bazan, 1990, Jones & Vignali, 2011, Dagil *et al.*, 2012).

3.2 Deletionen der *stalk*-Region des murinen und humanen IL-23R induzieren eine ligandenunabhängige Rezeptoraktivierung

3.2.1 Generierung von Deletionsvarianten des humanen IL-23R

Um die *stalk*-Region des humanen IL-23R genauer zu untersuchen, wurden ausgehend vom Wildtyp (WT) *stalk*-Deletionsvarianten kloniert und bezüglich ihrer Expression in transient transfizierten COS-7-Zellen untersucht.

Vier Deletionsvarianten des hIL-23R wurden bereits im Rahmen der Dissertation von Theresa Ackfeld analysiert. Hierbei handelte es sich um Rezeptoren, deren *stalk*-Regionen systematisch gekürzt wurden: Ausgehend von der Transmembrandomäne wurden schrittweise 10 AS (Δ 344-353), 20 AS (Δ 334-353), 31 AS (Δ 323-353), 41 AS (Δ 313-353) der *stalk*-Region inklusive der AS D353 deletiert (Ackfeld, 2020). Auf diese Weise wurde die *stalk*-Region des IL-23R bei der letztgenannten Variante Δ 313-353 vollständig entfernt. Jedoch wurden gleichzeitig vier C-terminale AS der Domäne D3 (H313, K314, T315, P316) deletiert. Die Eigenschaften dieser Variante (siehe 3.2.2) konnten daher nicht eindeutig dem Fehlen der *stalk*-Region zugeordnet werden. Sie hätten sich ebenfalls durch vier fehlende AS der Domäne D3 erklären lassen können.

Zur Vervollständigung der Rezeptorvarianten wurden daher im Rahmen dieser Dissertation zwei weitere Rezeptorvarianten (Δ 313-318; 323-353 und Δ 319-353) kloniert, exprimiert und analysiert (siehe Abb. 7). Verglichen mit Δ 313-353 fehlten der Variante Δ 313-318; 323-353 ebenfalls die AS H313-P316 (Domäne D3) sowie die AS E317, T318 (*stalk*-Region), während hingegen die AS V319-V322 (*stalk*-Region) vorhanden waren. Eine weitere Variante Δ 319-353 zeichnete sich durch eine ausgenommen von 2 AS (E317, T318) vollständig entfernte *stalk*-Region aus.

Abb. 7 zeigt die Aminosäuresequenz des hIL-23R (WT) verglichen mit den beschriebenen Deletionsvarianten. Die im Rahmen dieser Arbeit neu beschriebenen Varianten (Δ 313-318; 323-353 und Δ 319-353) wurden mit Stern markiert. Die *stalk*-Regionen sind jeweils in Rot dargestellt.

	D3 218-316	<i>stalk</i> 317-353	TM 354-376
WT	...VRCQETGKRY WQPWS SPFFHKTP	ETVPQVTSKAFQ HD TWN SGLTVASISTGHLTSDNRGD	IGLLLGMI VFAV MLSI LS ...
Δ 344-353	...VRCQETGKRY WQPWS SPFFHKTP	ETVPQVTSKAFQ HD TWN SGLTVASIST	-----IGLLLGMI VFAV MLSI LS ...
Δ 334-353	...VRCQETGKRY WQPWS SPFFHKTP	ETVPQVTSKAFQ HD TWN -----	-----IGLLLGMI VFAV MLSI LS ...
Δ 323-353	...VRCQETGKRY WQPWS SPFFHKTP	ETVPQV -----	-----IGLLLGMI VFAV MLSI LS ...
Δ 313-353	...VRCQETGKRY WQPWS SPFF-----	-----	-----IGLLLGMI VFAV MLSI LS ...
* Δ 313-318; 323-353	...VRCQETGKRY WQPWS SPFF-----	VPQV -----	-----IGLLLGMI VFAV MLSI LS ...
* Δ 319-353	...VRCQETGKRY WQPWS SPFFHKTP	ET -----	-----IGLLLGMI VFAV MLSI LS ...

Abb. 7: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenzen des humanen IL-23R (WT) sowie der hIL-23R-Deletionsvarianten. Der Bereich von V294-S371 der humanen IL-23R-Varianten werden hier der Aminosäuresequenz des Wildtyps (WT) gegenübergestellt. Domäne D3 wird in schwarzen, die *stalk*-Region (*stalk*) in roten und die Transmembrandomäne (TM) in grauen Buchstaben dargestellt. Das WQPWS-Motiv in Domäne D3 ist fett hervorgehoben. Mit Stern markiert sind die im Rahmen dieser Dissertation neu generierten Deletionsvarianten Δ 313-318; 323-353 und Δ 319-353. Bereiche, in denen Aminosäuren entfernt wurden, sind mit Strichen veranschaulicht.

Die hIL-23R-Varianten Δ 344-353, Δ 334-353, Δ 323-353 und Δ 313-353 lagen bereits in dem eukaryotischen Expressionsvektor p409 in der AG Scheller vor (Ackfeld, 2020). Die Varianten Δ 313-318; 323-353 und Δ 319-353 mussten hingegen erst aus pcDNA3.1 in den genannten Expressionsvektor p409 subkloniert werden (Siehe Abb. 8).

Hierfür wurden die Vektoren p409-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 und Δ 319-353 (AG Scheller) mit PmeI geschnitten (siehe 2.2.5) und die *inserts* der Größe 1944 bp (hIL-23R Δ 313-318; 323-353) bzw. 1950 bp (hIL-23R Δ 319-353) per Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.4) und Gelextraktion (siehe 2.2.6) isoliert. Die Restriktion des Vektors p409 erfolgte ebenfalls mit PmeI. Die dabei entstandenen 5'Enden wurden dephosphoryliert (siehe 2.2.7), das Fragment von 7711 bp per Agarosegelelektrophorese getrennt und mittels *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* gereinigt. Vektor und *insert*-DNA wurden ligiert (siehe 2.2.9) und in chemisch kompetente *E. coli XL1 blue* transformiert (siehe 2.2.1) (siehe Abb. 8).

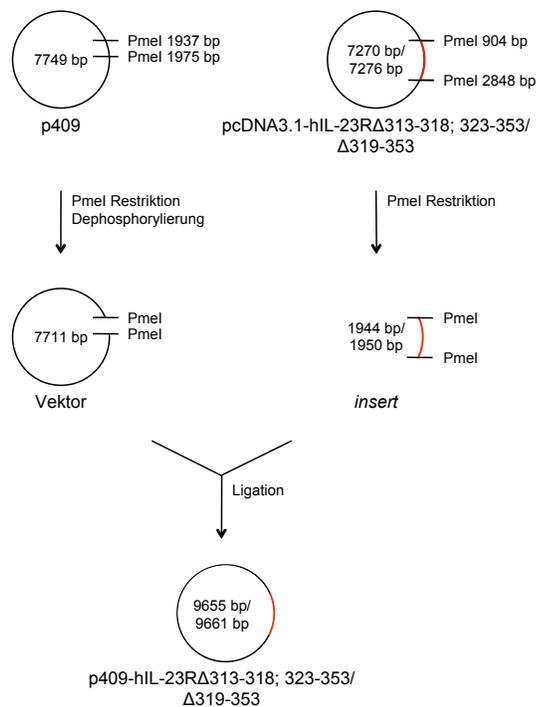


Abb. 8: Klonierungen der humanen Deletionsvarianten p409-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 und p409-hIL-23R Δ 319-353. Der Vektor p409 wurde mit PmeI geschnitten, dephosphoryliert und mit den ebenfalls mit PmeI geschnittenen *inserts* hIL-23R Δ 313-318; 323-353 bzw. hIL-23R Δ 319-353 aus pcDNA3.1-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 bzw. pcDNA3.1-hIL-23R Δ 319-353 ligiert. Dies resultierte in den Plasmiden p409-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 und p409-hIL-23R Δ 319-353. Die Ligationsprodukte wurden in chemische kompetente *E. coli* transformiert. In Rot dargestellt sind die *inserts*. Restriktionsschnittstellen sind als schwarze Linien gezeichnet. Fragmentgrößen (bp) von *inserts*, Vektoren sowie die Schnittstellen der genutzten Restriktionsenzyme sind markiert.

Zur Analyse transformierter *E. coli*-Zellen wurde die Methode der *colony*-PCR genutzt (siehe 2.2.10). Hierfür wurden einzelne Bakterienkolonien in separate PCR-Reaktionsgefäße mit

entsprechenden PCR-Ansätzen gegeben. Weiterhin wurde ein separates PCR-Reaktionsgefäß ausschließlich mit H₂O_{dd} (H) und ein weiteres PCR-Reaktionsgefäß mit einer Bakterienkolonie von der Kontrollplatte befüllt (K). Die Produkte der PCR wurden mittels Agarosegelelektrophorese untersucht (siehe 2.2.4). Die Proben „H“ und „K“ dienen jeweils als Negativkontrolle. Abb. 9 zeigt beispielhaft die Analyse einer *colony*-PCR von *E. coli*-Zellen, die mit dem Ligationsprodukt aus p409 und der Variante hIL-23RΔ313-318; 323-353 transformiert wurden. Von 8 überprüften Kolonien (1-8) zeigten Kolonie „1“, „6“, und „7“ DNA-Fragmente, die ungefähr der Größe von 1568 bp entsprachen (siehe Abb. 9). Die Größe des DNA-Fragmentes errechnete sich aus dem Abstand zwischen den verwendeten Primern. Auf diese Weise wurden putative Klone identifiziert.

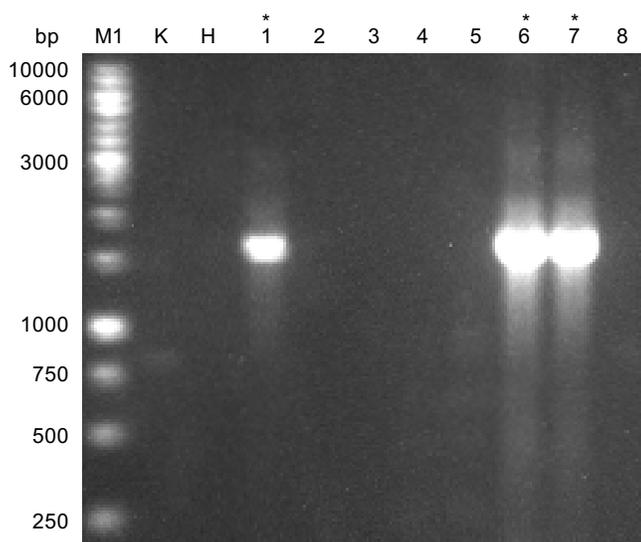


Abb. 9: Analyse chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen mittels *colony*-PCR. Transformierte *E. coli*-Zellen (1-8) wurden mit entsprechenden PCR-Ansätzen versehen und mittels *peqStar 2X Twin Block Thermal Cycler* sowie des entsprechenden PCR-Programms vervielfältigt, gelelektrophoretisch voneinander getrennt und visualisiert. Als Kontrollen wurde H₂O_{dd} (H) sowie ein Klon der Kontrollplatte (K) analysiert. Fragmentgröße (bp): p409-hIL-23RΔ313-318; 323-352 (1568 bp). DNA-Größenstandard: *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* (M1).

Anschließend wurde die Plasmid-DNA positiver Klone per Plasmid-DNA-Minipräparation isoliert (siehe 2.2.2) und mittels Restriktionsspaltung (EcoRI) überprüft (siehe 2.2.5). Danach folgte die Plasmid-DNA-Midipräparation ausgewählter positiver Klone (siehe 2.2.2) und die Kontrolle der Plasmid-DNA durch Restriktion mit EcoRI (siehe 2.2.5) sowie gelelektrophoretischer Trennung der erhaltenen DNA-Fragmente (siehe 2.2.4).

In Abb. 10 wird dies für die Vektoren p409-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 und p409-hIL-23R Δ 319-353 gezeigt. Neben den gespaltenen sind ebenfalls die nicht gespaltenen Plasmide abgebildet. Zum Vergleich wurde zusätzlich der nicht restringierte sowie der mit EcoRI geschnittene hIL-23R (WT) analysiert. Die jeweiligen Fragmentgrößen wurden aus den unterschiedlichen Abständen zwischen den EcoRI-Schnittstellen errechnet. Diese betragen 402 bp, 659 bp, 1008 bp, 2436 bp, 5150 bp (p409-hIL-23R Δ 313-318; 323-353), 402 bp, 665 bp, 1008 bp, 2436 bp, 5150 bp (p409-hIL-23R Δ 319-353) sowie 155 bp, 402 bp, 615 bp, 1008 bp, 2436 bp, 5150 bp (p409-hIL-23R). Abb. 10 zeigt die Übereinstimmung zwischen den errechneten und den gelelektrophoretisch bestimmten Fragmentgrößen.

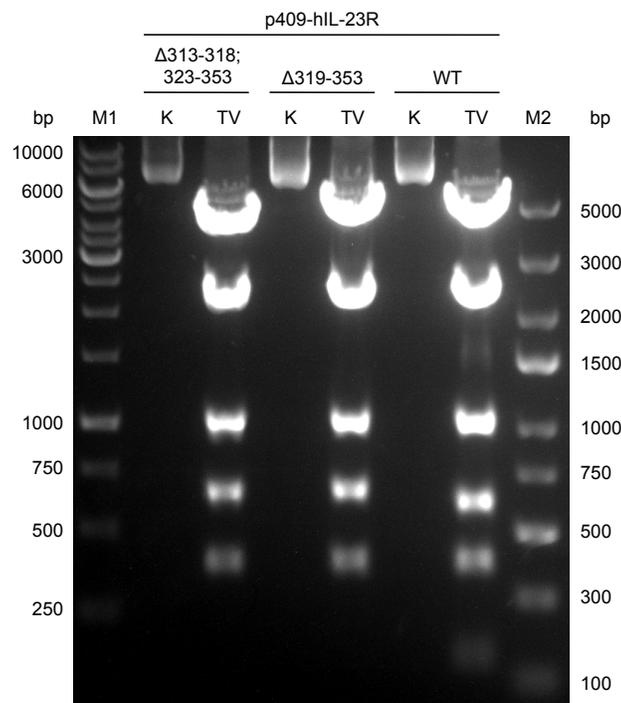


Abb. 10: Klonierung der Expressionsvektoren p409-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 und Δ 319-353. Die aus pcDNA3.1 in den Expressionsvektor p409 klonierten Deletionsvarianten des humanen IL-23R sowie der bereits in p409 vorliegende hIL-23R (WT) wurden mit EcoRI geschnitten (TV), mittels Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt und visualisiert. Zur Kontrolle wurde nicht gespaltene Plasmid-DNA aufgetragen (K). Fragmentgrößen (bp): p409-hIL-23R Δ 313-318; 323-352 (402 + 659 + 1008 + 2436 + 5150 bp); p409-hIL-23R Δ 319-353 (402 + 665 + 1008 + 2436 + 5150 bp); p409-hIL-23R (155 + 402 + 615 + 1008 + 2436 + 5150 bp). DNA-Größenstandard: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (M1), GeneRuler™ Express DNA Ladder (M2).

Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten p409-Vektoren für die humanen IL-23R-Varianten sowie die bereits in der AG Scheller vorliegenden Deletionsvarianten (Ackfeld, 2020) wurden hinsichtlich der Expression in COS-7-Zellen geprüft. Ziel war es, die Expression der verschiedenen Rezeptorvarianten in eukaryotischen Zellen zu bestätigen.

In Abb. 11 ist die Expression des hIL-23R (WT) (Franke *et al.*, 2016, Ackfeld, 2020) und der im Rahmen der Arbeit klonierten hIL-23R-Deletionsvarianten (p409-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 und p409-hIL-23R Δ 319-353) in COS-7-Zellen dargestellt. Zusätzlich wurden die bereits vorhandenen Vektoren für die Varianten (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) (Ackfeld, 2020) analysiert. Die Zellen wurden zuvor mit entsprechender DNA transfiziert (siehe 2.3.2), nach 48 h lysiert (siehe 2.4.1), mit Lämmli-Puffer (5x) verdünnt und ca. 10-20 μ l der Proben in die Taschen eines SDS-PAA-Gels für die Analyse per Western Blot geladen (siehe 2.4.3). Als Negativkontrolle wurde das Lysat von COS-7-Zellen, die mit dem Plasmid pEGFP-N1 (pEGFP) transfiziert wurden, aufgetragen. Als Antikörper zur Detektion der Proteine wurde ein biotinylierter Antikörper gegen hIL-23R verwendet. Mit Ausnahme von pEGFP zeigte sich bei allen Varianten eine deutliche Bande, die die entsprechende Rezeptorvariante repräsentiert (siehe Abb. 11).

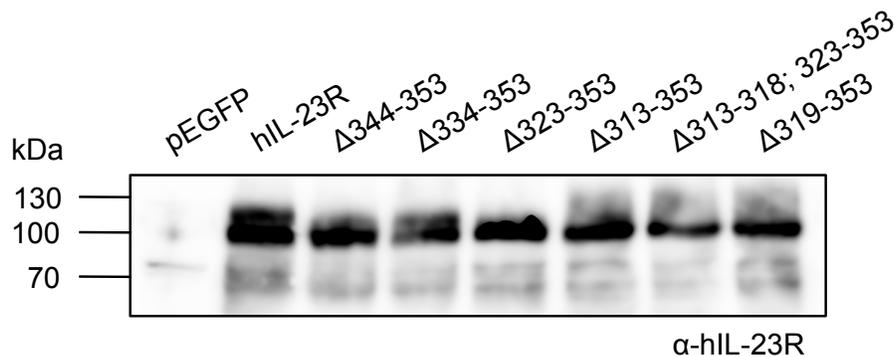


Abb. 11: Expression der Deletionsvarianten des humanen IL-23R in transient transfizierten COS-7-Zellen.

COS-7-Zellen wurden mit den Vektoren für den humanen IL-23R, die hIL-23R-Deletionsvarianten, sowie den Kontrollvektor pEGFP transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Lyse der Zellen und die Analyse der Proben mittels Western Blot. Für die Detektion wurde der Primärantikörper α -hIL-23R (biotinyliert) benutzt. Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Wiedergabe der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von American Society for Microbiology (Hummel *et al.*, 2017), http://journals.asm.org/site/misc/ASM_Author_Statement.xhtml.

3.2.2 Humane IL-23-Rezeptoren ohne stalk-Region zeigen eine ligandenunabhängige Aktivierung

Um die biologische Aktivität des IL-23R sowie der Deletionsvarianten mittels Ba/F3-gp130-Zellen überprüfen zu können (s.u.), mussten die Rezeptorvarianten im retroviralen Vektor pMOWS vorliegen.

In der AG Scheller wurden bereits die Varianten hIL-23R Δ 344-353, hIL-23R Δ 334-353, hIL-23R Δ 323-353 und hIL-23R Δ 313-353 sowie der hIL-12R β 1 in pMOWS-Vektoren kloniert (Franke *et al.*, 2016, Ackfeld, 2020). Zusätzlich erfolgte im Rahmen dieser Dissertation die Klonierung der Vektoren pMOWS-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 und pMOWS-hIL-23R Δ 319-353 (Siehe Abb. 12).

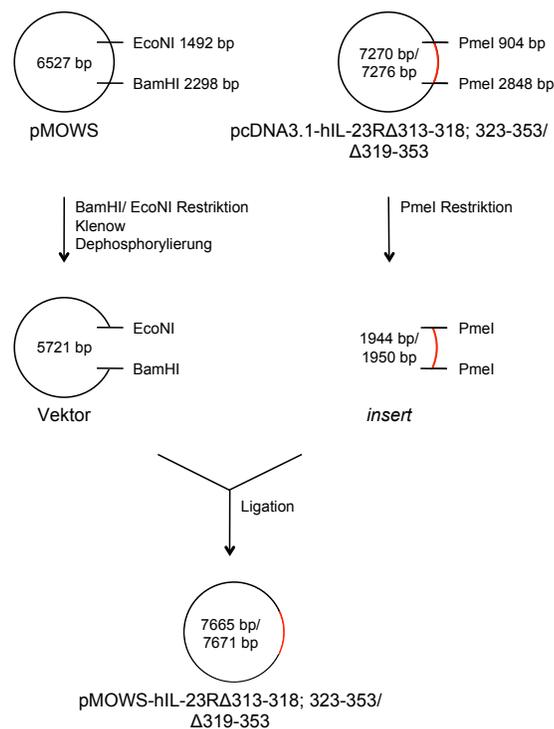


Abb. 12: Klonierungen der humanen Deletionsvarianten pMOWS-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 und pMOWS-hIL-23R Δ 319-353. Der Vektor pMOWS-puro-GFP (pMOWS) wurde mit BamHI/EcoNI geschnitten, die Enden mit Klenow-Fragment geglättet, dephosphoryliert und mit den mit PmeI geschnittenen *inserts* hIL-23R Δ 313-318; 323-353 bzw. hIL-23R Δ 319-353 aus pcDNA3.1-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 bzw. pcDNA3.1-hIL-23R Δ 319-353 ligiert. Dies resultierte in den Plasmiden pMOWS-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 und pMOWS-hIL-23R Δ 319-353. Die Ligationsprodukte wurden in chemische kompetente *E. coli* transformiert. In Rot dargestellt sind die *inserts*. Restriktionsschnittstellen sind als schwarze Linien gezeichnet. Fragmentgrößen (bp) von *inserts*, Vektoren sowie die Schnittstellen der genutzten Restriktionsenzyme sind markiert.

Der Vektor pMOWS-puro-GFP (pMOWS) wurde per Restriktion mit BamHI/EcoNI geschnitten (siehe 2.2.5). Zwei Fragmente mit einer Größe von 5721 bp und 806 bp wurden mittels Agarosegelelektrophorese getrennt (siehe 2.2.4) und das Vektorfragment (5721 bp) gereinigt (siehe 2.2.6). Die 5' Überhänge (*sticky ends*) wurden mit Klenow-Fragment geglättet (*blunt ends*) (siehe 2.2.8) und unmittelbar darauf dephosphoryliert (siehe 2.2.7), um eine Religation zu verhindern. Die DNA wurde mit dem Kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* gereinigt (siehe 2.2.6) und mit den mittels PmeI Restriktion gewonnenen *inserts* der Größe von 1944 bp (hIL-23R Δ 313-318; 323-353) und 1950 bp (hIL-23R Δ 319-353) ligiert (siehe 2.2.9). Nach Transformation in *E. coli XL1 blue* (siehe 2.2.1), Selektion per *colony*-PCR (siehe 2.2.10) und Plasmid-DNA-Minipräparation (siehe 2.2.2) wurden die Plasmide pMOWS-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 und pMOWS-hIL-23R Δ 319-353 mittels Plasmid-DNA-Midipräparation isoliert (siehe 2.2.2).

Mithilfe der klonierten pMOWS-Vektoren wurden Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-Zellen retroviral transduziert und stabile Zelllinien mit verschiedenen Rezeptoren auf der Zelloberfläche für weitere Untersuchungen hergestellt.

Nachdem bereits 1994 erstmals Ba/F3-Zellen mit gp130 per Elektroporation generiert wurden (Gearing *et al.*, 1994), hat sich die murine prä-B-Zelllinie mittlerweile zur Untersuchung der Signaltransduktion von Zytokinen bewährt (Suthaus *et al.*, 2010, Floss *et al.*, 2013, Floss & Scheller, 2019). Ba/F3-Zellen proliferieren IL-3-abhängig durch die Aktivierung von STAT5 (Gearing *et al.*, 1994, Floss *et al.*, 2013). Bei Ba/F3-Zellen, die durch Elektroporation mit gp130 transduziert wurden (Ba/F3-gp130-Zellen), erfolgt die Signaltransduktion hingegen über das Designerprotein Hyper-IL-6 (HIL-6), einem Fusionsprotein bestehend aus dem löslichen IL-6R (sIL-6R) und IL-6, durch die Aktivierung von STAT3 (Fischer *et al.*, 1997). In Anlehnung an HIL-6 generierten Oppmann *et al.* aus den IL-23-Untereinheiten p40 und p19 das Fusionszytokin HIL-23 (Oppmann *et al.*, 2000). Mit diesem Zytokin konnten wiederum Ba/F3-gp130-Zelllinien, die mit IL-23R und IL-12R β 1 retroviral transduziert wurden, stimuliert werden (Floss *et al.*, 2013).

Mehrere Ba/F3-gp130-Zelllinien wurden nach dem in Abb. 13 dargestellten Schema erzeugt. Zunächst wurden Ba/F3-gp130-Zellen mit cDNA, die für den hIL-12R β 1 kodierte (Franke *et al.*, 2016, Ackfeld, 2020), retroviral transduziert (siehe 2.3.3). So entstanden Ba/F3-gp130-Zellen mit hIL-12R β 1 auf der Zelloberfläche (Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-Zellen). Anschließend wurden diese Zellen mit dem hIL-23R beziehungsweise den Plasmiden der hIL-

23R-Deletionsvarianten retroviral transduziert (siehe 2.3.3). Die entstandenen Zelllinien exprimierten folglich sowohl den hIL-12R β 1 als auch eine hIL-23R-Variante auf der Zelloberfläche. Mithilfe der retroviralen Transduktion wurden im Rahmen dieser Dissertation die Zelllinien Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 344-353, Δ 334-353, Δ 323-353, Δ 313-353, Δ 313-318; 323-353, Δ 319-353 generiert. Der WT (Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R) (Ackfeld, 2020) lag bereits in der AG Scheller vor und wurde als Kontrolle bei allen Experimenten eingesetzt (s.u.).

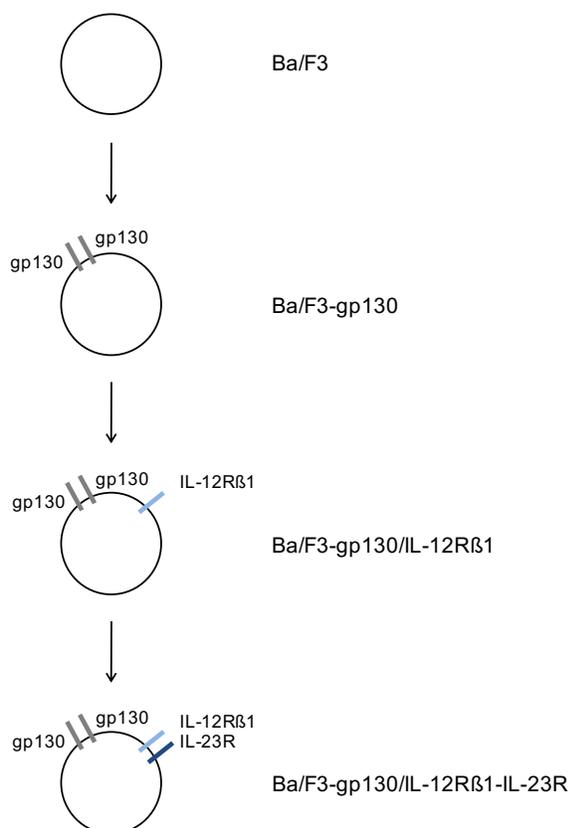


Abb. 13: Generieren der Ba/F3-Zelllinien mittels retroviraler Transduktion. Ba/F3-gp130-Zellen (graue Balken) (Gearing *et al.*, 1994) wurden mit den für IL-12R β 1 und den für IL-23R bzw. die jeweiligen IL-23R-Deletionsvarianten kodierenden cDNAs retroviral transduziert. Der IL-12R β 1 ist als hellblauer, der IL-23R als dunkelblauer und gp130 als graue Balken dargestellt.

Anschließend wurden diese Zellen mittels Durchflusszytometrie bezüglich der Zelloberflächenexpression der transduzierten Rezeptoren untersucht (siehe 2.3.4).

Nach Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern gegen die nachzuweisenden Rezeptoren erfolgte eine Fluoreszenzmessung mithilfe des *BD FACSCanto™ II*. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt.

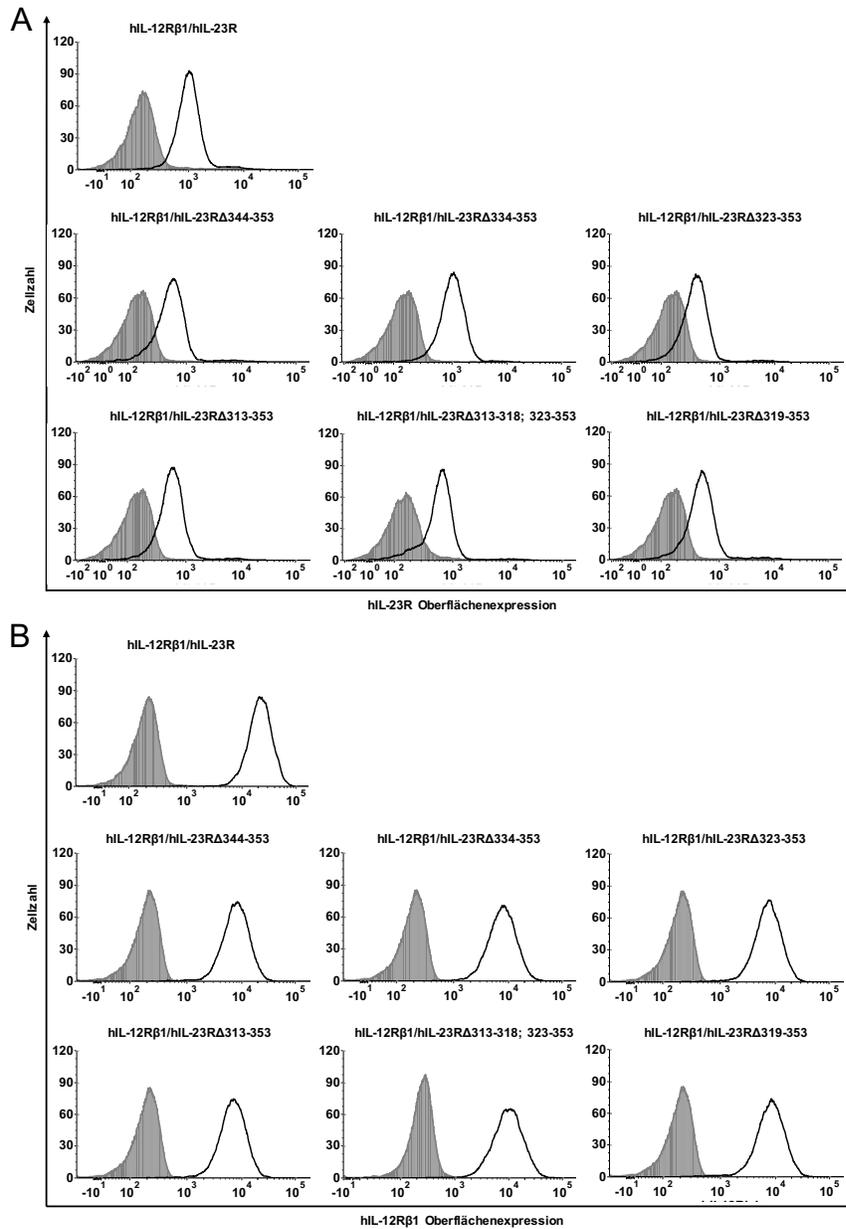


Abb. 14: Analyse der Oberflächenexpression retroviral transduzierter Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1-Zellen. Alle generierten Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1-Zelllinien sowie Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1-hIL-23R-Zellen, die die Wildtyprezeptoren auf der Zelloberfläche exprimierten (Ackfeld, 2020), wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die auf den x-Achsen abgebildete Zelloberflächenexpression der Rezeptoren wurde nach Inkubation mit den Antikörpern gegen hIL-23R (A) sowie gegen hIL-12Rβ1 (B) und Fluoreszenzmessung nachgewiesen. Zudem ist ein Maß für die Anzahl der analysierten Zellen, der eine bestimmte Fluoreszenzintensität zugeordnet werden konnte, auf der y-Achse dargestellt. Die schwarzen Kurven stehen für die Zelloberflächenexpression von hIL-23R bzw. hIL-12Rβ1 transduzierter Zellen als Anstieg der Fluoreszenzintensität verglichen mit Ba/F3-gp130-Zellen, repräsentiert durch graue Histogramme.

Am Histogramm lässt sich auf der x-Achse die Zelloberflächenexpression der Rezeptoren, veranschaulicht durch das Maß an Fluoreszenz, ablesen. Die y-Achse verdeutlicht die Anzahl der analysierten Zellen. Die graue Kurve repräsentiert untransduzierte Ba/F3-gp130-Zellen, die als Negativkontrolle dienten. Die schwarzen Kurven stehen für die entsprechende hIL-23R-Deletionsvariante. Sobald die schwarze Kurve im Vergleich zur Negativkontrolle (grau) nach rechts verschoben war, lag ein stärkeres Fluoreszenzsignal und somit der Beleg für das Vorhandensein der transduzierten Rezeptoren auf der Zelloberfläche jener Zellvarianten vor. Auf diese Weise wurde die Zelloberflächenexpression der Rezeptoren bei allen generierten Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-Zelllinien geprüft und bestätigt.

Alle Zelllinien zeigten verglichen mit den Negativkontrollen ein höheres Maß an Fluoreszenz, also eine Rechtsverschiebung der schwarzen Kurve gegenüber der grauen Kurve. Diese Fluoreszenzzunahme war sowohl nach Detektion mit Antikörpern gegen hIL-23R (A) als auch gegen hIL-12R β 1 (B) nachweisbar. Ebenfalls konnte auf diese Weise die Expression der Rezeptoren auf der Zelloberfläche der bereits in der AG Scheller vorhandenen Zelllinie Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R (WT) (Ackfeld, 2020) bestätigt werden.

Nach dem Nachweis der Expression der Rezeptoren auf der Zelloberfläche von transduzierten Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-Zellen folgte die Untersuchung der Zelllinien bezüglich ihrer Funktionalität. Die Bindung des Zytokins (IL-23) an den heterodimeren Rezeptorkomplex bestehend aus IL-23R und IL-12R β 1 führt über die Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges zur Phosphorylierung von STAT3 (Parham *et al.*, 2002, Floss *et al.*, 2015). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die IL-23-Signaltransduktion transduzierter Ba/F3-gp130-Zelllinien daher mittels Analyse der hIL-23-abhängigen Zellproliferation (siehe 2.3.5) und Aktivierung von STAT3 (siehe 2.3.6) bestimmt.

Die jeweiligen Zelllinien wurden mit PBS gewaschen, jeweils 5000 Zellen pro well einer 96-well-Platte verteilt und unstimuliert bzw. nach Zusatz von 0,2% HIL-6 (10 ng/ml) oder 0,2% HIL-23 (5,5 ng/ml) für 72 h im CO₂-Inkubator inkubiert. Danach wurde die Zellproliferation durch Zugabe des *CellTiter-Blue*[®] Reagenz und anschließender Fluoreszenzmessung mittels *Tecan infinite M200 PRO Reader* bestimmt. Zur Analyse der STAT3-Aktivierung wurden die jeweiligen Zelllinien mit PBS gewaschen, nach Inkubation in FCS-freiem Medium (4 h) mit HIL-23 stimuliert (30 min) oder unstimuliert belassen, lysiert und mittels Western Blot, unter Verwendung der Antikörper α -pSTAT3 und α -STAT3, untersucht.

Ba/F3-Zellen mit gp130-Rezeptoren auf der Zelloberfläche proliferieren nach Stimulation durch HIL-6 (Fischer *et al.*, 1997). Daher diente der Nachweis einer HIL-6-abhängigen Zellproliferation von Ba/F3-gp130-Zellen als Gütekriterium und war Voraussetzung für weitere Proliferationsanalysen. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Ba/F3-gp130-Zelllinien, von denen keine Zellproliferation erwartet wurde (siehe Abb. 15A).

Um die Bedeutung der *stalk*-Region für die biologische IL-23-Aktivität genauer zu erfassen, wurden zunächst Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-Zellen, transduziert mit cDNAs vorgestellter Deletionsvarianten des hIL-23R (siehe 3.2.1), auf HIL-23-abhängige Zellproliferation (siehe 2.3.5) und STAT3-Aktivierung (siehe 2.3.6) untersucht und mit Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-Zellen, die den hIL-23R (WT) exprimierten (Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R) (Ackfeld, 2020), verglichen (siehe Abb. 15).

Die Zelllinien mit um 10 AS verkürzter *stalk*-Region (Δ 344-353) zeigten eine vergleichbare Zellproliferation zum WT. Eine Deletion von 20 AS in der *stalk*-Region (Δ 334-353) resultierte in Zellen, die nicht mehr nach HIL-23-Zugabe proliferierten. Zelllinien mit um 30 AS verkürzter *stalk*-Regionen (Δ 323-353) zeigten gegenüber dem WT eine verringerte Zellproliferation. Analog zu den Ergebnissen des Proliferationsassays charakterisierten sich Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-Zellen mit hIL-23R Δ 344-353 und hIL-23R Δ 323-353 auf der Zelloberfläche durch eine in Bezug zum WT ähnliche (Δ 344-353) bzw. deutlich verminderte (Δ 323-353) Phosphorylierung von STAT3. Überraschenderweise war eine deutliche STAT3-Aktivierung bei Zellen mit hIL-23R Δ 334-353 nachweisbar. Wie erwartet, konnten alle genannten Zelllinien ohne Zytokinstimulation nicht proliferieren. Die Zelllinien Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 313-353, Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 sowie Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 319-353 mit vollständiger bzw. nahezu vollständiger Deletion der *stalk*-Region zeigten hingegen eine Zellproliferation sowie STAT3-Phosphorylierung ohne die Stimulation durch HIL-23 und somit eine ligandenunabhängige, autonome Rezeptoraktivierung. Diese wies keine Unterschiede zur HIL-23-induzierten Zellproliferation bzw. STAT3-Aktivierung auf.

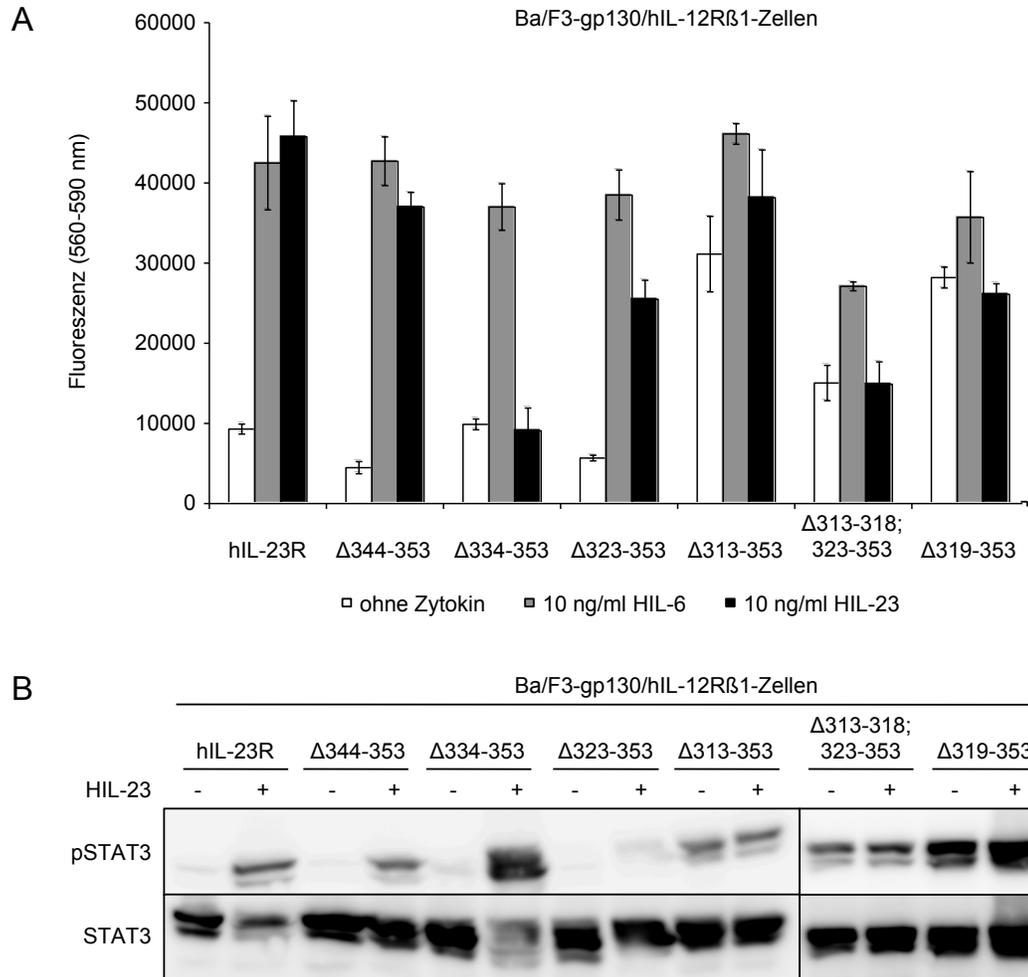


Abb. 15: Analyse der Zellproliferation (A) und STAT3-Aktivierung (B) von Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-Zellen mit verschiedenen *stalk*-Deletionsvarianten des humanen IL-23R auf der Zelloberfläche. (A) Die entsprechenden Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-Zellen wurden gewaschen und 72 h unbehandelt oder mit HIL-6 (10 ng/ml) bzw. HIL-23 (10 ng/ml) kultiviert (37°C, 5% CO₂) bevor die Zellproliferation mittels *CellTiter-Blue*[®] Reagenz ermittelt wurde. n=3. (B) Nach Waschen und Inkubation der Zelllinien in FCS-freiem Medium (37°C, 5% CO₂, 4 h) erfolgte eine Stimulation der Zellen mit HIL-23 (30 min; 10 ng/ml) oder ohne Zytokin. Nach Lyse der Zellen wurden 50 μ g Gesamtprotein in die Tasche eines SDS-PAA-Gels gegeben und elektrophoretisch voneinander getrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran und der Blockierung freier Bindestellen erfolgte die Detektion mit Antikörpern gegen pSTAT3 und STAT3. n=2.

Die bisher mit den von T. Ackfeld generierten Zelllinien Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R, Δ 344-353, Δ 334-353, Δ 323-353, Δ 313-353 erhobene Daten (Ackfeld, 2020) ließen sich also mit den entsprechenden neu generierten Zelllinien bestätigen. Zudem wurde zwei neue Zelllinien generiert, Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 und Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-

hIL-23R Δ 319-353, bei denen ebenfalls durch *stalk*-Deletion die autonome Rezeptoraktivierung ausgelöst wurde.

3.2.3 Die ligandenunabhängige Aktivierung benötigt nicht den hIL-12R β 1

Um den Einfluss des hIL-12R β 1 auf die ligandenunabhängige Aktivierung zu untersuchen, wurden Ba/F3-gp130-Zellen ohne Expression des hIL-12R β 1 auf der Zelloberfläche mit hIL-23R bzw. den hIL-23R-Deletionsvarianten retroviral transduziert (siehe 2.3.3) (siehe Abb. 13). Auf diese Weise entstanden die Zelllinien Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 und Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 319-353. Die Zelllinien Ba/F3-gp130-hIL-23R sowie Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 344-353, Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 334-353, Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 323-353, Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 313-353 wurden bereits im Rahmen der Dissertation von Theresa Ackfeld generiert, mittels Durchflusszytometrie analysiert (Ackfeld, 2020) und konnten erneut im Rahmen dieser Arbeit für weitere Untersuchungen verwendet werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie bezüglich der Zelloberflächenexpression der retroviral transduzierten Rezeptoren analysiert (siehe 2.3.4).

Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach Inkubation mit dem Antikörper gegen hIL-23R mithilfe des *BD FACSCanto™ II*. Abb. 16 zeigt die Analyse der Zelllinien Ba/F3-gp130-hIL-23R (Ackfeld, 2020), Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 und Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 319-353. Die Zelllinie Ba/F3-gp130-hIL-23R (Ackfeld, 2020) diene als Positivkontrolle. Die Zelloberflächenexpression der Rezeptoren kann als Stärke des Fluoreszenzsignals (x-Achse) für die bestimmte Anzahl der analysierten Zellen (y-Achse) abgelesen werden. Die graue Kurve zeigt die Fluoreszenzintensität untransduzierter Ba/F3-gp130-Zellen (Negativkontrolle), die schwarze Kurve die der hIL-23R-Deletionsvarianten. Für alle Zelllinien (Ba/F3-gp130-hIL-23R, Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 und Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 319-353) wurde ein höheres Maß an Fluoreszenz, in Form einer Rechtsverschiebung der schwarzen Kurve gegenüber der grauen, gemessen. Auf diese Weise wurde die Zelloberflächenexpression der entsprechenden Rezeptoren nachgewiesen.

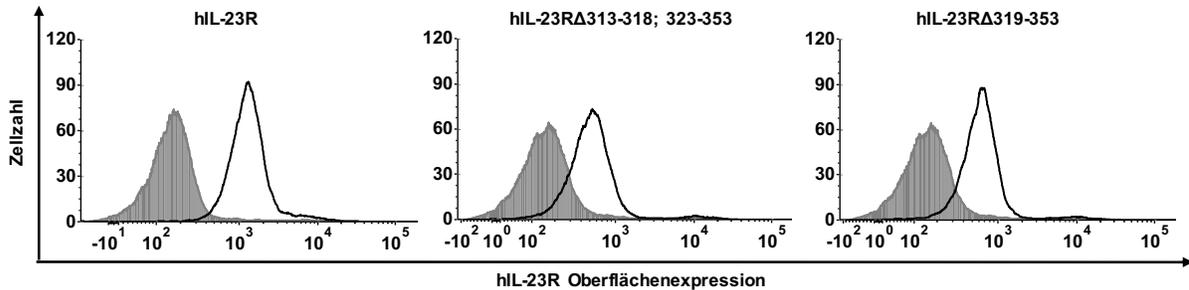


Abb. 16: Analyse der Oberflächenexpression retroviral transduzierter Ba/F3-gp130-Zellen. Alle generierten Ba/F3-gp130-Zelllinien sowie Ba/F3-gp130-hIL-23R-Zellen (Ackfeld, 2020), wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die auf den x-Achsen abgebildete Zelloberflächenexpression der Rezeptoren wurde nach Inkubation mit dem Antikörper gegen hIL-23R und Fluoreszenzmessung nachgewiesen. Zudem ist ein Maß für die Anzahl der analysierten Zellen, der eine bestimmte Fluoreszenzintensität zugeordnet werden konnte, auf der y-Achse dargestellt. Die schwarzen Kurven stehen für die Zelloberflächenexpression von hIL-23R transduzierter Zellen als Anstieg der Fluoreszenzintensität verglichen mit Ba/F3-gp130-Zellen, repräsentiert durch graue Histogramme.

Nachfolgend wurden die Ba/F3-gp130-Zelllinien, die die humanen IL-23R-Deletionsvarianten aber nicht hIL-12R β 1 exprimierten, sowie als Referenz dienende Ba/F3-gp130-Zellen mit hIL-23R (WT) und hIL-12R β 1 (Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R) auf der Zelloberfläche (Ackfeld, 2020) bezüglich der HIL-23-abhängigen Zellproliferation (siehe 2.3.5) und STAT3-Aktivierung (siehe 2.3.6) überprüft. Somit sollte die Rolle des IL-12R β 1 bei der autonomen Rezeptoraktivierung untersucht werden.

Die Zelllinien Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R, Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 344-353, Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 334-353, Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 323-353 und Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 313-353 waren bereits hinsichtlich HIL-23-abhängiger Zellproliferation (siehe 2.3.5) analysiert worden (Ackfeld, 2020). Die erhobenen Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit mit den entsprechenden Zelllinien wiederholt und bestätigt. Zusätzlich wurden die genannten Zelllinien erstmals mittels Stimulationsassay (siehe 2.3.6) untersucht (s.u.). Weiterhin erfolgte die Analyse der HIL-23-abhängigen Zellproliferation (siehe 2.3.5) und STAT3-Aktivierung (siehe 2.3.6) der im Rahmen dieser Arbeit neu generierten Zelllinien Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 319-353 und Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 313-318; 323-353.

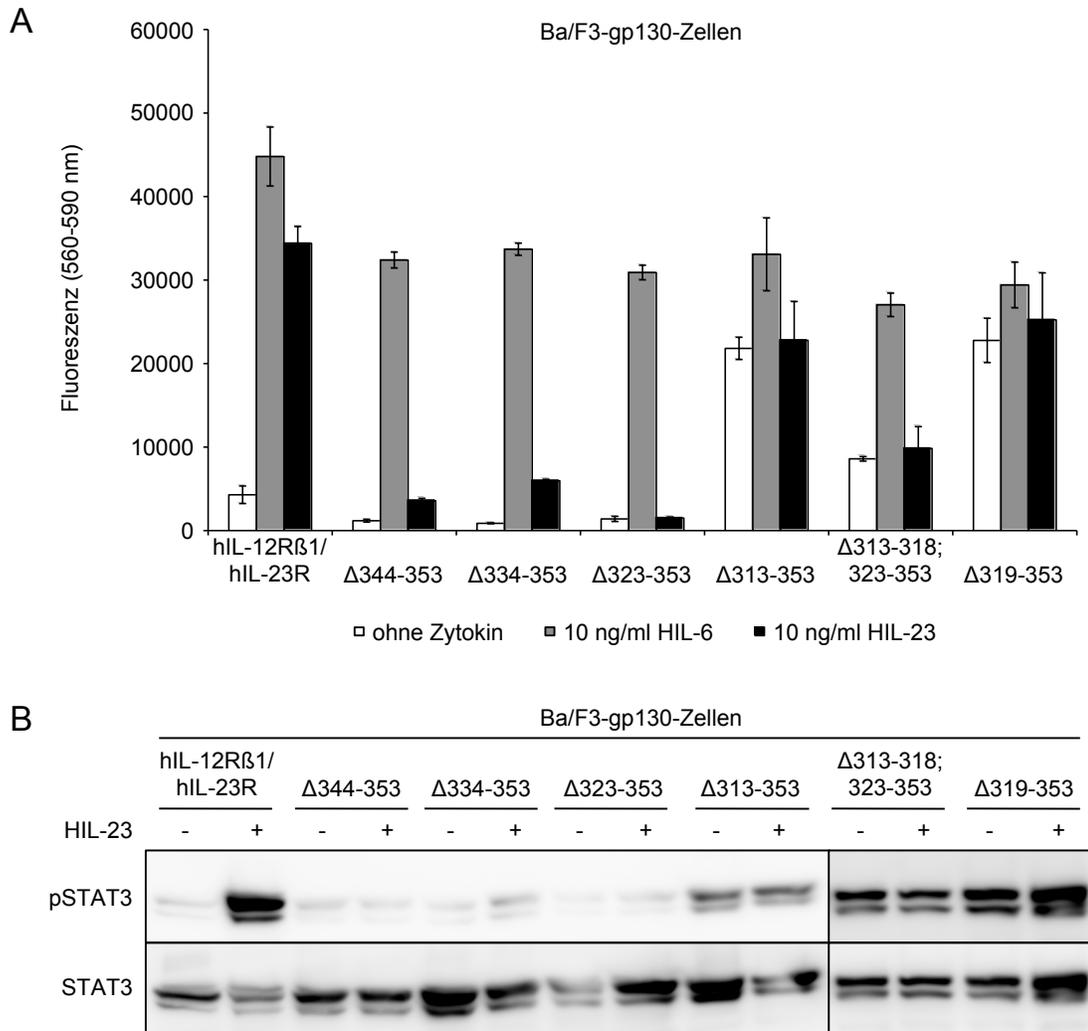


Abb. 17: Analyse der Zellproliferation (A) und STAT3-Aktivierung (B) von Ba/F3-gp130-Zellen mit verschiedenen *stalk*-Deletionsvarianten des humanen IL-23R auf der Zelloberfläche. (A) Die entsprechenden Ba/F3-gp130-Zellen wurden gewaschen und 72 h unbehandelt oder mit HIL-6 (10 ng/ml) bzw. HIL-23 (10 ng/ml) kultiviert (37°C, 5% CO₂) bevor die Zellproliferation mittels *CellTiter-Blue*[®] Reagenz ermittelt wurde. n= 3. (B) Nach Waschen und Inkubation der Zelllinien in FCS-freiem Medium (37°C, 5% CO₂, 4 h) erfolgte eine Stimulation der Zellen mit HIL-23 (30 min; 10 ng/ml) oder ohne Zytokin. Nach Lyse der Zellen wurden 50 µg Gesamtprotein in die Tasche eines SDS-PAA-Gels gegeben und elektrophoretisch voneinander getrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran und der Blockierung freier Bindestellen erfolgte die Detektion mit Antikörpern gegen pSTAT3 und STAT3. n=2.

Abb. 17 zeigt die Ergebnisse der Proliferations- (A) und Stimulationsassays (B). Erwartungsgemäß proliferierten alle Zellen nach HIL-6-Zusatz. Während die Referenzzellen (Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1-hIL-23R) HIL-23-abhängig proliferierten und eine STAT3-

Phosphorylierung aufwiesen, zeigten die auf gleiche Weise stimulierten Varianten $\Delta 344-353$, $\Delta 334-353$ und $\Delta 323-353$ nahezu keine Zellproliferation. Bis auf eine schwache Aktivierung von STAT3 bei der Variante hIL-23R $\Delta 334-353$ erfolgte bei den mit HIL-23 stimulierten Zelllinien zudem keine STAT3-Aktivierung. Bei den Zelllinien Ba/F3-gp130-hIL-23R $\Delta 313-353$, und Ba/F3-gp130-hIL-23R $\Delta 319-353$ hingegen konnte sowohl nach HIL-23-Stimulation als auch ohne Zytokingabe eine Zellproliferation und STAT3-Aktivierung in vergleichbarem Ausmaß wie bei der mittels HIL-23 stimulierten Positivkontrolle Ba-F3-gp130/hIL-12R $\beta 1$ -hIL-23R nachgewiesen werden. Ba/F3-gp130-hIL-23R $\Delta 313-318$; 323-353-Zellen glichen bezüglich ihrer Zellproliferation und STAT3-Aktivierung den zwei zuvor genannten Zelllinien (Ba/F3-gp130-hIL-23R $\Delta 313-353$ und Ba/F3-gp130-hIL-23R $\Delta 319-353$) mit Ausnahme einer verminderten Zellproliferation und verhielten sich zudem ob mit oder ohne HIL-23-Gabe fast identisch.

Zusammenfassend lassen sich bei Ba/F3-gp130-Zellen, die mit keiner cDNA für hIL-12R $\beta 1$ transduziert worden waren, zwei unterschiedliche Beobachtungen festhalten: Exprimierten sie hIL-23R-Varianten mit einer um 10-31 AS gekürzten *stalk*-Region ($\Delta 344-353$, $\Delta 334-353$ und $\Delta 323-353$), wurde die Signaltransduktion annähernd aufgehoben. Befanden sich jedoch Deletionsvarianten des humanen IL-23R mit vollständig oder nahezu entfernter *stalk*-Region ($\Delta 313-353$, $\Delta 313-318$; 323-353 und $\Delta 319-353$) auf der Zelloberfläche der Ba/F3-gp130-Zellen, ähnelten die Ergebnisse von Proliferations- und STAT3-Untersuchung denen, die bei Zelllinien mit zusätzlich exprimiertem hIL-12R $\beta 1$ erhoben wurden. Daraus lässt sich für die Bedeutung der humanen IL-23R-*stalk*-Region schlussfolgern, dass eine autonome Rezeptoraktivierung ohne die Beteiligung von IL-12R $\beta 1$ ausgelöst werden kann.

3.2.4 Generierung von Deletionsvarianten des murinen IL-23R

Neben der Herstellung und Untersuchung humaner Deletionsvarianten war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, den murinen IL-23R bezüglich dessen *stalk*-Region näher zu charakterisieren. Hierfür wurden Deletionsvarianten kloniert und hinsichtlich ihrer Expression in transient transfizierten COS-7-Zellen untersucht.

Sechs Deletionsvarianten des mIL-23R existierten bereits in der AG Scheller (Ciupka, 2014): mIL-23R $\Delta 363-372$, mIL-23R $\Delta 353-372$, mIL-23R $\Delta 343-372$, mIL-23R $\Delta 333-372$, mIL-23R $\Delta 317-372$, mIL-23R $\Delta 317-336$. Weitere zwei Varianten wurden im Rahmen dieser Arbeit kloniert (mIL-23R $\Delta 336-372$ und mIL-23R $\Delta 337-372$).

In Abb. 18 sind die Aminosäuresequenzen aller klonierten Varianten in Gegenüberstellung zum mIL-23R (WT) dargestellt.

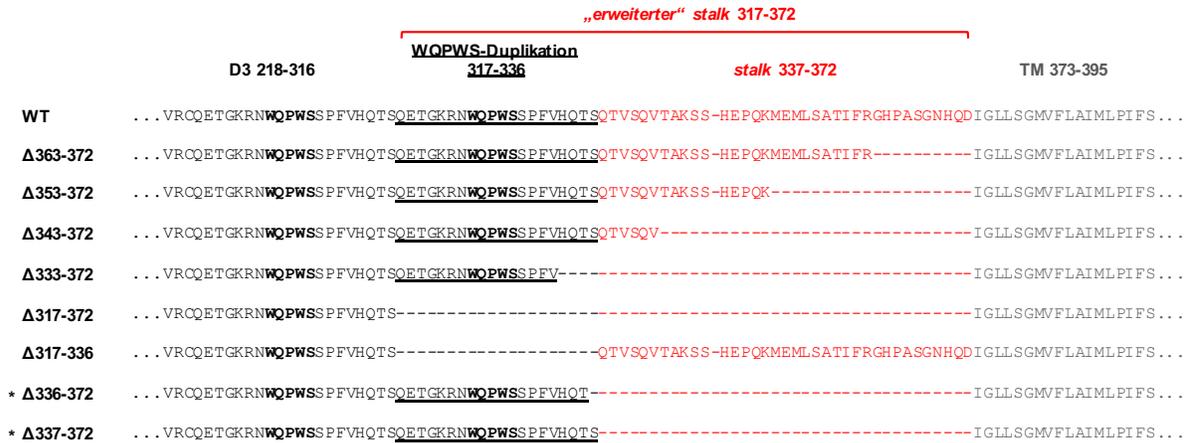


Abb. 18: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenzen des murinen IL-23R (WT) sowie der mIL-23R-Deletionsvarianten. Der Bereich von V294-S390 der murinen IL-23R-Varianten werden hier der Aminosäuresequenz des Wildtyps (WT) gegenübergestellt. Domäne D3 wird in schwarzen, die *stalk*-Region (*stalk*) in roten und die Transmembrandomäne (TM) in grauen Buchstaben dargestellt. Die WQPWS-Duplikation ist unterstrichen, das WQPWS-Motiv in Domäne D3 und WQPWS-Duplikation fett hervorgehoben. Mit Stern markiert sind die im Rahmen dieser Dissertation neu generierten Deletionsvarianten Δ336-372 und Δ337-372. Bereiche, in denen Aminosäuren entfernt wurden, sind mit Strichen veranschaulicht.

Ausgehend vom mIL-23R wurden mit Beginn von D372 schrittweise 10 (Δ363-372), 20 (Δ353-372), 30 (Δ343-372) und 40 AS (Δ333-372) der *stalk*-Region entfernt. Der Variante Δ333-372 fehlten zudem 4 AS (H333, Q334, T335, S336) der WQPWS-Duplikation. Bei Variante Δ317-372 wurden *stalk*-Region (Q337-D372) und WQPWS-Duplikation (Q317-S336) (= „erweiterte“ *stalk*-Region) vollständig entfernt. mIL-23RΔ317-336 zeichnete sich hingegen ausschließlich durch das Fehlen der WQPWS-Duplikation (Q317-S336) aus. Mit Stern markiert sind die beiden im Rahmen dieser Arbeit neu klonierten mIL-23R-Varianten Δ336-372 und Δ337-372, deren *stalk*-Region jeweils vollständig deletiert wurde. Einziger Unterschied zwischen den Varianten ist die AS S336, die bei erstgenannter (Δ336-372) ebenfalls entfernt wurde. Die *stalk*-Regionen in Abb. 18 sind jeweils in Rot dargestellt.

Analog zu den Klonierungen der humanen IL-23R-Varianten (siehe 3.2.1) wurden die spezifischen murinen Rezeptorvarianten in den Expressionsvektor p409 ligiert (siehe 2.2.9).

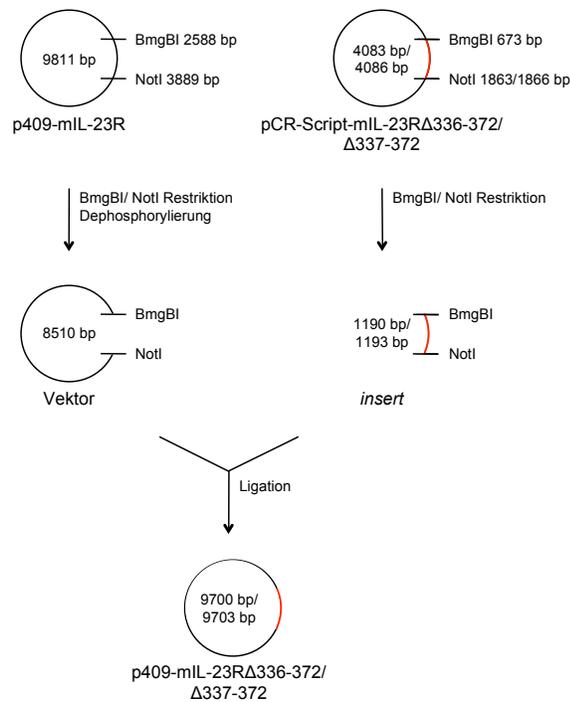


Abb. 19: Klonierungen der murinen Deletionsvarianten p409-mIL-23RΔ336-372 und p409-mIL-23RΔ337-372. Der Vektor p409-mIL-23R wurde mit BmgBI/NotI geschnitten, dephosphoryliert und mit den ebenfalls mit BmgBI/NotI geschnittenen *inserts* mIL-23RΔ336-372 bzw. mIL-23RΔ337-372 aus pcR-Script-mIL-23RΔ336-372 bzw. pcR-Script-mIL-23RΔ337-372 ligiert. Dies resultierte in den Plasmiden p409-mIL-23RΔ336-372 und p409-mIL-23RΔ337-372. Die Ligationsprodukte wurden in chemische kompetente *E. coli* transformiert. In Rot dargestellt sind die *inserts*. Restriktionsschnittstellen sind als schwarze Linien gezeichnet. Fragmentgrößen (bp) von *inserts*, Vektoren sowie die Schnittstellen der genutzten Restriktionsenzyme sind markiert.

Der mIL-23R (WT) (Floss *et al.*, 2013), sowie die Varianten mIL-23RΔ363-372, mIL-23RΔ353-372, mIL-23RΔ343-372, mIL-23RΔ333-372, mIL-23RΔ317-372 und mIL-23RΔ317-336 lagen bereits in der AG Scheller im Expressionsvektor p409 vor (Ciupka, 2014). Sequenzabschnitte für die Varianten Δ336-372 und Δ337-372 fanden sich hingegen in dem Klonierungsvektor pCR-Script (AG Scheller). Daher wurde zunächst p409-mIL-23R in einer präparativen Restriktion mit BmgBI und NotI geschnitten (siehe 2.2.5). Nach Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme und Dephosphorylierung (siehe 2.2.7) wurde das 8510 bp lange Vektorfragment isoliert (siehe 2.2.6). Die benötigten *inserts* (1190 bp und 1193 bp) wurden nach Restriktion der Plasmide pCR-Script-mIL-23RΔ336-372 und Δ337-372 mit BmgBI und NotI (siehe 2.2.5) inklusive darauffolgender Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.4)

und Gelextraktion (siehe 2.2.6) erhalten. *Insert*-DNA und Vektor wurden ligiert (siehe 2.2.9) und in chemisch kompetente *E. coli XL1 blue* transformiert (siehe 2.2.1). Der beschriebene Klonierungsweg ist in Abb. 19 schematisch dargestellt.

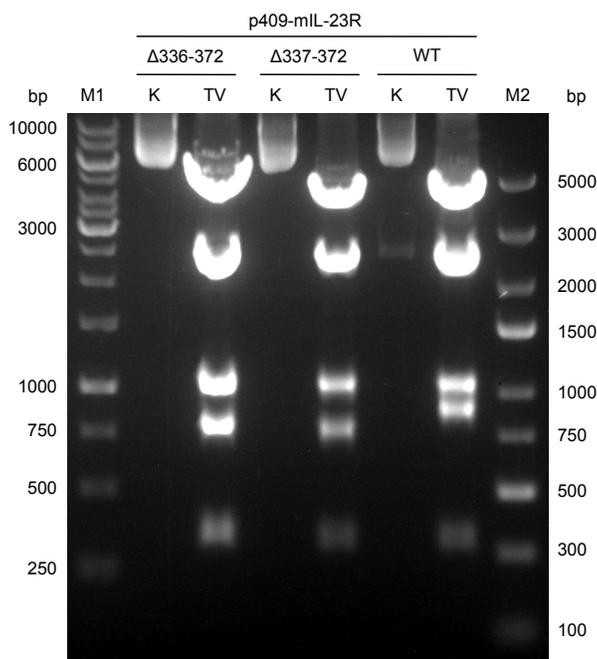


Abb. 20: Klonierung der Expressionsvektoren p409-mIL-23R Δ 336-372 und Δ 337-372. Die aus pCR-Script in den Expressionsvektor p409 klonierten Deletionsvarianten des murinen IL-23R sowie der bereits in p409 vorliegende mIL-23R (WT) wurden mit EcoRI geschnitten (TV), mittels Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt und visualisiert. Zur Kontrolle wurde nicht gesplante Plasmid-DNA aufgetragen (K). Fragmentgrößen (bp): p409-mIL-23R Δ 336-372 (344 + 762 + 1008 + 2436 + 5150 bp); p409-mIL-23R Δ 337-372 (344 + 765 + 1008 + 2436 + 5150 bp); p409-mIL-23R (344 + 873 + 1008 + 2436 + 5150 bp). DNA-Größenstandard: *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* (M1), *GeneRuler™ Express DNA Ladder* (M2).

Positive Plasmid-Klone wurden mittels *colony*-PCR (siehe 2.2.10) und Plasmid-DNA-Minipräparation (siehe 2.2.2) und anschließender Restriktionsspaltung identifiziert (siehe 2.2.5). Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mittels Plasmid-DNA-Midipräparation (siehe 2.2.2). Die Plasmide p409-mIL-23R Δ 336-372 und p409-mIL-23R Δ 337-372 wurden im Agarosegel (siehe 2.2.4) nach Restriktionsspaltung mit EcoRI analysiert (siehe 2.2.5). Die errechneten Fragmentgrößen von 344 bp, 762 bp, 1008 bp, 2436 bp und 5150 bp (p409-mIL-23R Δ 336-372) bzw. 344 bp, 765 bp, 1008 bp, 2436 bp und 5150 bp (p409-mIL-23R Δ 337-372) wurden nach elektrophoretischer Trennung dargestellt und mit den Fragmentgrößen des

ebenfalls mit EcoRI restringierten mIL-23R (WT) (siehe 2.2.5) von 344 bp, 873 bp, 1008 bp, 2436 bp und 5150 bp verglichen (siehe Abb. 20). Dort sind ebenfalls die ungeschnittenen Vektoren als Kontrollen (K) abgebildet. Aufgrund der Übereinstimmung von errechneter und gelelektrophoretisch bestimmter Fragmentgrößen wurden die Vektoren p409-mIL-23R Δ 336-372 und p409-mIL-23R Δ 337-372 bestätigt.

Analog zu den humanen p409-Vektoren (siehe 3.2.1) wurden die im Rahmen dieser Arbeit generierten p409-Vektoren für die murinen IL-23R-Deletionsvarianten (p409-mIL-23R Δ 336-372 und p409-mIL-23R Δ 337-372) zusammen mit den bereits in der AG Scheller vorhandenen Varianten (p409-mIL-23R Δ 363-372, Δ 353-372, Δ 343-372, Δ 333-372, Δ 317-372, Δ 317-336 (Ciupka, 2014) und p409-mIL-23R (Floss *et al.*, 2013) bezüglich der Expression in eukaryotischen COS-7-Zellen untersucht.

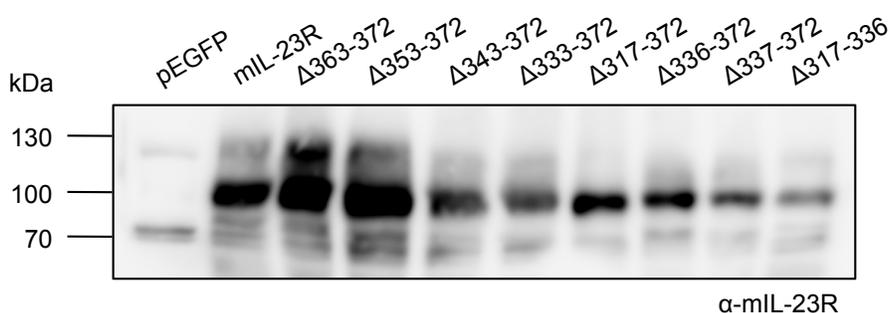


Abb. 21: Expression der Deletionsvarianten des murinen IL-23R in transient transfizierten COS-7-Zellen. COS-7-Zellen wurden mit den Vektoren für den murinen IL-23R, die mIL-23R-Deletionsvarianten, sowie den Kontrollvektor pEGFP transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Lyse der Zellen und die Analyse der Proben mittels Western Blot. Für die Detektion wurde der Primärantikörper α -mIL-23R (biotinyliert) benutzt. Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Wiedergabe der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von American Society for Microbiology (Hummel *et al.*, 2017), http://journals.asm.org/site/misc/ASM_Author_Statement.xhtml.

Die jeweiligen Zellen wurden hierfür mit entsprechender DNA transfiziert (siehe 2.3.2), nach 48 h lysiert (siehe 2.4.1), mit Lämmli-Puffer (5x) verdünnt und ca. 10-20 μ l der Proben in die Taschen eines SDS-PAA-Gels für die Analyse per Western Blot gegeben (siehe 2.4.3). Ebenfalls aufgetragen wurde das Lysat von mit pEGFP transfizierten COS-7-Zellen (Negativkontrolle). Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem biotinylierten Antikörper α -mIL-23R. Abb. 21 zeigt das Ergebnis der Immunodetektion. Alle Rezeptorvarianten sind als gut sichtbare Banden dargestellt. Wie erwartet zeigt die Negativkontrolle pEGFP keine Bande.

Somit wurde die Expression der DNA muriner IL-23R-Varianten in transient transfizierten COS-7-Zellen bestätigt.

3.2.5 Die Deletion der „erweiterten“ *stalk*-Region des murinen IL-23R führt zu ligandenunabhängiger Rezeptoraktivierung

Analog zu den humanen Rezeptorvarianten (siehe 3.2.2) wurden die murinen Deletionsvarianten in den retroviralen Vektor pMOWS-puro-GFP (pMOWS) kloniert, um Ba/F3-gp130-Zellen retroviral zu transduzieren (s.u.). Diese wurden bezüglich Zellproliferation und STAT3-Aktivierung nach HIL-23 Stimulation untersucht (s.u.). Auf diese Weise konnten Aussagen zur IL-23-Signaltransduktion der verschiedenen Rezeptorvarianten getroffen werden.

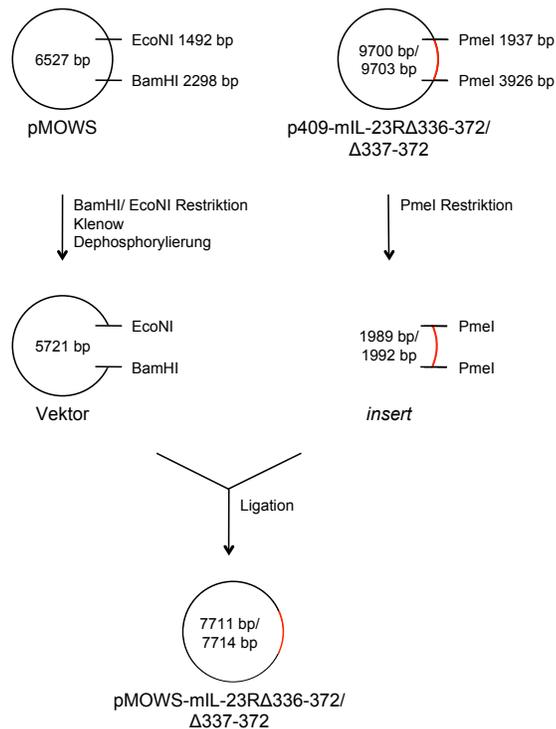


Abb. 22: Klonierungen der murinen Deletionsvarianten pMOWS-mIL-23R Δ 336-372 und pMOWS-mIL-23R Δ 337-372. Der Vektor pMOWS-puro-GFP (pMOWS) wurde mit EcoNI/BamHI geschnitten, die Enden mit Klenow-Fragment geglättet, dephosphoryliert und mit den mit PmeI geschnittenen inserts mIL-23R Δ 336-372 bzw. mIL-23R Δ 337-372 aus p409-mIL-23R Δ 336-372 bzw. p409-mIL-23R Δ 337-372 ligiert. Dies resultierte in den Plasmiden pMOWS-mIL-23R Δ 336-372 und pMOWS-mIL-23R Δ 337-372. Die Ligationsprodukte wurden in chemische kompetente *E. coli* transformiert. In Rot dargestellt sind die inserts. Restriktionsschnittstellen sind als schwarze Linien gezeichnet. Fragmentgrößen (bp) von inserts, Vektoren sowie die Schnittstellen der genutzten Restriktionsenzyme sind markiert.

Abb. 22 beschreibt die im Rahmen dieser Dissertation vorgenommenen Klonierungen. Ausgangspunkt waren die Plasmide p409-mIL-23R Δ 336-372 und p409-mIL-23R Δ 337-372. Diese wurden benötigt, um nach Restriktion mit PmeI (siehe 2.2.5) und Isolierung der Fragmente (1989 bp bzw. 1992 bp) (siehe 2.2.6) die *inserts* für die Ligation (siehe 2.2.9) mit dem mit BamHI/EcoNI geschnittenen (siehe 2.2.5), mit Klenow-Fragment aufgefüllten (siehe 2.2.8) und dephosphorylierten Vektor pMOWS (5721 bp) (siehe 2.2.7) zu erhalten. Nach Transformation in chemisch kompetente *E. coli* (siehe 2.2.1) und Selektion (*colony*-PCR) (siehe 2.2.10), Plasmid-DNA-Minipräparation (siehe 2.2.2)) wurden die Plasmide pMOWS-mIL-23R Δ 336-372 und pMOWS-mIL-23R Δ 337-372 mittels Plasmid-DNA-Midipräparation isoliert (siehe 2.2.2). Der zusätzlich im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektor pMOWS-mIL-12R β 1 (Floss *et al.*, 2013) war bereits in der AG Scheller vorhanden.

Mithilfe der erzeugten pMOWS-Vektoren wurden im Rahmen der Arbeit die stabilen Zelllinien Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 336-372 und Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 337-372 nach in Abb. 13 dargestellten Schema (siehe 3.2.2) hergestellt. Hierfür erfolgte die retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-Zellen (siehe 2.3.3). Die selektierten Zelllinien wurden zusammen mit den bereits in der AG Scheller vorliegenden Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen (WT) (Floss *et al.*, 2013) mittels Durchflusszytometrie untersucht (siehe 2.3.4).

Die Analyse der Zelloberflächenexpression der Rezeptoren ist in Abb. 23 gezeigt. Nach Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern gegen mIL-23R (A) bzw. mIL-12R β 1 (B) wurde die Fluoreszenz der analysierten Zellen mithilfe des *BD FACSCanto™ II* bestimmt. Im Histogramm äußerte sich ein höheres Maß an Fluoreszenz durch eine Rechtsverschiebung der Kurven auf der x-Achse. Dies ließ sich bei allen schwarzen Kurven, stellvertretend für die entsprechend transduzierten Zellen, im Vergleich zu den grauen Kurven untransduzierter Ba/F3-gp130-Zellen (Negativkontrollen) beobachten. Aufgrund der gemessenen Fluoreszenzintensität wurde die Expression der Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Zelllinien Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R (WT) (Floss *et al.*, 2013), Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 336-372 und Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 337-372 bestätigt.

Die in den folgenden Untersuchungen ebenfalls verwendete Zelllinie Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 317-372 wurde bereits von T. Ackfeld generiert und mittels Durchflusszytometrie charakterisiert (Ackfeld, 2020).

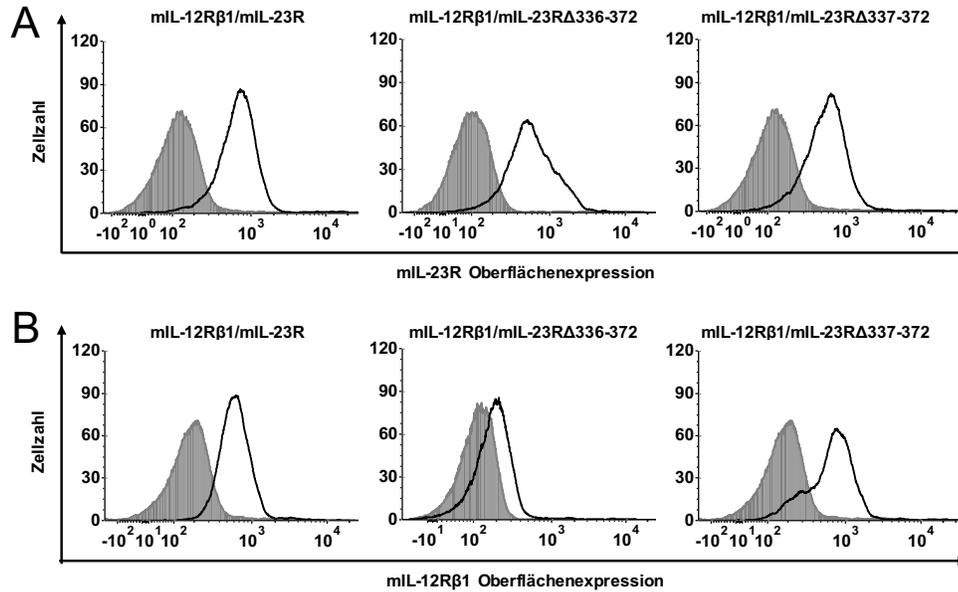


Abb. 23: Analyse der Oberflächenexpression retroviral transduzierter Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-Zellen.

Alle generierten Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-Zelllinien sowie Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen, die die Wildtyprezeptoren auf der Zelloberfläche exprimierten (Floss *et al.*, 2013), wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die auf den x-Achsen abgebildete Zelloberflächenexpression der Rezeptoren wurde nach Inkubation mit den Antikörpern gegen mIL-23R (A) sowie gegen mIL-12R β 1 (B) und Fluoreszenzmessung nachgewiesen. Zudem ist ein Maß für die Anzahl der analysierten Zellen, der eine bestimmte Fluoreszenzintensität zugeordnet werden konnte, auf der y-Achse dargestellt. Die schwarzen Kurven stehen für die Zelloberflächenexpression von mIL-23R bzw. mIL-12R β 1 transduzierter Zellen als Anstieg der Fluoreszenzintensität verglichen mit Ba/F3-gp130-Zellen, repräsentiert durch graue Histogramme.

Mithilfe der Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1 Zelllinien sollte geprüft werden, ob spezifische Beobachtungen hinsichtlich der HIL-23-abhängigen Zellproliferation und Aktivierung von STAT3, die anhand der humanen Rezeptorvarianten erhoben wurden, auch für die murinen IL-23R-Deletionsvarianten zutreffen.

Hierbei beschränkte sich die Auswahl der cDNAs für die retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-Zellen auf den mIL-23R (WT) (Floss *et al.*, 2013) und die Varianten, bei denen die *stalk*-Regionen (Δ 336-372 und Δ 337-372) (s.o.) bzw. die „erweiterte“ *stalk*-Region (Δ 317-372) (Ciupka, 2014, Ackfeld, 2020) deletiert wurde. Auch bei diesen Zellen erfolgte eine Analyse mittels Proliferations- (A) (siehe 2.3.5) und Stimulationsassay (B) (siehe 2.3.6) (Siehe Abb. 24).

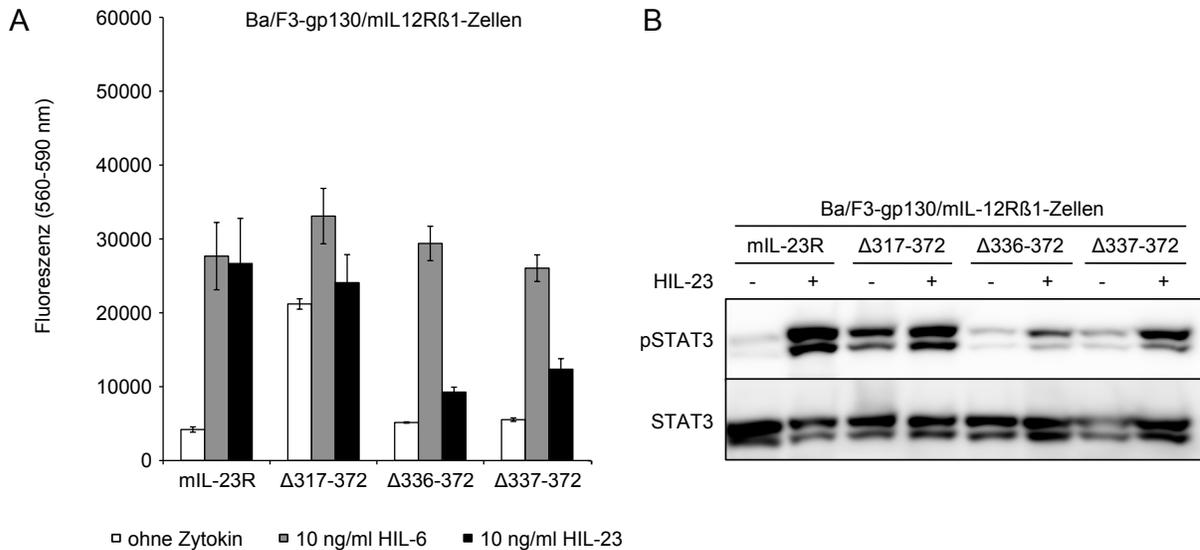


Abb. 24: Analyse der Zellproliferation (A) und STAT3-Aktivierung (B) von Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-Zellen mit verschiedenen *stalk*-Deletionsvarianten des murinen IL-23R auf der Zelloberfläche. (A) Die entsprechenden Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-Zellen wurden gewaschen und 72 h unbehandelt oder mit HIL-6 (10 ng/ml) bzw. HIL-23 (10 ng/ml) kultiviert (37°C, 5% CO₂), bevor die Zellproliferation mittels *CellTiter-Blue*[®] Reagenz ermittelt wurde. n=2. (B) Nach Waschen und Inkubation der Zelllinien in FCS-freiem Medium (37°C, 5% CO₂, 4 h) erfolgte eine Stimulation der Zellen mit HIL-23 (30 min; 10 ng/ml) oder ohne Zytokin. Nach Lyse der Zellen wurden 50 μ g Gesamtprotein in die Tasche eines SDS-PAA-Gels gegeben und elektrophoretisch voneinander getrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran und der Blockierung freier Bindestellen erfolgte die Detektion mit Antikörpern gegen pSTAT3 und STAT3. n=2.

In allen Zellen war eine gp130-vermittelte, HIL-6-abhängige Zellproliferation nachweisbar. Die Zelllinien Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R (WT), Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 336-372 und Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 337-372 zeigten keine Zellaktivität ohne Zytokinstimulation, reagierten jedoch HIL-23-abhängig mit Zellproliferation und STAT3-Aktivierung. Dieses Verhalten war bei den Zelllinien Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 336-372 und Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 337-372 im Vergleich zum WT jedoch deutlich geringer ausgeprägt. Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-Zellen, transduziert mit dem Plasmid der Rezeptorvariante mIL-23R Δ 317-372, deren „erweiterte“ *stalk*-Region (siehe 3.2.4) vollständig deletiert wurde, zeigten nach Stimulation mit HIL-23 eine vergleichbare Zellproliferation und STAT3-Aktivierung wie Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen. Dies wurde bereits in der Dissertation von Theresa Ackfeld beschrieben. Zudem wurde sowohl die Zellproliferation als auch die STAT3-Phosphorylierung dieser Zelllinie ohne die Zugabe eines Zytokins ausgelöst

(Ackfeld, 2020). Das Entfernen der eigentlichen *stalk*-Region ($\Delta 336-372$, $\Delta 337-372$) induzierte hingegen keine ligandenunabhängige Zellproliferation und keine STAT3-Aktivierung. Die autonome Rezeptoraktivierung wird beim murinen IL-23R eingeleitet, sobald die „erweiterte“ *stalk*-Region ($\Delta 317-372$) entfernt wurde.

3.2.6 Der mIL-12R β 1 wird für die ligandenunabhängige Aktivierung nicht benötigt

Die Rolle des mIL-12R β 1 für das Phänomen der ligandenunabhängigen Aktivierung wurde analog zu 3.2.3 mithilfe von Ba/F3-gp130-Zellen, die keinen mIL-12R β 1 auf der Zelloberfläche exprimierten, geprüft. Ba/F3-gp130-Zellen wurden mit mIL-23R-Deletionsvarianten retroviral transduziert (siehe 2.3.3). Dies resultierte in den Zelllinien Ba/F3-gp130-mIL-23R $\Delta 336-372$ und Ba/F3-gp130-mIL-23R $\Delta 337-372$.

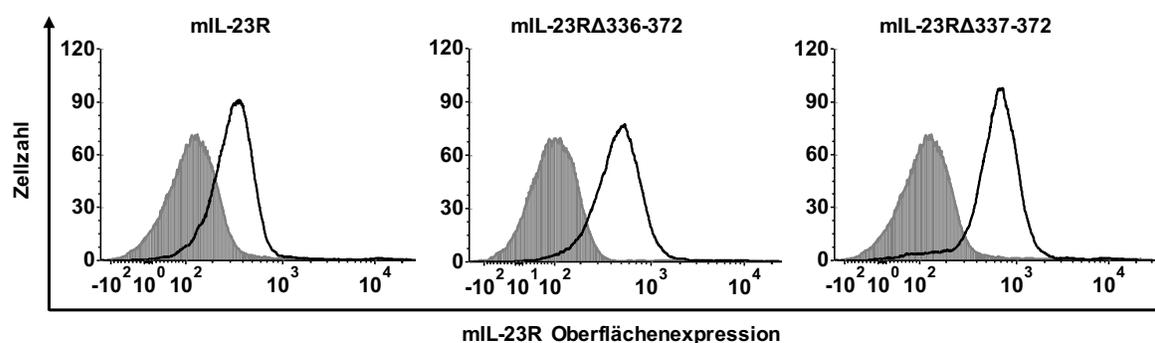


Abb. 25: Analyse der Oberflächenexpression retroviral transduzierter Ba/F3-gp130-Zellen. Alle generierten Ba/F3-gp130-Zelllinien sowie Ba/F3-gp130-mIL-23R-Zellen (Floss *et al.*, 2013) wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die auf den x-Achsen abgebildete Zelloberflächenexpression der Rezeptoren wurde nach Inkubation mit dem Antikörper gegen mIL-23R und Fluoreszenzmessung nachgewiesen. Zudem ist ein Maß für die Anzahl der analysierten Zellen, der eine bestimmte Fluoreszenzintensität zugeordnet werden konnte, auf der y-Achse dargestellt. Die schwarzen Kurven stehen für die Zelloberflächenexpression von mIL-23R transduzierter Zellen als Anstieg der Fluoreszenzintensität verglichen mit Ba/F3-gp130-Zellen, repräsentiert durch graue Histogramme.

Die Expression entsprechender Rezeptordeletionsvarianten auf der Zelloberfläche von Ba/F3-gp130-Zelllinien wurde mithilfe des *BD FACSCanto™ II* bestätigt (siehe 2.3.4). Die Detektion erfolgte nach Inkubation mit einem Antikörper gegen mIL-23R. Im Histogramm wurde ein stärkeres Fluoreszenzsignal der retroviral transduzierten Zelllinien (schwarz) mit

untransduzierten Ba/F3-gp130-Zellen (grau) verglichen und durch eine auf der x-Achse nach rechts verschobene Kurve (schwarz) veranschaulicht (siehe Abb. 25). Auf die gleiche Weise wurde erneut die mIL-23R-Expression auf der Zelloberfläche von zuvor generierten Ba/F3-gp130-mIL-23R-Zellen (Floss *et al.*, 2013) gezeigt.

Weiterhin waren in der AG Scheller bereits die Zelllinien Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 353-372, Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 343-372, Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 333-372, Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 317-372 vorhanden und wurden mittels Durchflusszytometrie (siehe 2.3.4) charakterisiert (Ackfeld, 2020). Die Analyse der Expression der Rezeptoren auf der Oberfläche der Zelllinie Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R (Floss *et al.*, 2013) wurde bereits in 3.2.5 beschrieben. Die genannten Zelllinien, sowie die Linie Ba/F3-gp130-mIL-23R wurden zuvor im Rahmen der Dissertation von Theresa Ackfeld hinsichtlich HIL-23-abhängiger Zellproliferation und STAT3-Aktivierung untersucht (Ackfeld, 2020).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die entsprechenden Untersuchungen wiederholt (siehe 2.3.5, 2.3.6) und um die Analyse der im Rahmen dieser Arbeit generierten Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 336-372 und Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 337-372-Zellen ergänzt (Siehe Abb. 26). Als Positivkontrolle dienten Ba/F3-gp130-Zellen mit mIL-12R β 1 und mIL-23R auf der Zelloberfläche (Floss *et al.*, 2013). Diese zeigten eine HIL-23-abhängige Zellproliferation und STAT3-Aktivierung. Zudem wurde eine Expression der gp130-Rezeptoren durch HIL-6-induzierte Zellproliferation bei allen Zelllinien bestätigt. Ba/F3-gp130-Zellen, die nicht den mIL-12R β 1 exprimierten aber mit dem murinen IL-23R (Floss *et al.*, 2013) bzw. den Deletionsvarianten mIL-23R Δ 353-372, mIL-23R Δ 343-372 und mIL-23R Δ 333-372 transduziert wurden, zeigten nach Kultivierung ohne Zytokin bzw. nach Kultivierung mit 10 ng/ml HIL-23 keine Zellproliferation. Ebenfalls wurde bei diesen Zellen, außer bei der Variante mIL-23R Δ 333-372, die eine erhöhte basale STAT3-Aktivität unabhängig von einer Stimulation durch HIL-23 aufwies, keine Phosphorylierung von STAT3 beobachtet. Abgesehen von der beschriebenen Hintergrundaktivität (mIL-23R Δ 333-372) deckten sich alle bis zu diesem Punkt vorgestellten Ergebnisse mit den Beobachtungen von T. Ackfeld (Ackfeld, 2020).

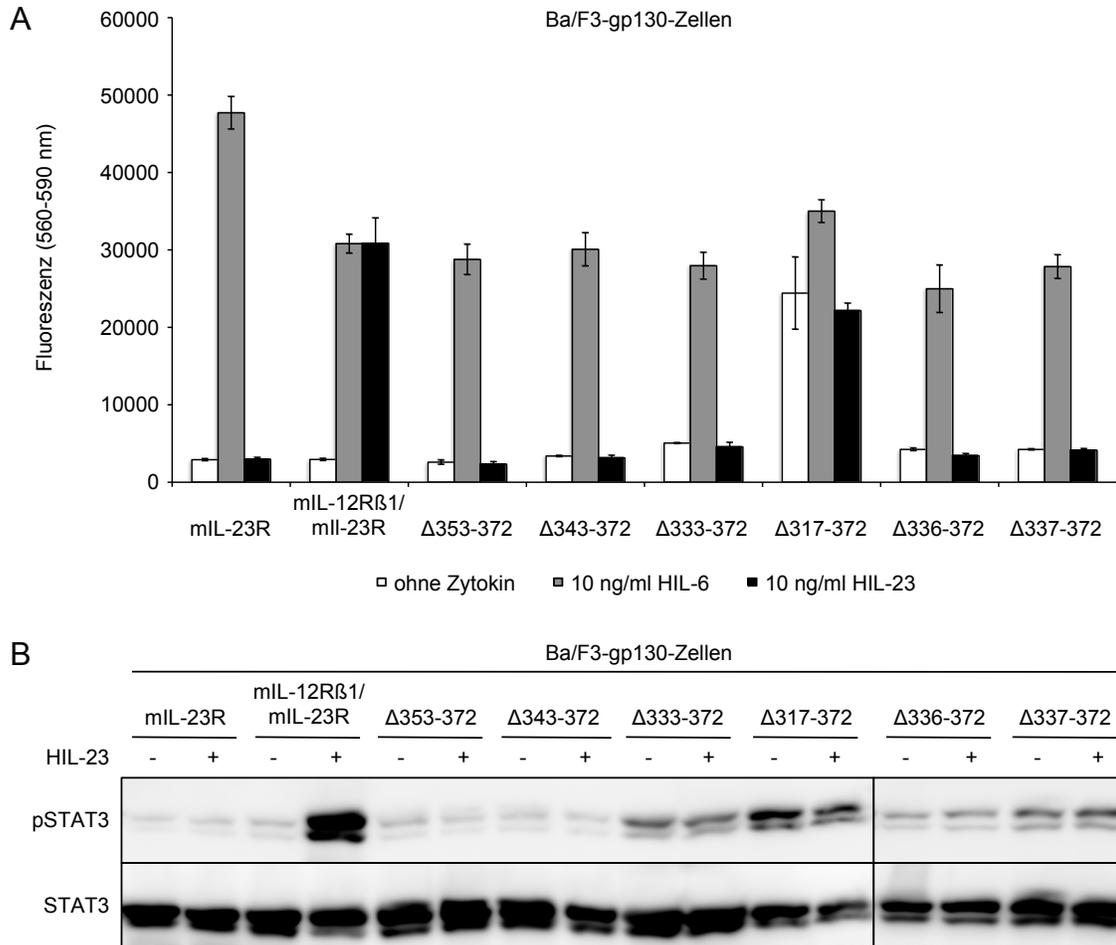


Abb. 26: Analyse der Zellproliferation (A) und STAT3-Aktivierung (B) von Ba/F3-gp130-Zellen mit verschiedenen *stalk*-Deletionsvarianten des murinen IL-23R auf der Zelloberfläche. (A) Die entsprechenden Ba/F3-gp130-Zellen wurden gewaschen und 72 h unbehandelt oder mit HIL-6 (10 ng/ml) bzw. HIL-23 (10 ng/ml) kultiviert (37°C, 5% CO₂), bevor die Zellproliferation mittels *CellTiter-Blue*[®] Reagenz ermittelt wurde. n= 2. (B) Nach Waschen und Inkubation der Zelllinien in FCS-freiem Medium (37°C, 5% CO₂, 4 h) erfolgte eine Stimulation der Zellen mit HIL-23 (30 min; 10 ng/ml) oder ohne Zytokin. Nach Lyse der Zellen wurden 50 µg Gesamtprotein in die Tasche eines SDS-PAA-Gels gegeben und elektrophoretisch voneinander getrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran und der Blockierung freier Bindestellen erfolgte die Detektion mit Antikörpern gegen pSTAT3 und STAT3. n= 2.

Die im Rahmen dieser Arbeit erstmals untersuchten Ba/F3-gp130-Zellen mit den Deletionsvarianten mIL-23R Δ 336-372 und mIL-23R Δ 337-372 auf der Zelloberfläche zeichneten sich ebenfalls durch fehlende Zellproliferation und STAT3-Aktivierung aus. Bemerkenswert muss an dieser Stelle, dass es sich in Abb. 26 (B) um eine Nebeneinanderstellung unterschiedlicher Immunoblots handelt. Der Western Blot, der

ausschnittsweise die Zelllinien Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 336-372 und Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 337-372 zeigt, hatte dabei eine deutlich höhere basale STAT3-Aktivität.

Zusammenfassend wiesen keine der genannten Deletionsvarianten des murinen IL-23R (Δ 353-372, Δ 343-372, Δ 333-372, Δ 336-372, Δ 337-372), mit denen Ba/F3-gp130-Zellen transduziert worden waren, eine biologische Aktivität auf. Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 317-372-Zellen hingegen zeigten eine ligandenunabhängige autonome Rezeptoraktivierung, wie die Daten der Zellproliferations- und STAT3-Analysen veranschaulichten. Dies wurde bereits in der Arbeit von T. Ackfeld nachgewiesen (Ackfeld, 2020). Auch die Signaltransduktion des murinen IL-23R kann folglich ohne das Mitwirken des IL-12R β 1 und ohne Zytokinstimulation nach vollständiger Deletion der „erweiterten“ *stalk*-Region erfolgen.

3.2.7 Bestätigung der ligandenunabhängigen Aktivierung des mIL-23R in transient transfizierten Fibrosarkomzellen

Alle bisher im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten zellbiologischen Untersuchungen beschränkten sich auf transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen. Um auszuschließen, dass die Beobachtungen zellspezifisch ausgelöst wurden, wurde die HIL-23-abhängige oder HIL-23-unabhängige STAT3-Phosphorylierung transfizierter U4C-Zellen (Fibrosarkomzellen) untersucht (siehe Abb. 27).

Hierfür wurden diese mit den p409-Expressionsvektoren für mIL-23R und mIL-12R β 1 (Floss *et al.*, 2013, Ciupka, 2014) transfiziert sowie co-transfiziert (siehe 2.3.2). 30 h nach Transfektion wurden die Zellen nach dem Waschen mit FCS-freiem Medium versehen und über Nacht kultiviert (siehe 2.3.1). Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation mit HIL-23. Nach der Zelllyse (siehe 2.4.1) wurden jeweils 50 μ g Gesamtprotein im SDS-PAA-Gel elektrophoretisch getrennt, die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und die Rezeptorexpression mittels Western Blot unter Verwendung der Detektionsantikörper α -mIL-23R (biotinyliert) und α -mIL-12R β 1 (biotinyliert) überprüft (siehe 2.4.3). Zur Analyse der biologischen Aktivität wurden zudem die Antikörper α -pSTAT3 und α -STAT3 verwendet. Im Gegensatz zu U4C-Zellen, die jeweils ausschließlich mIL-23R oder mIL-12R β 1 exprimierten, zeigten co-transfizierte U4C-Zellen eine deutliche STAT3-Aktivierung nach HIL-23-Stimulation. Außerdem wurde bei U4C-Zellen, transduziert mit der mIL-23-Rezeptorvariante, deren „erweiterte“ *stalk*-Region deletiert wurde (Δ 317-372), eine Zytokin-unabhängige Phosphorylierung von STAT3 nachgewiesen. Somit wurde die autonome Rezeptoraktivierung, die zuvor anhand von Ba/F3-

gp130-Zellen beobachtet wurde, in einer weiteren Zelllinie nach transienter Transfektion bestätigt. Zellspezifische Phänomene als Ursache der Rezeptoraktivierung konnten auf diese Weise ausgeschlossen werden.

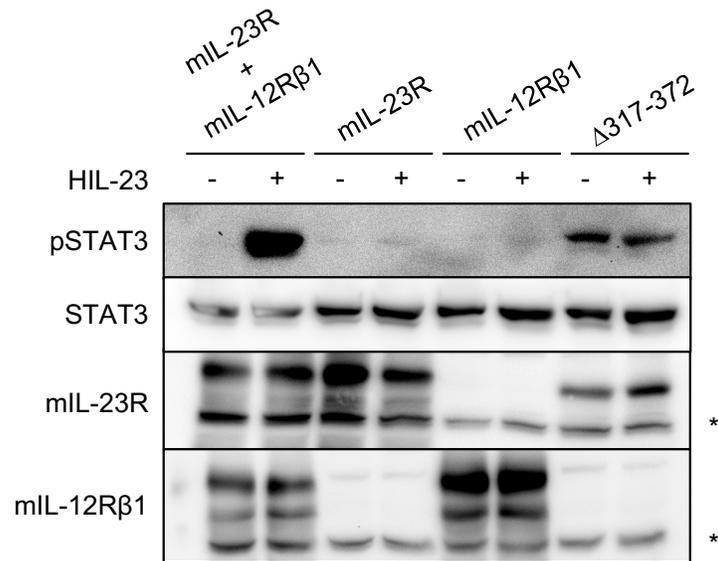


Abb. 27: Analyse der STAT3-Aktivierung von transient transfizierten Fibrosakromzellen. Transient transfizierte U4C-Zellen wurden ca. 30 h nach Transfektion gewaschen und über Nacht in FCS-freiem Medium kultiviert. Nach Stimulation mit HIL-23 (30 min) wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot analysiert. Pro Tasche eines SDS-PAA-Gels wurden 50 µg Protein aufgetragen. Die Antikörper α -pSTAT3, α -STAT3, α -mIL-23R (biotinyliert) und α -mIL-12R β 1 (biotinyliert) wurden zur Detektion benutzt. Unspezifische Signale wurden mit Sternen markiert. Wiedergabe der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von American Society for Microbiology (Hummel *et al.*, 2017), http://journals.asm.org/site/misc/ASM_Author_Statement.xhtml.

3.3 Ligandenunabhängige Aktivierung des IL-23R beruht auf der Homodimerisierung des Rezeptors

3.3.1 Klonierung von murinen IL-23R-Varianten mit GFP- und FLAG-tag

Die nähere Untersuchung der ligandenunabhängigen Aktivierung erfolgte mittels Co-Immunopräzipitation transfizierter CHO-K1-Zellen (siehe 2.4.4). Mithilfe dieser Methode konnten Rezeptoren hinsichtlich einer Dimerisierung überprüft werden.

Zunächst wurden p409-Vektoren mit dem murinen IL-23R (WT) oder der Variante Δ 317-372, jeweils markiert mit einem FLAG- bzw. GFP-tag, benötigt. Folgende Plasmide standen für diese Arbeit bereits zur Verfügung: p409-mIL-23R-GFP, p409-FLAG-mIL-23R

(AG Scheller) sowie die in 3.2.4 beschriebene Variante p409-mIL-23R Δ 317-372 (Ciupka, 2014). Mithilfe dieser Plasmide war es möglich, nach den in Abb. 28 dargestellten Klonierungsschritten, die Varianten p409-mIL-23R Δ 317-372-GFP und p409-FLAG-mIL-23R Δ 317-372 zu erzeugen.

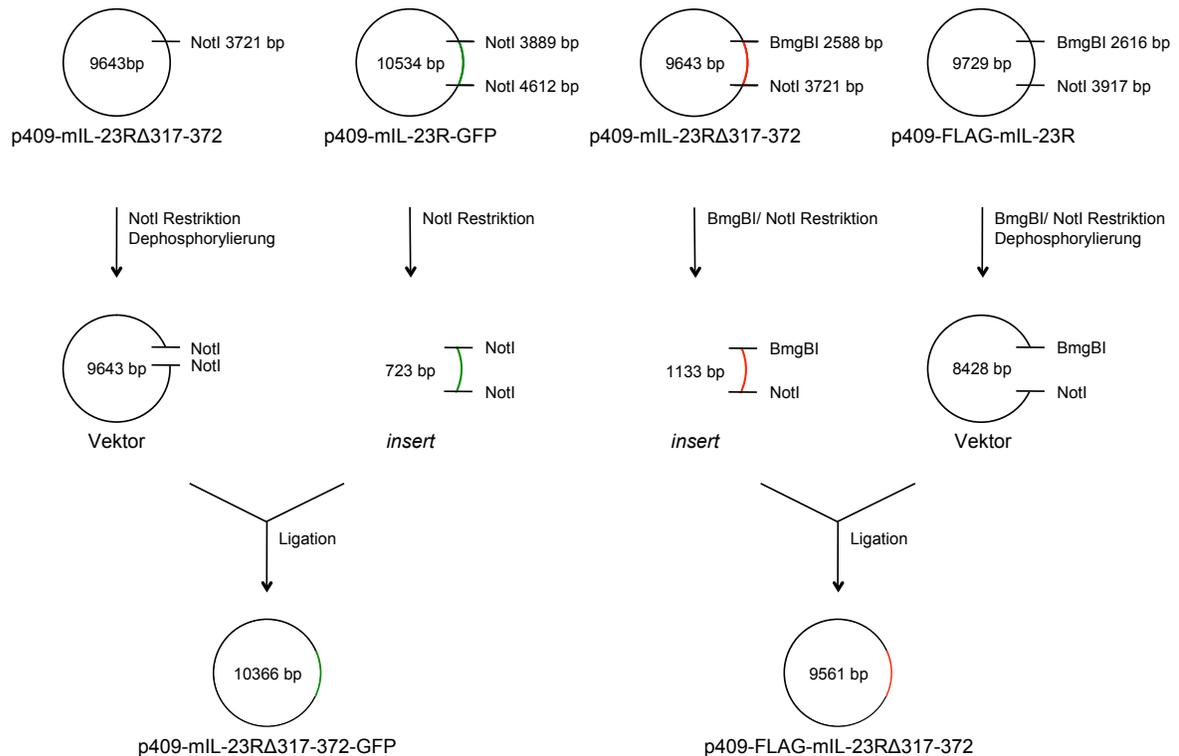


Abb. 28: Klonierungen der murinen Deletionsvarianten p409-mIL-23R Δ 317-372-GFP und p409-FLAG-mIL-23R Δ 317-372. p409-mIL-23R Δ 317-372, p409-mIL-23R-GFP und p409-FLAG-mIL-23R bildeten den Ausgangspunkt für die Klonierungen. p409-mIL-23R Δ 317-372 wurde zum einen mit NotI geschnitten, dephosphoryliert und mit dem ebenfalls mit NotI geschnittenen *insert* GFP (grün) aus p409-mIL-23R-GFP ligiert. Dies resultierte in dem Plasmid p409-mIL-23R Δ 317-372-GFP. Andererseits wurde durch BmgBI/NotI-Restriktion mIL-23R Δ 317-372 (rot) aus dem entsprechendem Vektor p409-mIL-23R Δ 317-372 geschnitten und in den ebenfalls mit BmgBI/NotI restringierten Vektor p409-FLAG-mIL-23R eingefügt. Dies resultierte in dem Plasmid p409-FLAG-mIL-23R Δ 317-372. Die Ligationsprodukte wurden in chemisch kompetente *E. coli* transformiert. Restriktionsschnittstellen sind als schwarze Linien gezeichnet. Fragmentgrößen (bp) von *inserts*, Vektoren sowie die Schnittstellen der genutzten Restriktionsenzyme sind markiert.

Für die Klonierung der erstgenannten Variante erfolgte die Restriktion entsprechender Plasmide (p409-mIL-23R Δ 317-372 und p409-mIL-23R-GFP) mit NotI (siehe 2.2.5). Der Vektor p409-

mIL-23R Δ 317-372 (9643 bp) wurde mit NotI linealisiert (siehe 2.2.5) und anschließend dephosphoryliert (siehe 2.2.7), um eine Religation zu vermeiden. Das *insert* GFP (723 bp) wurde durch NotI Restriktion von p409-mIL-23R-GFP erhalten (siehe 2.2.5). Die Klonierung der Variante p409-FLAG-mIL-23R Δ 317-372 erfolgte nach BmgBI/NotI Restriktion der Plasmide p409-FLAG-mIL-23R (9729 bp) und p409-mIL-23R Δ 317-372 (9643 bp) (siehe 2.2.5). Der Vektor p409-FLAG-mIL-23R wurde nach BmgBI/NotI Restriktion (8428 bp) (siehe 2.2.5) dephosphoryliert (siehe 2.2.7), um eine Religation zu vermeiden. Das *insert* mIL-23R Δ 317-372 (1133 bp) wurde durch BmgBI/NotI Restriktion (siehe 2.2.5) von p409-mIL-23R Δ 317-372 gewonnen. Die Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt (siehe 2.2.4), aus dem Gel eluiert (siehe 2.2.6) und ligiert (siehe 2.2.9). Nach Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen (siehe 2.2.1) wurden putative Klone mittels *colony*-PCR (siehe 2.2.10) sowie Plasmid-DNA-Minipräparation (siehe 2.2.2) analysiert.

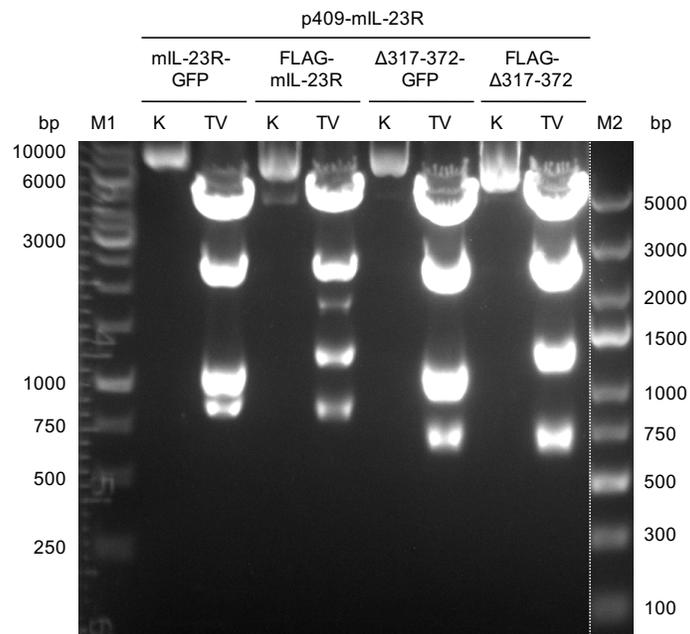


Abb. 29: Klonierung der Expressionsvektoren p409-mIL-23R Δ 317-372-GFP und p409-FLAG-mIL-23R Δ 317-372. Die in den Expressionsvektor p409 klonierten Deletionsvarianten des murinen IL-23R mit GFP- bzw. FLAG-tag und die bereits in p409 vorliegenden GFP- bzw. FLAG-markierten mIL-23Rs wurden mit EcoRI geschnitten (TV), mittels Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt und visualisiert. Zur Kontrolle wurde nicht gespaltene Plasmid-DNA aufgetragen (K). Fragmentgrößen (bp): p409-mIL-23R-GFP (873 + 1008 + 1067 + 2436 + 5150 bp); p409-FLAG-mIL-23R (873 + 1242 + 2464 + 5150 bp); p409-mIL-23R Δ 317-372-GFP (705 + 1008 + 1067 + 2436 + 5150 bp); p409-FLAG-mIL-23R Δ 317-372 (705 + 1242 + 2460 + 5150 bp). DNA-Größenstandard: *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* (M1), *GeneRuler™ Express DNA Ladder* (M2).

Anschließend wurde die DNA von positiven Klonen mittels Plasmid-DNA-Midipräparation isoliert (siehe 2.2.2) und durch Restriktionsspaltung überprüft (siehe 2.2.5).

In Abb. 29 ist eine Analyse der Klone mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.4) nach Restriktion mit EcoRI dargestellt (2.2.5). Aus Übersichtsgründen wurden auch die mit EcoRI behandelten Vektoren p409-mIL-23R-GFP und p409-FLAG-mIL-23R gezeigt. Die errechneten Fragmentgrößen wurden nach elektrophoretischer Trennung bestätigt. Diese betragen 873 bp, 1008 bp, 1067 bp, 2436 bp, 5150 bp (p409-mIL-23R-GFP), 873 bp, 1242 bp, 2464 bp, 5150 bp (p409-FLAG-mIL-23R), 705 bp, 1008 bp, 1067 bp, 2436 bp, 5150 bp (p409-mIL-23R Δ 317-372-GFP) sowie 705 bp, 1242 bp, 2460 bp, 5150 bp (p409-FLAG-mIL-23R Δ 317-372). Zur Kontrolle wurden zudem die nicht gespaltenen Plasmide aufgetragen.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Vektoren p409-mIL-23R Δ 317-372-GFP und p409-FLAG-mIL-23R Δ 317-372 sowie die bereits in der AG Scheller vorliegenden Plasmide p409-mIL-23R-GFP und p409-FLAG-mIL-23R wurden hinsichtlich der Expression in COS-7-Zellen geprüft.

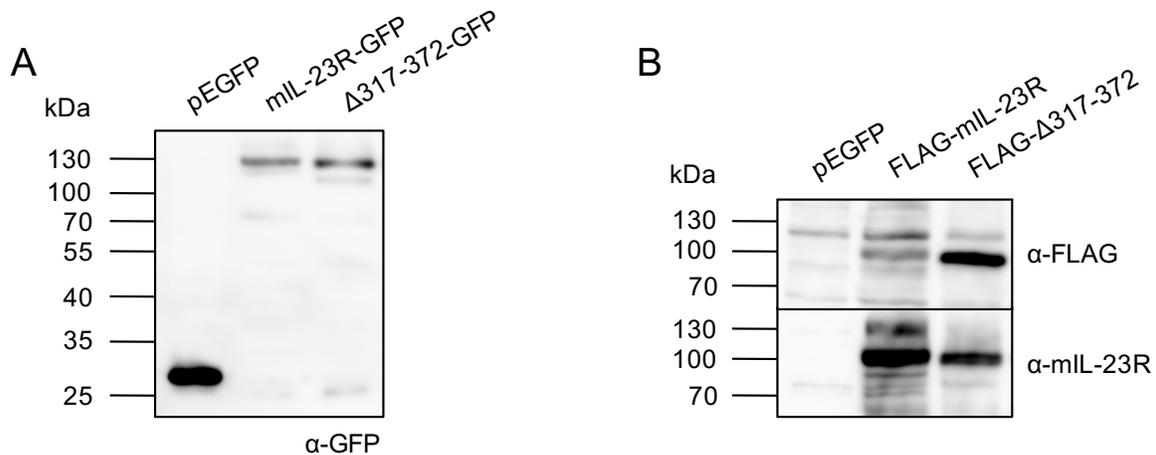


Abb. 30: Expression des murinen IL-23R und der Deletionsvariante Δ 317-372 mit C-terminalem GFP- bzw. N-terminalem FLAG-tag in transient transfizierten COS-7 Zellen. COS-7-Zellen wurden mit den jeweiligen Vektoren sowie dem Kontrollvektor pEGFP transfiziert. Nach 48 h erfolgt die Lyse der Zellen und die Analyse der Proben mittels Western Blot. Für die Detektion wurden die Primärantikörper α -GFP, α -mIL-23R (biotinyliert) und α -FLAG benutzt. Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

In Abb. 30 ist das Ergebnis der COS-7-Testexpression abgebildet. COS-7-Zellen wurden zuvor mit entsprechender DNA transfiziert (siehe 2.3.2), nach 48 h lysiert (siehe 2.4.1), mit Lämmli-

Puffer (5x) verdünnt und ca. 10-20 µl der Proben in die Taschen eines SDS-PAA-Gels für die Analyse per Western Blot gegeben (siehe 2.4.3). Als Negativkontrolle diente das Lysat von COS-7-Zellen, die mit dem Plasmid pEGFP transfiziert wurden. Zur Detektion der Proteine wurden die Antikörper gegen GFP- bzw. FLAG-*tag* sowie der biotinylierte Antikörper gegen mIL-23R eingesetzt. Alle Varianten mit Ausnahme der Negativkontrolle pEGFP zeigten eine Bande, stellvertretend für die entsprechende Rezeptorvariante. Somit wurde deren Expression in transient transfizierten COS-7-Zellen bestätigt. Erwartungsgemäß wurde nach Deletion von AS 317-372 (Δ 317-372) ein verringertes Molekulargewicht per Western Blot nachgewiesen.

3.3.2 Der Wildtyp mIL-23R und die *stalk*-Deletionsvariante bilden Homodimere

Eine mögliche Erklärung für die autonome Aktivierung der Rezeptorvariante mIL-23R Δ 317-372 könnte in der Homodimerisierung des IL-23R begründet sein.

Zur Überprüfung dieser Hypothese erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Doreen Floß eine Co-Transfektion von CHO-K1-Zellen (siehe 2.3.2) mit den Vektoren für FLAG-markierte Rezeptoren (FLAG-mIL-23R, FLAG-mIL-23R Δ 317-372), für GFP-markierte Rezeptoren (mIL-23R-GFP, mIL-23R Δ 317-372-GFP) oder für pEGFP (Siehe Abb. 31). 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert (siehe 2.4.1) und die GFP-markierten Rezeptoren mittels GFP-bindender Agarose präzipitiert (siehe 2.4.4). Jeweils ein als Kontrollprobe dienendes Aliquot entsprechender Zelllysate (L) wurde hierbei nicht präzipitiert (siehe 2.4.4). Anschließend folgte die Analyse der präzipitierten (IP) und unbehandelten Zelllysate (L) per Western Blot mit den Antikörpern gegen FLAG und GFP (siehe 2.4.3). Da nach dem Präzipitationsvorgang Proteine in höherer Konzentration vorlagen, sollte die per *immunoblot* visualisierte Chemilumineszenz der Co-Präzipitate (IP) immer stärker als die der Zelllysate (L) sein. Die durch α -GFP-Antikörper detektierten Proteine (IP) bestätigten, dass mIL-23R-GFP, mIL-23R Δ 317-372-GFP und pEGFP tatsächlich von der gekoppelten NHS-Agarose gebunden und präzipitiert wurden. Mittels α -FLAG detektierte Rezeptoren in den IP-Proben zeigten, dass diese Proteine zusammen mit dem Rezeptor-GFP-Fusionsproteinen an der Agarose gebunden waren. Folglich wurde auf die Homodimerisierung der *stalk*-Deletionsvariante geschlossen. Diese Homodimerisierung führte zur ligandenunabhängigen Aktivierung des IL-23R.

Ebenfalls wurde bei dieser Analyse die Bildung von Homodimeren des mIL-23R (WT) beobachtet, die jedoch nicht konstitutiv aktiv waren. Dieses Phänomen ist Schwerpunkt weiterer Untersuchungen in der AG Scheller.

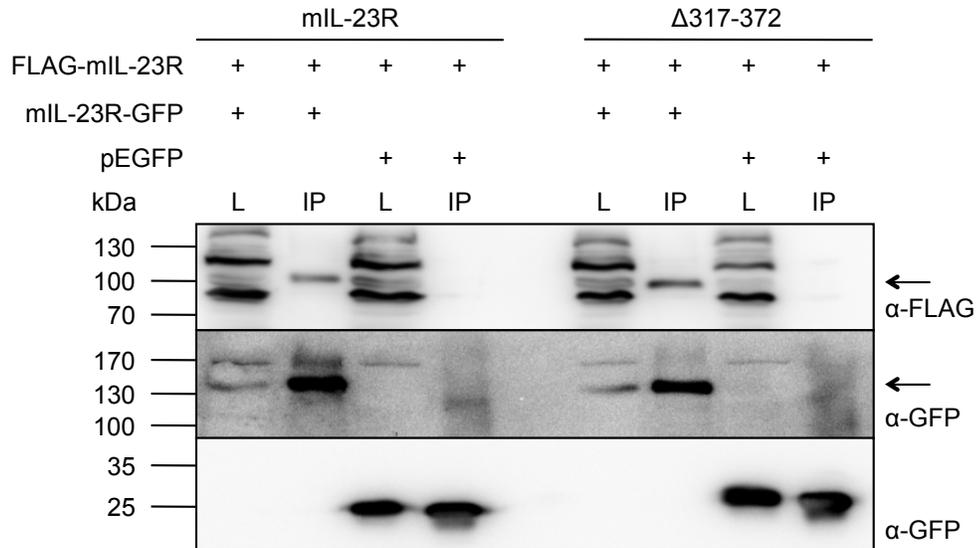


Abb. 31: Analyse der Co-Immunopräzipitation transient transfizierter CHO-K1-Zellen. CHO-K1-Zellen mit transienter Expression der Rezeptoren wurden ca. 30 h nach Transfektion gewaschen und über Nacht in FCS-freiem Medium kultiviert. Die Zellen wurden lysiert und jeweils ein Aliquot der Zelllysate (L) mittels Western Blot analysiert. Die verbliebenen Zelllysate wurde mit GFP-bindender Agarose über Nacht bei 4°C inkubiert, gewaschen und ebenfalls mittels Western Blot analysiert (IP). Zur Detektion wurden die Antikörper α -FLAG und α -GFP benutzt. Die Rezeptorbanden wurden mit Pfeilen markiert. Molekulargewichte sind in kDa angegeben. L: Zelllysate, IP: Co-Präzipitate. Wiedergabe der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von American Society for Microbiology (Hummel *et al.*, 2017), http://journals.asm.org/site/misc/ASM_Author_Statement.xhtml.

Auf diese Weise wurde festgestellt, dass die Rezeptoren FLAG-mIL-23R und FLAG-mIL-23R $\Delta 317-372$ wie erwartet nicht in der Lage waren, pEGFP alleine zu binden, hingegen aber die gleichartigen Rezeptoren als GFP-Fusionsproteine. Sowohl der mIL-23R (WT) als auch die Variante mit vollständig deletierter *stalk*-Region ($\Delta 317-372$) bilden Homodimere in der Abwesenheit von HIL-23. Die Homodimerisierung der Variante $\Delta 317-372$ induzierte die autonome Aktivierung des IL-23R ohne die Zugabe von Zytokin und ohne das Vorhandensein des IL-12R $\beta 1$.

4 Diskussion

4.1 Die Länge der *stalk*-Region ist entscheidend für die IL-23-Signaltransduktion

Aufbauend auf den Ergebnissen der Masterarbeit von Gregor Ciupka (Ciupka, 2014) sowie der Dissertation von Theresa Ackfeld (Ackfeld, 2020) diente diese Arbeit initial der weiteren Analyse der IL-23R-*stalk*-Region, deren Funktion bisher nur unvollständig geklärt ist.

Der IL-23R bildet zusammen mit IL-12R β 1 den Rezeptorkomplex des proinflammatorischen Zytokins IL-23, das maßgeblich an der Differenzierung pathogener T_H17-Zellen und als Mitglied der IL-12-Zytokinfamilie an der physiologischen und pathologischen Immunreaktion beteiligt ist (Parham *et al.*, 2002, Hasegawa *et al.*, 2016). Der Aufbau des IL-23R ähnelt dem der IL-6R-Untereinheit gp130. Abweichend zu gp130 besitzt der IL-23R anstelle der drei membranproximalen FNIII-Domänen eine unstrukturierte *stalk*-Region (Jones & Vignali, 2011, Schroder *et al.*, 2015). Somit besteht er aus den extrazellulären Domänen D1 (Ig-Domäne), den zytokinbindenden FNIII-Domänen D2 und D3, einer 37 (hIL-23R) bzw. 36 (mIL-23R) AS langen *stalk*-Region, sowie der Transmembran- und Intrazellulardomäne (Parham *et al.*, 2002). Weiterhin besitzt der mIL-23R eine 20 AS umfassende WQPWS-Duplikation der Domäne D3, die nicht eindeutig der Domäne D3 oder der *stalk*-Region zugeordnet werden kann (Parham *et al.*, 2002, Hummel *et al.*, 2017).

Aufgrund einer geringeren Homologie der *stalk*-Regionen des hIL-23R und mIL-23R wird davon ausgegangen, dass die IL-23R-*stalk*-Region keinen Beitrag zur Zytokinbindung leistet (Hummel *et al.*, 2017). Zudem demonstrierte T. Ackfeld anhand von Co-Immunopräzipitationsexperimenten, dass Deletionen innerhalb der mIL-23R-*stalk*-Region keine Auswirkungen auf das Zytokinbindungsverhalten haben (Ackfeld, 2020, Hummel *et al.*, 2017). Demnach wurde die Bedeutung der *stalk*-Region für die IL-23-Signaltransduktion untersucht.

Die Bindung von IL-23 an den heterodimeren Rezeptorkomplex aus IL-23R und IL-12R β 1 führt über die Aktivierung des Jak/STAT-Wegs überwiegend zur Phosphorylierung von STAT3 (Parham *et al.*, 2002). Hierdurch wird die Proliferation und Differenzierung von Zielzellen gesteuert (Rawlings *et al.*, 2004). Zur Analyse der IL-23-Signaltransduktion wurden daher bestimmte Zelllinien mit den Rezeptoren IL-23R und den IL-12R β 1 retroviral transduziert

und hinsichtlich der zytokinabhängigen Zellproliferation und STAT3-Aktivierung untersucht (Floss *et al.*, 2013). Besonders geeignet für die Untersuchung der Signaltransduktion von Zytokinen sind murine prä-B-Zellen (Ba/F3), die IL-3-abhängig durch die Aktivierung von STAT5 proliferieren (Gearing *et al.*, 1994, Floss *et al.*, 2013, Floss & Scheller, 2019). Nach stabiler Transduktion von gp130 in Ba/F3-Zellen (Ba/F3-gp130-Zellen), induziert die Stimulation durch hIL-6, einem Fusionsprotein aus löslichem IL-6R (sIL-6R) und IL-6, eine Zellproliferation und Aktivierung von STAT3 (Fischer *et al.*, 1997). Ba/F3-gp130-Zellen mit zusätzlicher Expression des IL-23R und IL-12R β 1 auf der Zelloberfläche weisen darüber hinaus eine hIL-23-abhängige Zellproliferation und Aktivierung von STAT3-Aktivierung auf (Floss *et al.*, 2013). hIL-23 stellt hierbei ein Fusionsprotein aus den IL-23-Untereinheiten p40 und p19 (hIL-23) dar (Oppmann *et al.*, 2000). Im Rahmen dieser und der zugrundeliegenden Arbeiten innerhalb der AG Scheller wurden verschiedenste Ba/F3-gp130-Zelllinien zum Charakterisieren der IL-23R-*stalk*-Region generiert und untersucht.

Um herauszufinden, ob die genaue Aminosäuresequenz der hIL-23R-*stalk*-Region entscheidend für die Signaltransduktion ist, wurde in der AG Scheller ein IL-23R-Chimär kloniert, dessen *stalk*-Region vollständig entfernt und durch die AS der hIL-6R-*stalk*-Region ersetzt wurde (hIL-23R/hIL-6R-*stalk*). Zwar waren die Zellproliferation und die STAT3-Aktivierung von Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R/hIL-6R-*stalk*-Zellen verglichen mit der WT-Zelllinie (Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R) geringfügig reduziert, dennoch zeigten sie eine deutliche biologische Aktivität. Daher scheint die Aminosäuresequenz der hIL-23R-*stalk*-Region unwesentlich für die Rezeptorfunktion zu sein (Hummel *et al.*, 2017).

Vielmehr lassen die zugrundeliegenden Ergebnisse der Masterarbeit von Gregor Ciupka und der Dissertation von Theresa Ackfeld vermuten, dass vor allem die Länge der IL-23R-*stalk*-Region bestimmend für die IL-23-Signaltransduktion ist (Ciupka, 2014, Ackfeld, 2020).

Zur Verifizierung der von T. Ackfeld erhobenen Daten wurden im Rahmen dieser Dissertation drei Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-Zelllinien generiert, die Varianten des hIL-23R mit *stalk*-Deletionen von 10 AS (Δ 344-353), 20 AS (Δ 334-353) oder 31 AS (Δ 323-353) (siehe Abb. 32A) exprimierten (siehe 3.2.2). Gleichartige Zelllinien waren zuvor bereits von Theresa Ackfeld generiert worden (Ackfeld, 2020).

A

	D3 218-316	<i>stalk</i> 317-353	TM 354-376
hIL-23R (WT)	...VRQETGKRYWQPWSSPFHKTP-----	ETVPQVTSKAFQHDWTWNSGLTVASISTGHLTSDNRGDI	IGLLLGMIVFVAVMLSILS...
Δ344-353	...VRQETGKRYWQPWSSPFHKTP-----	ETVPQVTSKAFQHDWTWNSGLTVASIST-----	IGLLLGMIVFVAVMLSILS...
Δ334-353	...VRQETGKRYWQPWSSPFHKTP-----	ETVPQVTSKAFQHDWTN-----	IGLLLGMIVFVAVMLSILS...
Δ323-353	...VRQETGKRYWQPWSSPFHKTP-----	ETVPQV-----	IGLLLGMIVFVAVMLSILS...

B

	D3 218-316	<u>WQPWS-Duplikation</u> 317-336	<i>stalk</i> 337-372	TM 373-395	
mIL-23R (WT)	...VRQETGKRNWQPWSSPFVHQT	<u>SOETGKRNWQPWSSPFVHQT</u>	STVTSQVTSKAKSS-HEPQKMEMLSATIFR	GHFASGNHQDI	IGLLSGMVFLAIMLPIFS...
Δ363-372	...VRQETGKRNWQPWSSPFVHQT	<u>SOETGKRNWQPWSSPFVHQT</u>	STVTSQVTSKAKSS-HEPQKMEMLSATIFR-----	-----	IGLLSGMVFLAIMLPIFS...
Δ353-372	...VRQETGKRNWQPWSSPFVHQT	<u>SOETGKRNWQPWSSPFVHQT</u>	STVTSQVTSKAKSS-HEPQK-----	-----	IGLLSGMVFLAIMLPIFS...
Δ343-372	...VRQETGKRNWQPWSSPFVHQT	<u>SOETGKRNWQPWSSPFVHQT</u>	STVTSQV-----	-----	IGLLSGMVFLAIMLPIFS...
Δ333-372	...VRQETGKRNWQPWSSPFVHQT	<u>SOETGKRNWQPWSSPFV-----</u>	-----	-----	IGLLSGMVFLAIMLPIFS...
* Δ336-372	...VRQETGKRNWQPWSSPFVHQT	<u>SOETGKRNWQPWSSPFVHQT</u>	-----	-----	IGLLSGMVFLAIMLPIFS...
* Δ337-372	...VRQETGKRNWQPWSSPFVHQT	<u>SOETGKRNWQPWSSPFVHQT</u>	-----	-----	IGLLSGMVFLAIMLPIFS...

Abb. 32: Deletionsvarianten des humanen und murinen IL-23R zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Länge der *stalk*-Region und der IL-23-Signaltransduktion. Die Aminosäuresequenzen des humanen (A) und murinen (B) IL-23R (WT) sowie der Deletionsvarianten sind für den Abschnitt von V294-S371 (hIL-23R) bzw. V294-S390 (mIL-23R) dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit der humanen und murinen Rezeptoren wurde der Bereich im hIL-23R, der der einzigartigen WQPWS-Duplikation des mIL-23R entspricht, durch Striche veranschaulicht. Ebenso wurden im Rahmen der Klonierungen deletierte AS durch Striche gekennzeichnet. Domäne D3 wird in schwarzen, die *stalk*-Region (*stalk*) in roten und die Transmembrandomäne (TM) in grauen Buchstaben dargestellt. Die WQPWS-Duplikation ist unterstrichen, das WQPWS-Motiv in Domäne D3 und WQPWS-Duplikation fett hervorgehoben. Mit Stern markiert sind die im Rahmen dieser Dissertation neu generierten Deletionsvarianten mIL-23RΔ336-372 und mIL-23RΔ337-372.

Bei *stalk*-Deletionen von 10 AS (hIL-23RΔ344-353) war die Rezeptorfunktion der Deletionsvariante im Vergleich zum hIL-23R (WT) nicht beeinträchtigt. Deletionen von 31 AS (Δ323-353) zeigten eine reduzierte Zellproliferation und deutlich verringerte, aber weiterhin nachweisbare STAT3-Aktivierung im Vergleich zu Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1-hIL-23R-Zellen (siehe 3.2.2). Diese Beobachtungen stimmten mit den im Rahmen der Dissertation von T. Ackfeld erhobene Daten überein (Ackfeld, 2020) und bestätigten, dass die Länge der hIL-23R-*stalk*-Region die IL-23-Signaltransduktion beeinflusst. Überraschend war hingegen das Verhalten der Zelllinie Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1-hIL-23RΔ334-353, die sowohl in den Untersuchungen von T. Ackfeld, als auch im Rahmen dieser Dissertation, eine deutliche

STAT3-Aktivierung bei vollständig aufgehobener Zellproliferation aufwies (siehe 3.2.2). Unter Verwendung des Jak-Inhibitors P6, der eine STAT3-Phosphorylierung der Variante $\Delta 334-353$ wie auch des hIL-23R (WT) in Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-Zellen verhinderte, demonstrierte T. Ackfeld, dass die STAT3-Phosphorylierung durch eine kanonische HIL-23-abhängige Signaltransduktion erfolgte (Ackfeld, 2020, Hummel *et al.*, 2017). Daher blieb die genaue Ursache für den Abbruch der Zellproliferation unklar und wurde auch im Rahmen dieser Dissertation nicht geklärt. Vermutlich spielen weitere strukturelle Besonderheiten, die über die reine Länge der *stalk*-Region hinausgehen, eine Rolle. Abgesehen hiervon ließ sich für den hIL-23R feststellen, dass eine *stalk*-Region mit einer Deletion von 10 AS ($\Delta 344-353$) ausreichend für eine uneingeschränkte Rezeptoraktivität ist. Für eine erhaltene aber reduzierte Rezeptoraktivität werden 6 AS der hIL-23R-*stalk*-Region ($\Delta 323-353$) benötigt (Hummel *et al.*, 2017).

Analog wurden auch Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-Zelllinien mit stabiler Expression der mIL-23R (WT) oder Deletionsvarianten des mIL-23R mittels Proliferations- und Stimulationsassay untersucht (siehe 3.2.5). Dies erfolgte bereits im Rahmen der Masterarbeit von Gregor Ciupka und der Dissertation von T. Ackfeld für die Zelllinien Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R (WT), Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R $\Delta 363-372$, Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R $\Delta 353-372$, Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R $\Delta 343-372$, sowie Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R $\Delta 333-372$ (Ciupka, 2014, Ackfeld, 2020). Bei den entsprechenden mIL-23R-Deletionsvarianten wurden jeweils 10 AS ($\Delta 363-372$), 20 AS ($\Delta 353-372$) oder 30 AS ($\Delta 343-372$) der *stalk*-Region, sowie die komplette *stalk*-Region inklusive 4 AS (H333-S336) der WQPWS-Duplikation ($\Delta 333-372$) deletiert (Ciupka, 2014) (siehe Abb. 32B). Im Rahmen dieser Dissertation wurden zwei weitere mIL-23R-Varianten mit vollständiger Deletion der *stalk*-Region ($\Delta 336-372$ und $\Delta 337-372$) kloniert (siehe 3.2.4). Der Variante $\Delta 336-372$ fehlte zusätzlich eine AS (S336) der WQPWS-Duplikation (siehe Abb. 32B). Die resultierenden Zelllinien Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R $\Delta 336-372$ und Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R $\Delta 337-372$ wurden ebenfalls hinsichtlich HIL-23-abhängiger Zellproliferation und STAT3-Aktivierung analysiert (siehe 3.2.5). Die Ergebnisse belegten, dass eine schrittweise Verkürzung der mIL-23R-*stalk*-Region zu einer zunehmend eingeschränkten biologischen Aktivität entsprechend transduzierter Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-Zellen führt (Hummel *et al.*, 2017). Während Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R $\Delta 363-372$ hinsichtlich der HIL-23-abhängigen Zellproliferation der Zelllinie Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R (WT) glichen und nur eine

geringfügig eingeschränkte STAT3-Aktivierung zeigten, war die Zellproliferation und insbesondere die STAT3-Aktivierung der Zelllinien 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 zwar deutlich geringer als bei der WT-Zelllinie, aber dennoch nachweisbar. In Zelllinien mit Deletion der gesamten *stalk*-Region (Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 337-372 (siehe 3.2.5), Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 336-372 (siehe 3.2.5) und Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 333-372 wurde die IL-23-Signaltransduktion nahezu vollständig unterbunden (Hummel *et al.*, 2017). Analog zum hIL-23R wird demnach eine fast vollständige Länge (26 AS) der mIL-23R *stalk*-Region (Δ 363-372) für eine erhaltene Rezeptorfunktion und eine Länge von mindestens 6 AS (Δ 343-372) für eine Restaktivität benötigt (Ackfeld, 2020, Hummel *et al.*, 2017).

Bereits für den hIL-6R wurde gezeigt, dass die IL-6R-*stalk*-Region als Distanzhalter dient, um die extrazellulären Domänen in einen bestimmten Abstand zur Plasmamembran zu bringen. Erst hierdurch wird eine Bindung des Zykons (IL-6) an seinen Rezeptorkomplex und somit eine Signaltransduktion ermöglicht (Baran *et al.*, 2013). Passend zu den Ergebnissen für den humanen und murinen IL-23R waren für eine uneingeschränkte klassische IL-6-Signaltransduktion mindestens 22 AS der 52 AS langen *stalk*-Region notwendig (Baran *et al.*, 2013).

Mithilfe der Daten von T. Ackfeld und Gregor Ciupka wurde die Funktion als Distanzhalters auch auf die humane und murine IL-23R-*stalk*-Region übertragen (Ackfeld, 2020, Ciupka, 2014). Die Beobachtungen im Rahmen dieser Dissertation bestätigen gleichfalls diese Hypothese. Allerdings muss aufgrund der auffälligen STAT3-Aktivierung bei fehlender Zellproliferation der Zelllinie Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 334-353 (siehe 3.2.2) angenommen werden, dass innerhalb der hIL-23R-*stalk*-Region weiterhin unbekannte Faktoren für die IL-23-Signaltransduktion bedeutsam sind (Hummel *et al.*, 2017).

Schon seit Längerem ist die Rolle der IL-6R-*stalk*-Region beim *ectodomain shedding* durch ADAM10 und ADAM17 nachgewiesen (Garbers *et al.*, 2011, Baran *et al.*, 2013). Auch der Schnittstellenbereich der Protease ADAM17 wurde innerhalb der IL-23R-*stalk*-Region identifiziert. Hierbei handelte es sich um die Rezeptorabschnitte zwischen AS 333-342 (mIL-23R) und AS 323-333 (hIL-23R) (Franke *et al.*, 2016). Grundsätzlich sind die Proteasen ADAM10 und ADAM17 am *ectodomain shedding* des IL-23R beteiligt. Eine Aktivität dieser Proteasen führt zur Entstehung löslicher IL-23Rs (sIL-23Rs) mit erhaltener Fähigkeit zur Bindung von IL-23. Hierdurch verringert sich die Expression der IL-23Rs auf der

Zelloberfläche, wodurch die Zelle mutmaßlich weniger auf eine Stimulation durch IL-23 anspricht. Außerdem könnten sIL-23Rs als kompetitive Antagonisten durch die direkte Bindung von IL-23 die IL-23-Signalgebung hemmen (Yu & Gallagher, 2010, Yu *et al.*, 2015, Franke *et al.*, 2016).

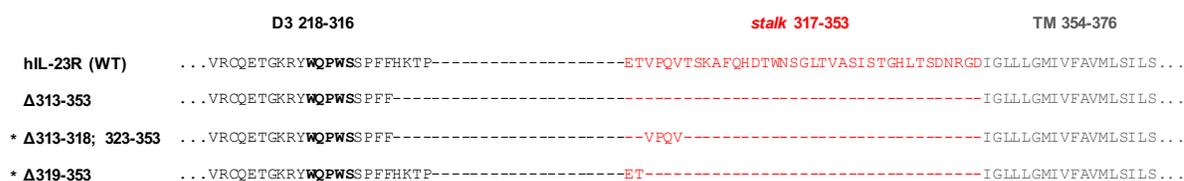
Somit scheint die IL-23R-*stalk*-Region zwei Funktionen zu besitzen. Einerseits ist sie mit ausreichender Länge als Distanzhalter, der die extrazellulären Domänen im richtigen Abstand zur Zellmembran positioniert, eine wesentliche Voraussetzung für die IL-23-Signaltransduktion. Andererseits könnte sie als Schnittstelle von ADAM17 auch für eine natürliche Regulation beziehungsweise Hemmung der IL-23-Signaltransduktion wichtig sein.

4.2 Das Entfernen der *stalk*-Region (hIL-23R) bzw. der „erweiterten“ *stalk*-Region (mIL-23R) führt zu einer ligandenunabhängigen Rezeptoraktivierung

Zur Untersuchung, welche Bedeutung die Länge der *stalk*-Region für die Funktion des hIL-23R hat, wurde ursprünglich ebenfalls eine hIL-23R-Variante (hIL-23R Δ 313-353) mit vollständig entfernter *stalk*-Region kloniert (Ackfeld, 2020) (siehe Abb. 33A). Eine Analyse von entsprechend transduzierten Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-Zellen zeigte eine ligandenunabhängige Zellproliferation und Aktivierung von STAT3 (Ackfeld, 2020). Somit bestand die Vermutung, dass sich die Eigenschaften dieser Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 313-353-Zellen auf die Deletion der *stalk*-Region zurückführen ließen. Allerdings fehlten dieser Variante zusätzlich vier AS (H313-P316) der Domäne D3. Daher hätte die Deletion der Domäne D3 (H313-P316) gleichermaßen die Ursache für die konstitutive Rezeptoraktivität des hIL-23R Δ 313-353 sein können. Um diese Hypothese auszuschließen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei weitere Rezeptorvarianten (Δ 313-318; 323-353 und Δ 319-353) kloniert und analysiert (siehe 3.2.1). Die Variante Δ 313-318; 323-353 ähnelte Δ 313-353, da bei ihr ebenfalls die vier AS (H313-P316) der Domäne D3 entfernt wurden, allerdings besaß sie vier AS (V319-V322) der *stalk*-Region. Hingegen wies die Variante Δ 319-353 eine vollständige Deletion (mit Ausnahme von zwei AS E317 und T318) der *stalk*-Region auf (siehe Abb. 33A). Die generierten Ba/F3-Zelllinien (Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 313-353, Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 und Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 319-353) wurden schließlich hinsichtlich der HIL-23-abhängigen Zellproliferation und der STAT3-Aktivierung untersucht (siehe 3.2.2). Hierbei ließen sich die Beobachtungen von T. Ackfeld verifizieren. Zudem erfolgte der

Nachweis einer ligandenunabhängigen Zellproliferation und STAT3-Aktivierung der bereits beschriebenen Zelllinien Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 und Ba/F3-gp130/hIL-12R β 1-hIL-23R Δ 319-353. Eine konstitutive Rezeptoraktivierung wurde somit für alle hIL-23R-Varianten, die sich durch eine vollständige oder nahezu vollständige Deletion der *stalk*-Region auszeichneten, demonstriert.

A



B

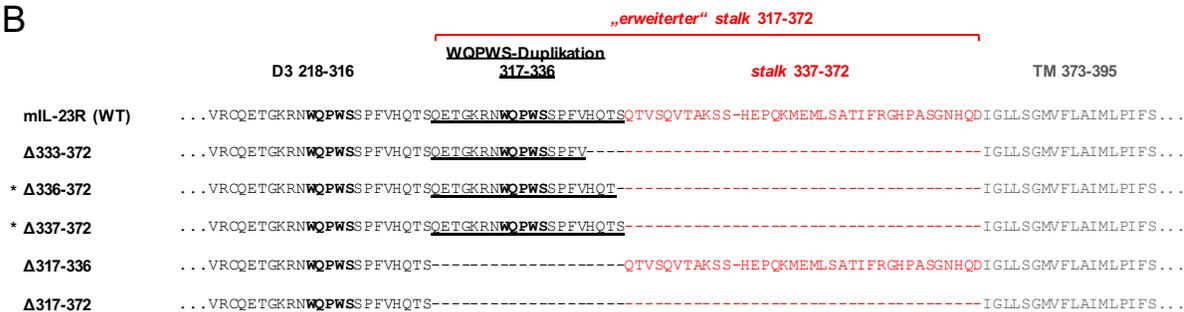


Abb. 33: Deletionsvarianten des humanen und murinen IL-23R zur Untersuchung einer ligandenunabhängigen IL-23-Rezeptoraktivierung. Die Aminosäuresequenzen des humanen (A) und murinen (B) IL-23R (WT) sowie der Deletionsvarianten werden für den Abschnitt von V294-S371 (hIL-23R) bzw. V294-S390 (mIL-23R) gegenübergestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit der humanen und murinen Rezeptoren wurde der Bereich im hIL-23R, der der einzigartigen WQPWS-Duplikation des mIL-23R entspricht, durch Striche veranschaulicht. Weiterhin wurden im Rahmen der Klonierungen deletierte AS durch Striche gekennzeichnet. Domäne D3 wird in schwarzen, die *stalk*-Region (*stalk*) in roten und die Transmembrandomäne (TM) in grauen Buchstaben dargestellt. Die WQPWS-Duplikation ist unterstrichen, das WQPWS-Motiv in Domäne D3 und WQPWS-Duplikation fett hervorgehoben. Mit Stern markiert sind die im Rahmen dieser Dissertation neu generierten Deletionsvarianten hIL-23R Δ 313-319; 323-353, hIL-23R Δ 319-353 sowie mIL-23R Δ 336-372 und mIL-23R Δ 337-372.

Für den murinen IL-23R existierte ebenfalls einer Variante mit vollständig deletierter *stalk*-Region Δ 333-372 (Ciupka, 2014, Ackfeld, 2020) (siehe Abb. 33B). Transduzierte Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 333-372-Zellen wiesen jedoch keine konstitutive Aktivität auf.

Stattdessen zeigten sie praktisch keine Zellproliferation und Aktivierung von STAT3 (siehe 4.1) (Ciupka, 2014, Ackfeld, 2020). Vergleichbare Eigenschaften hatten die im Rahmen dieser Arbeit generierten Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-Zelllinien mit mIL-23R-*stalk*-Deletionsvarianten Δ 336-372 und Δ 337-372 (Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 336-372, Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 337-372) (siehe 3.2.5). Im Gegensatz zur Variante Δ 333-372, der neben der *stalk*-Region zudem vier AS (H333-S336) der WQPWS-Duplikation fehlten, zeichneten sich die neuen Varianten bei vollständiger Deletion der *stalk*-Region durch eine gänzlich erhaltene (Δ 337-372) beziehungsweise eine um eine AS gekürzte (Δ 336-372) WQPWS-Duplikation aus (siehe Abb. 33B). Diese 20 AS lange WQPWS-Duplikation lässt sich nicht beim humanen IL-23R finden und ist somit eine Besonderheit des mIL-23R (Parham *et al.*, 2002, Hummel *et al.*, 2017). Deletionen des mIL-23R, die ausschließlich den Bereich der WQPWS-Duplikation umfassten (mIL-23R Δ 317-336) (siehe Abb. 33B), zeigten keine Auswirkungen auf die Rezeptoraktivität, da bei der entsprechend transduzierten Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 317-336-Zelllinie eine vergleichbare HIL-23-abhängige Zellproliferation und STAT3-Aktivierung wie bei der Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R-Zelllinie (WT) nachgewiesen wurde (Ciupka, 2014, Ackfeld, 2020, Hummel *et al.*, 2017). Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass die WQPWS-Duplikation unbedeutend für die biologische Aktivität des mIL-23R ist und eher einen Teil der *stalk*-Region als der Domäne D3 bildet (Hummel *et al.*, 2017).

Ba/F3-gp130/mIL-12R β 1-mIL-23R Δ 317-372-Zellen mit vollständiger Deletion der *stalk*-Region inklusive Deletion der WQPWS-Duplikation („erweiterte“ *stalk*-Region) (siehe Abb. 33B) zeichneten sich durch eine HIL-23-unabhängige Zellproliferation und STAT3-Aktivierung aus (Ciupka, 2014, Ackfeld, 2020). Das wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Wiederholung der Untersuchungen verifiziert (siehe 3.2.5). Somit führten nur die kürzesten *stalk*-Deletionsvarianten des humanen und murinen IL-23R mit vollständiger (oder nahezu vollständiger (Δ 313-318; 323-353)) Deletion der *stalk*-Region (hIL-23R) beziehungsweise vollständiger Deletion der „erweiterten“ *stalk*-Region (mIL-23R) zu einer konstitutiven Rezeptoraktivierung.

Infolgedessen stellte sich die Frage, wodurch sich eine solche ligandenunabhängige, autonome Rezeptoraktivierung erklären ließ. T. Ackfeld untersuchte in Co-Immunopräzipitationsexperimenten das Bindungsverhalten von HIL-23 mit Fc-tag (HIL-23Fc) zu der mIL-23R Δ 317-372-Variante. Durch eine Präzipitation von HIL-23Fc mittels Protein A wurde ebenfalls mIL-23R Δ 317-372 präzipitiert und somit demonstriert, dass die

Zytokinbindung an die entsprechende Rezeptorvariante unbeeinträchtigt war (Ackfeld, 2020). Folglich schienen die Struktur der extrazellulären Domänen erhalten und fehlerhaft gefaltete IL-23-Rezeptorketten als Ursache für eine konstitutive Rezeptoraktivierung unwahrscheinlich zu sein (Hummel *et al.*, 2017).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welche Rolle der IL-12R β 1 bei der ligandenunabhängigen, autonomen Rezeptoraktivierung der humanen und murinen IL-23-Rezeptorvarianten spielt. Hierfür wurden Ba/F3-gp130-Zelllinien ohne Expression des hIL-12R β 1 mit hIL-23R-Deletionsvarianten und analog Ba/F3-gp130-Zelllinien ohne Expression des mIL-12R β 1 mit mIL-23R-Deletionsvarianten generiert. Im Rahmen der Dissertation von T. Ackfeld entstanden auf diese Weise die Zelllinien Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 344-353, Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 334-353, Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 323-353, Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 313-353 und Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 353-372, Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 343-372, Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 333-372, Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 317-372 (Ackfeld, 2020). Zudem wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich die Zelllinien Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 313-318; 323-353 und Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 319-353 sowie Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 336-372 und Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 337-372-Zellen generiert (siehe 3.2.3, 3.2.6). Die Zelllinien wurden hinsichtlich der HIL-23-abhängigen Zellproliferation und STAT3-Aktivierung untersucht (siehe 3.2.3, 3.2.6). Mit Ausnahme einer geringfügigen STAT3-Aktivierung der Zelllinien Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 334-353 nach Stimulation durch HIL-23 und einer leicht erhöhten Hintergrundaktivität der Zelllinie Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 333-372 deckten sich die erhobenen Daten mit den Ergebnissen von T. Ackfeld. Wie vermutet zeigten Ba/F3-gp130-Zelllinien mit humanen und murinen IL-23R-*stalk*-Deletionsvarianten auf der Zelloberfläche, deren *stalk*-Regionen (hIL-23R) beziehungsweise „erweiterte“ *stalk*-Regionen (mIL-23R) nur teilweise deletiert wurden (Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 344-353, Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 334-353, Ba/F3-gp130-hIL-23R Δ 323-353, Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 353-372, Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 343-372, Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 333-372, Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 336-372, Ba/F3-gp130-mIL-23R Δ 337-372), keine biologische Aktivität nach Stimulation mit HIL-23.

Die Ba/F3-gp130-Zelllinien, die mit den Deletionsvarianten hIL-23R Δ 313-353, hIL-23R Δ 313-318; 323-353 und hIL-23R Δ 319-353 sowie mIL-23R Δ 317-372 transduziert wurden, wiesen hingegen eine ligandenunabhängige Zellproliferation und STAT3-Aktivierung auf (siehe 3.2.3, 3.2.6). Wie bereits beschrieben zeigten die letztgenannten Deletionsvarianten auch in Ba/F3-gp130-Zellen mit Expression des IL-12R β 1 (Ba/F3-gp130/IL-12R β 1-Zellen) eine

vergleichbare konstitutive Rezeptoraktivität (siehe 3.2.2, 3.2.5). Eine ligandenunabhängige, autonome Rezeptoraktivierung wird daher ohne den Einfluss von IL-12R β 1 ausgelöst.

Um eine konstitutive Rezeptoraktivierung unabhängig von Ba/F3-gp130-Zellen zu verifizieren, wurden in dieser Arbeit transient transfizierte U4C-Zellen (Fibrosarkomzellen) hinsichtlich einer STAT3-Aktivierung nach vorhandener oder fehlender hIL-23-Stimulation untersucht (siehe 3.2.7). Auf diese Weise wurde auch bei U4C-Zellen mit transienter Expression der Deletionsvariante mIL-23R Δ 317-372 eine hIL-23-unabhängige Phosphorylierung von STAT3 gezeigt. U4C-Zellen, die jeweils entweder den mIL-23R oder den mIL-12R β 1 transient exprimierten, sowie U4C-Zellen mit transienter Co-Expression des mIL-23R und mIL-12R β 1 zeigten wie zu erwarten keine STAT3-Aktivierung ohne Stimulation durch hIL-23. In der AG Scheller wurde zudem eine hIL-23R-Variante mit vollständiger Deletion der *stalk*-Region untersucht (hIL-23R Δ 319-353) und gleichfalls eine ligandenunabhängige Aktivierung von STAT3 beobachtet (Hummel *et al.*, 2017).

Da sowohl Ba/F3-gp130-Zellen als auch U4C-Zellen den Rezeptor gp130 auf der Zelloberfläche ausbilden, wäre auch eine Beteiligung des Rezeptors an der autonomen IL-23R-Aktivierung möglich. Allerdings wurde diese Hypothese in weiterführenden Untersuchungen widerlegt. So zeigten auch Ba/F3-Zellen ohne Expression des gp130, die mit für mIL-23R Δ 317-372 kodierender cDNA retroviral transduziert wurden, eine ligandenunabhängige, autonome STAT3-Phosphorylierung (Hummel *et al.*, 2017).

Zusammenfassend wurde beschrieben, dass eine konstitutive IL-23R-Aktivierung durch eine vollständige Deletion der *stalk*-Region (hIL-23R) oder der „erweiterten“ *stalk*-Region (mIL-23R) hervorgerufen wurde. Sie ließ sich nicht auf strukturelle Besonderheiten der extrazellulären Domänen zurückführen und trat unabhängig von IL-12R β 1 auf. Auch zellspezifische Phänomene oder eine Beteiligung des Rezeptors gp130 wurden ausgeschlossen.

4.3 Eine konstitutive Rezeptoraktivierung kann durch die künstliche Dimerisierung von Rezeptoren hervorgerufen werden

Letztlich veranschaulichen die Daten dieser Arbeit, sowie der Dissertation von T. Ackfeld und der Masterarbeit von G. Ciupka, Methoden zum synthetischen Generieren konstitutiv aktiver IL-23-Rezeptoren durch Deletionen innerhalb der extrazellulären Rezeptorbereiche.

Anhand weiterer Deletionsvarianten wurde in der AG Scheller die Übertragbarkeit dieser Methoden auf gp130-Rezeptoren untersucht. Wie bereits beschrieben, besitzt gp130

sechs extrazelluläre Domänen, von denen die zwei membrandistalen FNIII-Domänen die zytokinbindenden Domänen bilden (Grotzinger *et al.*, 1999). Tatsächlich weist auch gp130 eine im Vergleich sehr kleine *stalk*-Region von 6 AS auf. Diese befindet sich zwischen der extrazellulären und der Transmembran-Domäne (Lamertz *et al.*, 2018). Die FNIII-Domänen D4 bis D6 sind wichtig für eine strukturelle Konformationsänderung, die durch die entsprechende Ligandenbindung induziert wird und zur Aktivierung intrazellulärer Januskinasen nach korrekter Positionierung der Intrazellulardomänen führt (Grotzinger *et al.*, 1999). Ein Entfernen der Domänen D4 bis D6 in Kombination mit einer partiellen oder vollständigen Deletionen der *stalk*-Region löste eine ligandenunabhängige Zellproliferation und STAT3-Aktivierung in transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen aus (Lamertz *et al.*, 2018). Eine konstitutive Rezeptoraktivierung kann somit für die Rezeptoren IL-23R und gp130 durch Deletionen bestimmter extrazellulärer Rezeptorbereiche hervorgerufen werden.

Interessanterweise war auch ein verkürzter hIL-23R, der lediglich aus Transmembran- und intrazellulärer Domäne bestand (hIL-23R Δ 24–353), in transient transfizierten U4C-Zellen konstitutiv aktiv (Hummel *et al.*, 2017). Eine gekürzte THPOR-Variante, deren membranfernes extrazelluläres *cytokine receptor module* (CRM) deletiert wurde (Δ CRM-1), induzierte ebenfalls eine ligandenunabhängige Zellproliferation in transduzierten Ba/F3-Zellen (Sabath *et al.*, 1999). Zudem folgte auf den Austausch einer AS in der Extrazellulardomäne des EpoR (R129C) eine konstitutive Rezeptoraktivität durch Homodimerisierung (Yoshimura *et al.*, 1990, Watowich *et al.*, 1992).

Neben den dargestellten Veränderungen innerhalb der Extrazellulardomänen führten auch künstlich herbeigeführte Mutationen innerhalb der Transmembran- oder Intrazellulardomänen sowie Deletionen im Bereich der Intrazellulardomänen zu Rezeptoren mit autonomer Signalgebung. Beispielsweise können die Mutation V536A für den murinen PDGFR β (Transmembran-/Intrazellulardomäne) (Irusta & DiMaio, 1998), Mutationen (H544R) innerhalb des Box2-Motivs des β c (Intrazellulardomäne) (Jenkins *et al.*, 1998), sowie Mutationen oder Deletionen eines charakteristischen, amphipathischen Motivs des THPOR (Intrazellulardomäne) (Staerk *et al.*, 2006) aufgeführt werden.

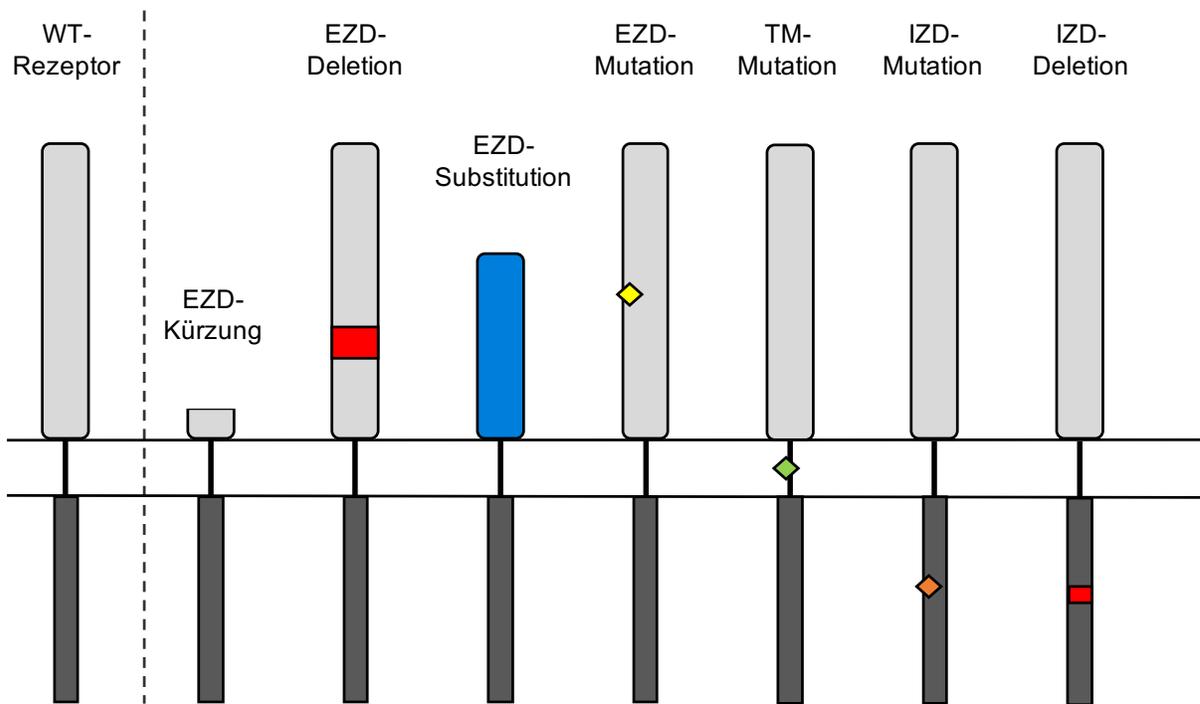


Abb. 34: Schematische Darstellung der Möglichkeiten zum synthetischen Generieren von konstitutiv aktiven Zytokinrezeptoren. Eine konstitutive Rezeptoraktivierung ließ sich für unterschiedlichste Zytokinrezeptoren mithilfe der dargestellten Veränderungen herbeiführen. Sie erfolgte aufgrund von Kürzungen, Deletionen, Substitutionen oder Mutationen der Extrazellulären Domänen (EZD), Mutationen der Transmembran- (TM) und intrazellulären Domäne (IZD), sowie Deletionen innerhalb der IZD. Die Abbildung wurde modifiziert nach Floss & Scheller (2019).

Zusammenfassend waren die aufgeführten Möglichkeiten zum Generieren von aktiven Zytokinrezeptoren entweder Deletionen oder Mutationen. Sie waren, bezogen auf die Gesamtheit der Zytokinrezeptoren, grundsätzlich in allen Rezeptorbereichen anwendbar (siehe Abb. 34).

Allerdings sind noch weitere Verfahren mit gleichartigen Folgen bekannt, die auf spezifischen Substitutionen der jeweiligen Extrazellulärdomäne beruhen (siehe Abb. 34). Eine inzwischen etablierte Methode zum künstlichen Generieren unterschiedlichster Rezeptorkomplexe ist das IL-15/sushi-System. Die entsprechenden Rezeptoruntereinheiten werden gekürzt und mit IL-15 und/oder mit der sushi-Domäne des IL-15R α fusioniert. Grundlage hierfür ist die außerordentlich starke Bindung von IL-15 zur sushi-Domäne des IL-15R α . Mithilfe des IL-15/sushi-Systems wurden autonome, konstitutiv aktive Hetero- und Homodimere von natürlich vorkommenden Rezeptorkombinationen aus gp130, LIFR, OSMR,

WSX-1 und GPL erstellt (Suthaus *et al.*, 2010). Zuvor waren bereits konstitutiv aktive gp130-Homodimere durch das Ersetzen der extrazellulären Domänen mit den dimerisierenden Domänen bestimmter Transkriptionsfaktoren, sogenannte *leucin-zipper*, generiert worden (Stuhlmann-Laeisz *et al.*, 2006). Auch Fusions-Proteine aus dem zytoplasmatischen Teil des HER2-Rezeptors und dem extrazellulären Bereich der α -Kette vom T-Zell-Antigen CD8 bildeten konstitutiv aktive Homodimere durch das Ausbilden von Disulfidbrücken (Kellar *et al.*, 2006). Anhand dieser Rezeptorchimären wird ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen einer forcierten Rezeptordimerisierung und einer Rezeptoraktivierung veranschaulicht.

Auch die genannten autonomen Rezeptormutanten des EpoR (R129C) (Yoshimura *et al.*, 1990, Watowich *et al.*, 1992), des PDGFR β (V536A) (Irusta & DiMaio, 1998), und des β c (H544R) (Jenkins *et al.*, 1998) wiesen eine Rezeptorhomodimerisierung auf. Für die Variante EpoR-R129C erfolgte eine solche nach dem Austausch der AS R129C über das Ausbilden von Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten (Watowich *et al.*, 1992). Im Zusammenhang mit einigen Erkrankungen wurden auch natürlich vorkommende, autonome Varianten von gp130, THPOR und IL-7R identifiziert. Diese werden in Verbindung mit IHCA (z.B. gp130 Δ Y186-Y190, gp130 Δ S187-Y190, gp130 Δ K173-D177) (Rebouissou *et al.*, 2009, Poussin *et al.*, 2013, Pilati & Zucman-Rossi, 2015), einer familiären Form der essentiellen Thrombozythämie (THPOR-S505N) (Ding *et al.*, 2004), myeloproliferativen Neoplasien (THPOR-W515K) (Defour *et al.*, 2013) und akuter lymphatischer Leukämie (z.B. IL-7R-L243insPPCL, IL-7R-L242-L243insNPC, IL-7R-T244-I245insCPT) (Shochat *et al.*, 2011, Zenatti *et al.*, 2011, Oliveira *et al.*, 2019) (siehe 1.6) gebracht. Eine Homodimerisierung erfolgte hierbei über eine stark ausgeprägte Aminosäuren-Polarität (THPOR-S505N) (Ding *et al.*, 2009), aufgrund von Veränderungen des Neigungswinkels der Transmembranelix zur Plasmamembran durch Mutationen im THPOR-charakteristischen amphipathischen Motiv (THPOR-W515K) (Defour *et al.*, 2013) oder analog zu EpoR-R129C durch die Ausbildung von Disulfidbrücken über zusätzliche Cysteinreste in der Transmembrandomäne (z.B. IL-7R-L243insPPCL, IL-7R-L242-L243insNPC, IL-7R-T244-I245insCPT) (Shochat *et al.*, 2011, Zenatti *et al.*, 2011, Oliveira *et al.*, 2019).

Trotz der vielfältigen Ursachen für eine Rezeptorhomodimerisierung, scheint die Folge meist eine konstitutive Rezeptoraktivierung zu sein. Neben den genannten Beispielen sind mittlerweile zahlreiche weitere natürlich vorkommende oder synthetisch generierte Zytokinrezeptorvarianten bekannt, die mithilfe der Homodimerisierung eine

ligandenunabhängige Signalgebung hervorrufen (Floss & Scheller, 2019). Es bleibt abzusehen, ob auch natürlich vorkommende konstitutiv aktive Homodimere des IL-23R identifiziert werden.

4.4 IL-23R-Homodimere induzieren eine (ligandenunabhängige) IL-23-Signaltransduktion

Aufgrund der in 4.3 präsentierten Daten liegt die Vermutung nahe, dass entsprechende IL-23R-Deletionsvarianten mit konstitutiver Aktivität eine Signalweiterleitung über Rezeptorhomodimere aufweisen. Diese Hypothese beruhte unter anderem auf der Unabhängigkeit dieser Deletionsvarianten vom IL-12R β 1 und wurde bereits von Theresa Ackfeld formuliert (Ackfeld, 2020).

Zunächst wurde mittels Co-Immunopräzipitation untersucht, ob die mIL-23R-Deletionsvariante, deren „erweiterte“ *stalk*-Region entfernt wurde (mIL-23R Δ 317-372) in Abwesenheit von hIL-23 Homodimere bildet (siehe 3.3.2). Tatsächlich wurden mithilfe von GFP-bindender Agarose jeweils FLAG-mIL-23R Δ 317-372 mit mIL-23R Δ 317-372-GFP sowie FLAG-mIL-23R mit mIL-23R-GFP co-präzipitiert und eine hIL-23-unabhängige Homodimerisierung für die konstitutiv aktive Rezeptorvariante (mIL-23R Δ 317-372) demonstriert. Wider Erwarten konnte dies auch für den Wildtyprezeptor (mIL-23R (WT)) gezeigt werden. Hieraus lässt sich schließen, dass eine IL-23R-Homodimerisierung grundsätzlich möglich ist und ohne Zytokin erfolgen kann.

Unbeantwortet blieb jedoch die Frage, ob IL-23-Signale tatsächlich über IL-23R-Homodimere weitergeleitet werden können. Zur Untersuchung wurde in der AG Scheller das IL-15/sushi-System (siehe 4.3) für den IL-23R übernommen. Ba/F3-Zellen, die entsprechend modifizierte IL-15-IL-23R-Fusionsproteine exprimierten, wiesen eine ligandenunabhängige Zellproliferation sowie Aktivierung von STAT3 auf (Hummel *et al.*, 2017). Inzwischen gibt es weitere Beispiele aus der AG Scheller, die eine biologische Aktivität von IL-23R-Homodimeren belegen: Erstaunlicherweise zeigten Ba/F3-gp130-Zellen, die den hIL-23R (WT) aber keinen hIL-12R β 1 exprimierten (Ba/F3-gp130-hIL-23R-Zellen), eine Zellproliferation nach Stimulation mit hIL-23. Eine solche war nicht bei Ba/F3-gp130-mIL-23R-Zellen nachweisbar. Dies deutete auf eine IL-23-abhängige Signaltransduktion über hIL-23R (WT)-Homodimere hin (Beier, 2017, Hummel *et al.*, 2017). Kürzlich wurde eine neue Methode entwickelt, die eine Stimulation synthetisch modifizierter Zytokinrezeptoren durch künstliche Liganden

ermöglichte. Hiermit wurden unterschiedliche Rezeptorkombinationen erstellt und deren Signaltransduktion untersucht. Unter anderem erfolgte das Generieren von mIL-23-Rezeptoren, deren Transmembran- und intrazelluläre Domänen mit extrazellulären Nanobodys gegen GFP (G_{VHH}) fusioniert wurden (G_{VHH} -IL-23Rs). Eine Stimulation der G_{VHH} -IL-23Rs durch synthetische Fusionsproteine aus 3xGFP oder 2xGFP-mCherry löste die Bildung von mIL-23R-Homodimeren aus, welche eine Signaltransduktion einleiteten, die weitgehend mit der natürlichen mIL-23-Signaltransduktion übereinstimmte (Engelowski *et al.*, 2018). Die Bestätigung der biologischen Aktivität von IL-23R-Homodimeren in Kombination mit den Ergebnissen der Co-Immunopräzipitationsuntersuchungen belegten somit eindeutig, dass eine ligandenunabhängige Rezeptoraktivierung entsprechender hIL-23R- und mIL-23R-*stalk*-Deletionsvarianten unabhängig von IL-12R β 1 durch die Bildung und Signalgebung von IL-23R-Homodimeren verursacht wird. Zudem beschreibt das IL-23R-Homodimer einen neuen bisher unbekanntem Rezeptorkomplex der IL-12 Familie.

Da sowohl die mIL-23R Δ 317-372-Deletionsvariante als auch der mIL-23R (WT) Homodimere bilden (siehe 3.3.2), scheint eine Homodimerisierung nicht spezifisch durch die Deletion der „erweiterten“ *stalk*-Region induziert zu werden. Zudem wurde in der AG Scheller eine Beteiligung der hIL-23R-*stalk*-Region an der Homodimerisierung ausgeschlossen, da ein Austausch dieser durch die mIL-23R-*stalk*-Region (hIL-23R-mIL-23R*stalk*) weiterhin zu einer hIL-23-abhängigen Zellproliferation von Ba/F3-gp130-hIL-23R-mIL-23R*stalk*-Zellen führte, wie sie auch bei Ba/F3-gp130-hIL-23R-Zellen beobachtet wurde (s.o.). Folglich wurde vermutet, dass an der primären Bildung der Homodimere nicht die *stalk*- sondern wahrscheinlich die Zytokin-bindende Region des Rezeptors beteiligt ist (Beier, 2017). Interessanterweise löste auch eine gekürzte Variante des hIL-23R (hIL-23R Δ 24–353), die nur aus den transmembranen und intrazellulären Rezeptordomänen bestand, eine konstitutive, ligandenunabhängige Aktivität auf (Hummel *et al.*, 2017). Ob diese auf eine Homodimerisierung der Variante zurückzuführen war, wurde zwar nicht untersucht, scheint jedoch plausibel zu sein. Möglicherweise kann eine Homodimerisierung auch durch die Transmembran- oder Intrazellulardomäne begünstigt werden. Ein Weg, um diesbezüglich Aufschluss zu erlangen, wäre das systematische Erstellen weiterer IL-23R-Deletionsvarianten mit N-terminalem FLAG-*tag* sowie analoger IL-23R-Varianten mit C-terminalem GFP-*tag* und deren Untersuchung mittels Co-Immunopräzipitation hinsichtlich einer potentiellen Homodimerisierung.

Neben der Identifikation des verantwortlichen Bereiches wäre es zusätzlich von Bedeutung, ob eine Homodimerisierung durch spezifische Stimuli ausgelöst wird. Mittels Co-Immunopräzipitation wurden im Rahmen dieser Arbeit IL-23R-Homodimere demonstriert, die sich in der Abwesenheit von HIL-23 bildeten (siehe 3.3.2). Tatsächlich wurde die Existenz von präformierten Homodimeren auf der Zelloberfläche bereits für einige Zytokinrezeptoren, beispielsweise EpoR (Livnah *et al.*, 1999, Remy *et al.*, 1999, Constantinescu *et al.*, 2001), IL-6R (Schuster *et al.*, 2003) und gp130 (Giese *et al.*, 2005, Tenhumberg *et al.*, 2006), beschrieben. Diese befanden sich zunächst in einem inaktiven Zustand. Nach einer Ligandenbindung erfolgte jedoch in einigen Fällen eine räumliche Neuordnung innerhalb der dimeren Rezeptorkomplexe, die eine Signaltransduktion auslöste (Hummel *et al.*, 2017). Diese Annahme galt auch lange Zeit für IFN-Rezeptorketten (Krause *et al.*, 2002). Sie wurde jedoch allgemein in Frage gestellt, nachdem belegt wurde, dass eine Dimerisierung bestimmter IFN-Rezeptorketten erst durch eine Ligandenbindung induziert wird (Wilmes *et al.*, 2015). Dennoch sprechen die im Rahmen dieser Arbeit mittels Co-Immunopräzipitation erhobenen Daten für das Vorhandensein präformierter IL-23R (WT)-Homodimere. Sie wurden durch eine Ligandenbindung über unbekannte Mechanismen aktiviert, wie die HIL-23-abhängige Zellproliferation der Ba/F3-gp130-hIL-23R (WT)-Zellen (Beier, 2017, Hummel *et al.*, 2017) zeigte. Am wahrscheinlichsten ist, dass die Stimulation von IL-23 Konformationsänderungen innerhalb der IL-23R (WT)-Homodimere auslöst, die eine Signaltransduktion vermitteln.

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten IL-23R-Homodimere mit Deletion der „erweiterten“ *stalk*-Region benötigten jedoch keinen Liganden für eine Signalwirkung. Stattdessen befinden sie sich in einer dauerhaft aktiven räumlichen Anordnung mit autonomer Signalgebung, die ligandenunabhängig durch *stalk*-Deletionen induziert wurde (Hummel *et al.*, 2017). Wie genau die Konformation derartiger mIL-23R Δ 317-372-Homodimere aufgebaut ist und inwiefern sie sich von der ligandeninduzierten räumlichen Struktur der mIL-23R (WT)-Homodimere unterscheidet, ist bisher unbekannt. Zumindest lassen die vorliegenden Daten vermuten, dass die Rezeptorvarianten mIL-23R Δ 317-372 eine Konformation einnehmen, die zu einem dauerhaft aktiven Zustand der assoziierten Januskinasen führt (Hummel *et al.*, 2017). Zur genaueren Analyse der molekularen Struktur aktiver und inaktiver IL-23R-Homodimere wären weitere Untersuchungen aufschlussreich und könnten zum tieferen Verständnis der Rezeptorbiologie und der Entwicklung neuer Therapieoptionen für IL-23-assoziierte Krankheiten beitragen.

4.5 Konstitutiv aktive Rezeptoren als Krankheitsursachen, Hilfsmittel und Therapeutika

Wie bereits beschrieben, führt IL-23 zur Differenzierung pathogener T_H17 -Zellen, die im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Vorgängen, Autoimmunerkrankungen und Krebs stehen (Wu *et al.*, 2009, Grivennikov *et al.*, 2012, Croxford *et al.*, 2012, Gaffen *et al.*, 2014, Hasegawa *et al.*, 2016). IL-23-assoziierte Erkrankungen des Menschen sind unter anderem Psoriasis (Wilson *et al.*, 2007), Rheumatoide Arthritis (Rasmussen *et al.*, 2010), chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Liu *et al.*, 2011, Neurath, 2019) und verschiedene Krebserkrankungen (Yan *et al.*, 2018, Neurath, 2019).

Inzwischen gibt es diverse klinisch zugelassene Medikamente zur Hemmung der Aktivität von IL-23. Eine Antagonisierung von IL-23 erfolgt über Antikörper, die sich gegen die mit IL-12 geteilte p40-Untereinheit (Ustekinumab, Briakinumab) oder spezifisch gegen die p19-Untereinheit (Risankizumab, Guselkumab, Tildrakizumab) richten und somit eine Zytokinbindung an die entsprechenden Rezeptoren verhindern. Derartige Antikörpertherapien scheinen vor allem zur Behandlung von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Psoriasis wirksam zu sein (Tait Wojno *et al.*, 2019, Neurath, 2019). Medikamente gegen den IL-23R, mit denen bestenfalls auch konstitutiv aktive IL-23Rs gehemmt werden könnten, wurden bisher nicht entwickelt (Floss *et al.*, 2015). Jedoch war es mithilfe spezifischer Inhibitoren möglich, die Signaltransduktion anderer Zytokinrezeptoren mit konstitutiver Aktivität zu unterbrechen. So wurden einige konstitutiv aktive Rezeptorvarianten von Rezeptoren wie HER2, VEGFR2, PDGFR β aus der Familie der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) mit Tyrosinkinaseinhibitoren (Neratinib, Sunitinib, Sorafenib, Imatinib) kontrolliert (Hanker *et al.*, 2017, Antonescu *et al.*, 2009, Apperley *et al.*, 2002). Tyrosinkinaseinhibitoren waren allerdings längst nicht bei allen bekannten Rezeptortyrosinkinasen-Varianten mit konstitutiver Aktivität wirksam (Floss & Scheller, 2019). Zudem wurde die Signalgebung konstitutiv aktiver gp130-Varianten mit Jak-Inhibitoren, wie P6 oder Ruxolitinib, gehemmt (Poussin *et al.*, 2013, Schutt *et al.*, 2013, Lamertz *et al.*, 2018). Ruxolitinib war ebenfalls wirksam zur Behandlung von ALL-Patienten mit konstitutiv aktiven IL-7R-Varianten (in Kombination mit einem BCL-2-Hemmer (Venetoclax) gegen ein spezifisches anti-apoptotisches Protein des IL-7R (BCL-2)) (Senkevitch *et al.*, 2018).

Generell ist der Jak/STAT-Weg ein aktuelles und vielversprechendes Forschungsgebiet zur Entwicklung neuer Therapieoptionen gegen Autoimmunerkrankungen und Krebs (Groner

& von Manstein, 2017). Jak-Inhibitoren und andersartige Therapeutika zur Unterbindung des Jak/STAT-Wegs könnten daher auch für konstitutiv aktive IL-23Rs sowie weitere aktive Klasse-I-Zytokinrezeptoren, die den Jak/STAT-Weg als Hauptsignalkaskade induzieren (Floss & Scheller, 2019), von Bedeutung werden. Ein Problem der Anwendung von Jak-Inhibitoren ist die gleichzeitige Blockade der vielfältigen physiologischen Jak/STAT-vermittelten Prozesse im nahezu gesamten Organismus mit der Folge systemischer Nebenwirkungen (Groner & von Manstein, 2017). Spezifische Therapeutika, die sich ausschließlich gegen die jeweilige konstitutiv aktive Rezeptorvariante mit direkter Krankheitsbeteiligung selbst richten, wären daher vorteilhaft, um unerwünschte Wirkungen einzudämmen und die Effektivität der Behandlung zu verbessern.

Interessanterweise ließ sich eine auf Homodimerisierung zurückzuführende konstitutive Aktivität der IHCA-assoziierten gp130 Δ 186-190-Mutante mit konkurrierendem gp130 (WT) antagonisieren (Rebouissou *et al.*, 2009, Poussin *et al.*, 2013). Möglicherweise könnte die Hemmung aktiver Rezeptormutanten durch das Unterbinden einer Rezeptorhomodimerisierung ein Ansatz zur Entwicklung neuer Therapien sein. Die Geschwindigkeit, in der Fortschritte auf diesem Gebiet erzielt werden, und die genauen Funktionsweisen neuer Therapeutika bleiben zu diesem Zeitpunkt Spekulation und müssen letztlich abgewartet werden. Bisher sind keine natürlich vorkommenden *gain-of-function*-Mutationen mit der Folge von konstitutiv aktiven IL-23Rs bekannt (Floss & Scheller, 2019). Jedoch können solche vermutlich zukünftig in Patienten mit IL-23-assoziierten Krankheiten identifiziert werden und die Möglichkeiten zur Kontrolle konstitutiv aktiver Rezeptoren daher auch bedeutsam für deren Therapie sein.

Während die Auswirkungen konstitutiv aktiver Zytokinrezeptoren in den meisten Fällen für betroffene Patienten unerwünscht und tragisch sind, können synthetisch generierte Zytokinrezeptoren mit autonomer Aktivität gleichfalls sehr nützlich für Forschungszwecke sein. Sie eignen sich als ausgezeichnetes Hilfsmittel für eine kontrollierte Krankheitsentstehung und zugleich zur exakten Analyse einer solchen (Floss & Scheller, 2019). Zum Beispiel waren Mausmodelle, in denen HER2-abhängige Tumore durch synthetische CD8-HER2-Fusionsproteine (siehe 4.3) erzeugt wurden, ideale Modelle zur Testung von Krebsmedikamenten (Kellar *et al.*, 2006, Floss & Scheller, 2019). Die in der AG Scheller sowie im Rahmen dieser Arbeit generierten IL-23R-*stalk*-Deletionsvarianten oder synthetisch generierte IL-15/sushi-Fusionproteine dürften sich womöglich ebenfalls als vorteilhaft für die Untersuchung IL-23-assoziiierter Krankheiten in Mausmodellen erweisen.

Schließlich wurden konstitutiv aktive Zytokinrezeptoren als Therapeutika beziehungsweise zur Unterstützung einer Therapieform eingesetzt. So steigerten IL-7R-Mutanten mit autonomer Signalwirkung, die in CAR-T-Zellen co-exprimiert wurden, die Effizienz dieser neuartigen Krebstherapie in verschiedenen präklinischen Tumormodellen durch eine erhöhte Proliferation, ein verlängertes Überleben und eine verbesserte antitumorale Aktivität der T-Zellen (Shum *et al.*, 2017). Für eine optimale T-Zellfunktion sind drei aktivierende Signale erforderlich, von denen das Signal 1 (T-Zell-Rezeptor-Aktivierung) und das Signal 2 (Co-Stimulation) über einen synthetischen CAR weitergeleitet werden. Eine Stimulation durch das Signal 3 stammt physiologischerweise von immunstimulierenden Zytokinen, die sich allerdings selten in der Mikroumgebung von Tumoren befinden. Mithilfe von konstitutiv aktiven IL-7Rs wurde das fehlende Signal 3 gezielt und ohne zusätzlichen Bedarf von Zytokinen, von denen erhebliche toxische Nebenwirkungen nach systemischer Verabreichung zu erwarten sind, ersetzt (Shum *et al.*, 2017). Womöglich lassen sich in Zukunft weitere konstitutiv aktive Zytokinrezeptoren als Hilfsmittel im Rahmen von Therapiekonzepten etablieren.

4.6 Schlussfolgerungen

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Bedeutung der *stalk*-Region des humanen und murinen IL-23R sowie die Hintergründe einer konstitutiven Rezeptoraktivität beleuchtet. Folgendes lässt sich aus den dargestellten Daten schließen:

Die exakte Aminosäurefolge der hIL-23R-*stalk*-Region ist eher unbedeutend für die Rezeptorfunktion. Stattdessen wird die IL-23-Signaltransduktion durch die Länge der IL-23R-*stalk*-Region beeinflusst. Mindestens 27 AS (hIL-23R) bzw. 26 AS (mIL-23R) sind für eine normale Rezeptorfunktion und 6 AS (hIL-23R und mIL-23R) für eine Restaktivität erforderlich. Zusätzlich bestimmen unbekannte Faktoren die IL-23-Signaltransduktion des humanen IL-23R, zur Identifikation dieser sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Aufgrund einer Beteiligung beim *ectodomain shedding* durch ADAM17 könnte die IL-23R-*stalk*-Region auch einen Einfluss auf natürlichen Regulationsmechanismen der IL-23-Signaltransduktion nehmen.

Deletionen der *stalk*-Region (hIL-23R) beziehungsweise der *stalk*-Region inklusive der 20 AS umfassenden WQPWS-Duplikation (mIL-23R) bewirken eine ligandenunabhängige, autonome IL-23-Signaltransduktion. Eine konstitutive Rezeptoraktivität des IL-23R tritt unabhängig von zellspezifischen Eigenschaften sowie dem Rezeptor IL-12R β 1 auf und wird durch eine Rezeptorhomodimerisierung hervorgerufen.

Auch der IL-23R (WT) bildet Homodimere mit IL-23-abhängiger biologischer Aktivität und somit einen neuartigen Rezeptorkomplex der IL-12 Familie. Unklar ist die genaue Ursache, die zu einer Homodimerisierung des IL-23R führt, und ob IL-23Rs *in vivo* als präformierte Homodimere auf der Zelloberfläche existieren oder auf einen bestimmten Reiz hin gebildet werden. Dies sowie die unbekannte molekulare Struktur aktiver und inaktiver IL-23R-Homodimere bieten eine Grundlage für weitere Untersuchungen.

Allgemein können konstitutiv aktive Zytokinrezeptoren mit unterschiedlichsten Methoden synthetisch hergestellt werden. Als Ursache diverser Erkrankungen, Instrument für Forschungszwecke sowie als Therapieoption gewinnen Zytokinrezeptoren mit ligandenunabhängiger Aktivität zunehmend an Bedeutung in der modernen Forschung und Medizin.

Natürlich vorkommende konstitutiv aktive IL-23Rs sind bisher nicht bekannt. Eine Identifikation in Patienten mit IL-23-assoziierten Erkrankungen hätte große Auswirkungen auf kausales Krankheitsverständnis und die Entwicklung neuer Therapien.

5 Literatur und Quellenangabe

- ACKFELD, T. 2020. *Funktionelle Charakterisierung der IL-23 Rezeptor stalk Region*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- AHERN, P. P., SCHIERING, C., BUONOCORE, S., MCGEACHY, M. J., CUA, D. J., MALOY, K. J. & POWRIE, F. 2010. Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. *Immunity*, 33, 279-88.
- AKDIS, M., BURGLER, S., CRAMERI, 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, C. A. 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127, 701-21 e1-70.
- ALTHOFF, K., MULLBERG, J., AASLAND, D., VOLTZ, N., KALLEN, K., GROTZINGER, J. & ROSE-JOHN, S. 2001. Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins. *Biochemical Journal*, 353, 663-72.
- ANTONESCU, C. R., YOSHIDA, A., GUO, T., CHANG, N. E., ZHANG, L., AGARAM, N. P., QIN, L. X., BRENNAN, M. F., SINGER, S. & MAKI, R. G. 2009. KDR activating mutations in human angiosarcomas are sensitive to specific kinase inhibitors. *Cancer Research*, 69, 7175-9.
- APPERLEY, J. F., GARDEMBAS, M., MELO, J. V., RUSSELL-JONES, R., BAIN, B. J., BAXTER, E. J., CHASE, A., CHESSELLS, J. M., COLOMBAT, M., DEARDEN, C. E., DIMITRIJEVIC, S., MAHON, F. X., MARIN, D., NIKOLOVA, Z., OLAVARRIA, E., SILBERMAN, S., SCHULTHEIS, B., CROSS, N. C. & GOLDMAN, J. M. 2002. Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative diseases with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor beta. *New England Journal of Medicine*, 347, 481-7.
- BACON, C. M., MCVICAR, D. W., ORTALDO, J. R., REES, R. C., O'SHEA, J. J. & JOHNSTON, J. A. 1995. Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. *Journal of Experimental Medicine*, 181, 399-404.
- BARAN, P., NITZ, R., GROTZINGER, J., SCHELLER, J. & GARBERS, C. 2013. Minimal interleukin 6 (IL-6) receptor stalk composition for IL-6 receptor shedding and IL-6 classic signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 14756-68.
- BAZAN, J. F. 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 6934-8.
- BECERRA-DIAZ, M., VALDERRAMA-CARVAJAL, H. & TERRAZAS, L. I. 2011. Signal transducers and activators of transcription (STAT) family members in helminth infections. *International Journal of Biological Sciences*, 7, 1371-81.
- BEIER, S. 2017. *Konzentrationsabhängige Effekte der Interleukin-23 Signaltransduktion in Ba/F3 Zellen*. Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- BRIDGEWOOD, C., ALASE, A., WATAD, A., WITTMANN, M., CUTHBERT, R. & MCGONAGLE, D. 2019. The IL-23p19/EBI3 heterodimeric cytokine termed IL-39 remains a theoretical cytokine in man. *Inflammation Research*, 68, 423-426.
- CASE, R. D., PICCIONE, E., WOLF, G., BENETT, A. M., LECHLEIDER, R. J., NEEL, B. G. & SHOELSON, S. E. 1994. SH-PTP2/Syp SH2 domain binding specificity is defined

- by direct interactions with platelet-derived growth factor beta-receptor, epidermal growth factor receptor, and insulin receptor substrate-1-derived phosphopeptides. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 10467-74.
- CHAN, I. H., JAIN, R., TESSMER, M. S., GORMAN, D., MANGADU, R., SATHE, M., VIVES, F., MOON, C., PENAFLO, E., TURNER, S., AYANOGLU, G., CHANG, C., BASHAM, B., MUMM, J. B., PIERCE, R. H., YEARLEY, J. H., MCCLANAHAN, T. K., PHILLIPS, J. H., CUA, D. J., BOWMAN, E. P., KASTELEIN, R. A. & LAFACE, D. 2014. Interleukin-23 is sufficient to induce rapid de novo gut tumorigenesis, independent of carcinogens, through activation of innate lymphoid cells. *Mucosal Immunology*, 7, 842-56.
- CHARROT, S. & HALLAM, S. 2019. CAR-T Cells: Future perspectives. *Hemasphere*, 3, e188.
- CHO, M. L., KANG, J. W., MOON, Y. M., NAM, H. J., JHUN, J. Y., HEO, S. B., JIN, H. T., MIN, S. Y., JU, J. H., PARK, K. S., CHO, Y. G., YOON, C. H., PARK, S. H., SUNG, Y. C. & KIM, H. Y. 2006. STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Journal of Immunology*, 176, 5652-61.
- CHUA, A. O., WILKINSON, V. L., PRESKY, D. H. & GUBLER, U. 1995. Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component. *Journal of Immunology*, 155, 4286-94.
- CIUPKA, G. 2014. *Funktionelle Charakterisierung der stalk-Region des Interleukin 23 Rezeptors in der Signaltransduktion*. Masterarbeit, Westfälische Hochschule Gelsenkirchen, Bocholt, Recklinghausen.
- COLLISON, L. W., DELGOFFE, G. M., GUY, C. S., VIGNALI, K. M., CHATURVEDI, V., FAIRWEATHER, D., SATOSKAR, A. R., GARCIA, K. C., HUNTER, C. A., DRAKE, C. G., MURRAY, P. J. & VIGNALI, D. A. 2012. The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nature Immunology*, 13, 290-9.
- COLLISON, L. W. & VIGNALI, D. A. 2008. Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunological Reviews*, 226, 248-62.
- COLLISON, L. W., WORKMAN, C. J., KUO, T. T., BOYD, K., WANG, Y., VIGNALI, K. M., CROSS, R., SEHY, D., BLUMBERG, R. S. & VIGNALI, D. A. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450, 566-9.
- COLOSI, P., WONG, K., LEONG, S. R. & WOOD, W. I. 1993. Mutational analysis of the intracellular domain of the human growth hormone receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 12617-23.
- CONSTANTINESCU, S. N., KEREN, T., SOCOLOVSKY, M., NAM, H., HENIS, Y. I. & LODISH, H. F. 2001. 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*, 98, 4379-84.
- CROXFORD, A. L., MAIR, F. & BECHER, B. 2012. IL-23: one cytokine in control of autoimmunity. *European Journal of Immunology*, 42, 2263-73.
- CUA, D. J., SHERLOCK, J., CHEN, Y., MURPHY, C. A., JOYCE, B., SEYMOUR, B., LUCIAN, L., TO, W., KWAN, S., CHURAKOVA, T., ZURAWSKI, S., WIEKOWSKI, M., LIRA, S. A., GORMAN, D., KASTELEIN, R. A. & SEDGWICK, J. D. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 421, 744-8.
- CUMMINGS, J. R., AHMAD, T., GEREMIA, A., BECKLY, J., COONEY, R., HANCOCK, L., PATHAN, S., GUO, C., CARDON, L. R. & JEWELL, D. P. 2007. Contribution of

- the novel inflammatory bowel disease gene IL23R to disease susceptibility and phenotype. *Inflammatory Bowel Diseases*, 13, 1063-8.
- DAGIL, R., KNUDSEN, M. J., OLSEN, J. G., O'SHEA, C., FRANZMANN, M., GOFFIN, V., TEILUM, K., BREINHOLT, J. & KRAGELUND, B. B. 2012. The WSXWS motif in cytokine receptors is a molecular switch involved in receptor activation: insight from structures of the prolactin receptor. *Structure*, 20, 270-82.
- DEFOUR, J. P., ITAYA, M., GRYSHKOVA, V., BRETT, I. C., PECQUET, C., SATO, T., SMITH, S. O. & CONSTANTINESCU, S. N. 2013. Tryptophan at the transmembrane-cytosolic junction modulates thrombopoietin receptor dimerization and activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 2540-5.
- DETRY, S., SKLADANOWSKA, K., VUYLSTEKE, M., SAVVIDES, S. N. & BLOCH, Y. 2019. Revisiting the combinatorial potential of cytokine subunits in the IL-12 family. *Biochemical Pharmacology*, 165, 240-248.
- DI CESARE, A., DI MEGLIO, P. & NESTLE, F. O. 2009. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 129, 1339-50.
- DING, J., KOMATSU, H., IIDA, S., YANO, H., KUSUMOTO, S., INAGAKI, A., MORI, F., RI, M., ITO, A., WAKITA, A., ISHIDA, T., NITTA, M. & UEDA, R. 2009. The Asn505 mutation of the c-MPL gene, which causes familial essential thrombocythemia, induces autonomous homodimerization of the c-Mpl protein due to strong amino acid polarity. *Blood*, 114, 3325-8.
- DING, J., KOMATSU, H., WAKITA, A., KATO-URANISHI, M., ITO, M., SATOH, A., TSUBOI, K., NITTA, M., MIYAZAKI, H., IIDA, S. & UEDA, R. 2004. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*, 103, 4198-200.
- DU, Z. & LOVLY, C. M. 2018. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular Cancer*, 17, 58.
- DURANT, L., WATFORD, W. T., RAMOS, H. L., LAURENCE, A., VAHEDI, G., WEI, L., TAKAHASHI, H., SUN, H. W., KANNO, Y., POWRIE, F. & O'SHEA, J. J. 2010. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity*, 32, 605-15.
- ENGELOWSKI, E., SCHNEIDER, A., FRANKE, M., XU, H., CLEMEN, R., LANG, A., BARAN, P., BINSCH, C., KNEBEL, B., AL-HASANI, H., MOLL, J. M., FLOSS, D. M., LANG, P. A. & SCHELLER, J. 2018. Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands. *Nature Communications*, 9, 2034.
- FISCHER, M., GOLDSCHMITT, J., PESCHEL, C., BRAKENHOFF, J. P., KALLEN, K. J., WOLLMER, A., GROTZINGER, J. & ROSE-JOHN, S. 1997. I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nature Biotechnology*, 15, 142-5.
- FLORES, R. R., KIM, E., ZHOU, L., YANG, C., ZHAO, J., GAMBOTTO, A. & ROBBINS, P. D. 2015. IL-Y, a synthetic member of the IL-12 cytokine family, suppresses the development of type 1 diabetes in NOD mice. *European Journal of Immunology*, 45, 3114-25.
- FLOSS, D. M., KLOCKER, T., SCHRODER, J., LAMERTZ, L., MROTZEK, S., STROBL, B., HERMANN, H. & SCHELLER, J. 2016. Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor beta1 and interleukin 23 receptor to Janus kinases. *Molecular Biology of the Cell*, 27, 2301-16.

- FLOSS, D. M., MROTZEK, S., KLOCKER, T., SCHRODER, J., GROTZINGER, J., ROSE-JOHN, S. & SCHELLER, J. 2013. Identification of canonical tyrosine-dependent and non-canonical tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 19386-400.
- FLOSS, D. M. & SCHELLER, J. 2019. Naturally occurring and synthetic constitutive-active cytokine receptors in disease and therapy. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 47, 1-20.
- FLOSS, D. M., SCHONBERG, M., FRANKE, M., HORSTMEIER, F. C., ENGELOWSKI, E., SCHNEIDER, A., ROSENFELDT, E. M. & SCHELLER, J. 2017. IL-6/IL-12 cytokine receptor shuffling of extra- and intracellular domains reveals canonical STAT activation via synthetic IL-35 and IL-39 signaling. *Scientific Reports*, 7, 15172.
- FLOSS, D. M., SCHRODER, J., FRANKE, M. & SCHELLER, J. 2015. Insights into IL-23 biology: From structure to function. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 26, 569-78.
- FRANKE, M., SCHRODER, J., MONHASERY, N., ACKFELD, T., HUMMEL, T. M., RABE, B., GARBERS, C., BECKER-PAULY, C., FLOSS, D. M. & SCHELLER, J. 2016. Human and murine Interleukin 23 receptors are novel substrates for a disintegrin and metalloproteases ADAM10 and ADAM17. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 10551-61.
- FUKUNAGA, R., ISHIZAKA-IKEDA, E., PAN, C. X., SETO, Y. & NAGATA, S. 1991. Functional domains of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *EMBO Journal*, 10, 2855-65.
- GAFFEN, S. L., JAIN, R., GARG, A. V. & CUA, D. J. 2014. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nature Reviews: Immunology*, 14, 585-600.
- GARBERS, C., HERMANN, H. M., SCHAPER, F., MÜLLER-NEUEN, G., GRÖTZINGER, J., ROSE-JOHN, S. & SCHELLER, J. 2012. Plasticity and cross-talk of Interleukin 6-type cytokines. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 23, 85-97.
- GARBERS, C., JANNER, N., CHALARIS, A., MOSS, M. L., FLOSS, D. M., MEYER, D., KOCH-NOLTE, F., ROSE-JOHN, S. & SCHELLER, J. 2011. Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 14804-11.
- GEARING, D. P., ZIEGLER, S. F., COMEAU, M. R., FRIEND, D., THOMA, B., COSMAN, D., PARK, L. & MOSLEY, B. 1994. 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*, 91, 1119-23.
- GIESE, B., RODERBURG, C., SOMMERAUER, M., WORTMANN, S. B., METZ, S., HEINRICH, P. C. & MULLER-NEUEN, G. 2005. Dimerization of the cytokine receptors gp130 and LIFR analysed in single cells. *Journal of Cell Science*, 118, 5129-40.
- GRIVENNIKOV, S. I., WANG, K., MUCIDA, D., STEWART, C. A., SCHNABL, B., JAUCH, D., TANIGUCHI, K., YU, G. Y., OSTERREICHER, C. H., HUNG, K. E., DATZ, C., FENG, Y., FEARON, E. R., OUKKA, M., TESSAROLLO, L., COPPOLA, V., YAROVINSKY, F., CHEROUTRE, H., ECKMANN, L., TRINCHIERI, G. & KARIN, M. 2012. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*, 491, 254-8.

- GRONER, B. & VON MANSTEIN, V. 2017. Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 451, 1-14.
- GROTZINGER, J., KERNEBECK, T., KALLEN, K. J. & ROSE-JOHN, S. 1999. IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both? *Biological Chemistry*, 380, 803-13.
- HA, S. J., LEE, C. H., LEE, S. B., KIM, C. M., JANG, K. L., SHIN, H. S. & SUNG, Y. C. 1999. A novel function of IL-12p40 as a chemotactic molecule for macrophages. *Journal of Immunology*, 163, 2902-8.
- HANKER, A. B., BREWER, M. R., SHEEHAN, J. H., KOCH, J. P., SLIWOSKI, G. R., NAGY, R., LANMAN, R., BERGER, M. F., HYMAN, D. M., SOLIT, D. B., HE, J., MILLER, V., CUTLER, R. E., JR., LALANI, A. S., CROSS, D., LOVLY, C. M., MEILER, J. & ARTEAGA, C. L. 2017. An acquired HER2(T798I) gatekeeper mutation induces resistance to neratinib in a patient with HER2 mutant-driven breast cancer. *Cancer Discovery*, 7, 575-585.
- HARRINGTON, L. E., HATTON, R. D., MANGAN, P. R., TURNER, H., MURPHY, T. L., MURPHY, K. M. & WEAVER, C. T. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*, 6, 1123-32.
- HASEGAWA, H., MIZOGUCHI, I., CHIBA, Y., OHASHI, M., XU, M. & YOSHIMOTO, T. 2016. Expanding diversity in molecular structures and functions of the IL-6/IL-12 heterodimeric cytokine family. *Frontiers in Immunology*, 7, 479.
- HEINRICH, P. C., BEHRMANN, I., MULLER-NEWEN, G., SCHAPER, F. & GRAEVE, L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochemical Journal*, 334 (Pt 2), 297-314.
- HEINRICH, P. C., MUELLER, M. & GRAEVE, L. 2014. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- HOLLIS-MOFFATT, J. E., MERRIMAN, M. E., RODGER, R. A., ROWLEY, K. A., CHAPMAN, P. T., DALBETH, N., GOW, P. J., HARRISON, A. A., HIGHTON, J., JONES, P. B., O'DONNELL, J. L., STAMP, L. K. & MERRIMAN, T. R. 2009. Evidence for association of an interleukin 23 receptor variant independent of the R381Q variant with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68, 1340-4.
- HUE, S., AHERN, P., BUONOCORE, S., KULLBERG, M. C., CUA, D. J., MCKENZIE, B. S., POWRIE, F. & MALOY, K. J. 2006. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 203, 2473-83.
- HUMMEL, T. M., ACKFELD, T., SCHONBERG, M., CIUPKA, G., SCHULZ, F., OBERDOERSTER, A., GROTZINGER, J., SCHELLER, J. & FLOSS, D. M. 2017. Synthetic deletion of the Interleukin 23 receptor (IL-23R) stalk region led to autonomous IL-23R homodimerization and activation. *Molecular and Cellular Biology*, 37, e00014-17.
- IHLE, J. N. & KERR, I. M. 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends in Genetics*, 11, 69-74.
- IRUSTA, P. M. & DIMAIO, D. 1998. A single amino acid substitution in a WW-like domain of diverse members of the PDGF receptor subfamily of tyrosine kinases causes constitutive receptor activation. *EMBO Journal*, 17, 6912-23.
- JENKINS, B. J., BLAKE, T. J. & GONDA, T. J. 1998. Saturation mutagenesis of the beta subunit of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor shows

- clustering of constitutive mutations, activation of ERK MAP kinase and STAT pathways, and differential beta subunit tyrosine phosphorylation. *Blood*, 92, 1989-2002.
- JONES, L. L. & VIGNALI, D. A. 2011. Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunologic Research*, 51, 5-14.
- KELLAR, K. A., LORENZI, M. V., HO, C. P., YOU, D., WEN, M. L., RYSECK, R. P., OPPENHEIMER, S., FINK, B. E., VITE, G. D., ROWLEY, B. R., YU, C., BOL, D. K., LEE, F. Y. & WONG, T. W. 2006. Constitutively active receptor tyrosine kinases as oncogenes in preclinical models for cancer therapeutics. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5, 1571-6.
- KETTELER, R., GLASER, S., SANDRA, O., MARTENS, U. M. & KLINGMULLER, U. 2002. Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Therapy*, 9, 477-87.
- KHADER, S. A. & GOPAL, R. 2010. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens. *Virulence*, 1, 423-7.
- KOBAYASHI, M., FITZ, L., RYAN, M., HEWICK, R. M., CLARK, S. C., CHAN, S., LOUDON, R., SHERMAN, F., PERUSSIA, B. & TRINCHIERI, G. 1989. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 170, 827-45.
- KRAUSE, C. D., MEI, E., XIE, J., JIA, Y., BOPP, M. A., HOCHSTRASSER, R. M. & PESTKA, S. 2002. Seeing the light: preassembly and ligand-induced changes of the interferon gamma receptor complex in cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1, 805-15.
- LAMERTZ, L., FLOSS, D. M. & SCHELLER, J. 2018. Combined deletion of the fibronectin-type III domains and the stalk region results in ligand-independent, constitutive activation of the Interleukin 6 signal-transducing receptor gp130. *Cytokine*, 110, 428-434.
- LANGOWSKI, J. L., ZHANG, X., WU, L., MATTSON, J. D., CHEN, T., SMITH, K., BASHAM, B., MCCLANAHAN, T., KASTELEIN, R. A. & OFT, M. 2006. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*, 442, 461-5.
- LANGRISH, C. L., CHEN, Y., BLUMENSCHNIG, W. M., MATTSON, J., BASHAM, B., SEDGWICK, J. D., MCCLANAHAN, T., KASTELEIN, R. A. & CUA, D. J. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 201, 233-40.
- LIU, Y., YU, J. T., ZHANG, W., ZONG, Y., LU, R. C., ZHOU, J. & TAN, L. 2014. Interleukin-23 receptor polymorphisms are associated with Alzheimer's disease in Han Chinese. *Journal of Neuroimmunology*, 271, 43-8.
- LIU, Z., YADAV, P. K., XU, X., SU, J., CHEN, C., TANG, M., LIN, H., YU, J., QIAN, J., YANG, P. C. & WANG, X. 2011. The increased expression of IL-23 in inflammatory bowel disease promotes intraepithelial and lamina propria lymphocyte inflammatory responses and cytotoxicity. *Journal of Leukocyte Biology*, 89, 597-606.
- LIVNAH, O., STURA, E. A., MIDDLETON, S. A., JOHNSON, D. L., JOLLIFFE, L. K. & WILSON, I. A. 1999. Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science*, 283, 987-90.
- MARKS, B. R. & CRAFT, J. 2009. Barrier immunity and IL-17. *Seminars in Immunology*, 21, 164-71.

- MCGEACHY, M. J., CHEN, Y., TATO, C. M., LAURENCE, A., JOYCE-SHAIKH, B., BLUMENSCHNEIN, W. M., MCCLANAHAN, T. K., O'SHEA, J. J. & CUA, D. J. 2009. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nature Immunology*, 10, 314-24.
- MURAKAMI, M., NARAZAKI, M., HIBI, M., YAWATA, H., YASUKAWA, K., HAMAGUCHI, M., TAGA, T. & KISHIMOTO, T. 1991. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 11349-53.
- MURPHY, C. A., LANGRISH, C. L., CHEN, Y., BLUMENSCHNEIN, W., MCCLANAHAN, T., KASTELEIN, R. A., SEDGWICK, J. D. & CUA, D. J. 2003. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 198, 1951-7.
- NAEGER, L. K., MCKINNEY, J., SALVEKAR, A. & HOEY, T. 1999. Identification of a STAT4 binding site in the interleukin-12 receptor required for signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 1875-8.
- NEURATH, M. F. 2019. IL-23 in inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 45, 1-8.
- NIEDEBALA, W., WEI, X. Q., CAI, B., HUEBER, A. J., LEUNG, B. P., MCINNES, I. B. & LIEW, F. Y. 2007. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *European Journal of Immunology*, 37, 3021-9.
- OLIVEIRA, M. L., AKKAPEDDI, P., RIBEIRO, D., MELAO, A. & BARATA, J. T. 2019. IL-7R-mediated signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia: An update. *Advances in Biological Regulation*, 71, 88-96.
- OPPMANN, B., LESLEY, R., BLOM, B., TIMANS, J. C., 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, J. S., MOORE, K. W., RENNICK, D., DE WAAL-MALEFYT, R., HANNUM, C., BAZAN, J. F. & KASTELEIN, R. A. 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, 13, 715-25.
- PARHAM, C., CHIRICA, M., TIMANS, J., VAISBERG, E., TRAVIS, M., CHEUNG, J., PFLANZ, S., ZHANG, R., SINGH, K. P., VEGA, F., TO, W., WAGNER, J., O'FARRELL, A. M., MCCLANAHAN, T., ZURAWSKI, S., HANNUM, C., GORMAN, D., RENNICK, D. M., KASTELEIN, R. A., DE WAAL MALEFYT, R. & MOORE, K. W. 2002. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *Journal of Immunology*, 168, 5699-708.
- PARK, H., LI, Z., YANG, X. O., CHANG, S. H., NURIEVA, R., WANG, Y. H., WANG, Y., HOOD, L., ZHU, Z., TIAN, Q. & DONG, C. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology*, 6, 1133-41.
- PFLANZ, S., HIBBERT, L., MATTSON, J., ROSALES, R., VAISBERG, E., BAZAN, J. F., PHILLIPS, J. H., MCCLANAHAN, T. K., DE WAAL MALEFYT, R. & KASTELEIN, R. A. 2004. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *Journal of Immunology*, 172, 2225-31.

- PFLANZ, S., TIMANS, J. C., CHEUNG, J., ROSALES, R., KANZLER, H., GILBERT, J., HIBBERT, L., CHURAKOVA, T., TRAVIS, M., VAISBERG, E., BLUMENSCHNEIN, W. M., MATTSON, J. D., WAGNER, J. L., TO, W., ZURAWSKI, S., MCCLANAHAN, T. K., GORMAN, D. M., BAZAN, J. F., DE WAAL MALEFYT, R., RENNICK, D. & KASTELEIN, R. A. 2002. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4⁺ T cells. *Immunity*, 16, 779-90.
- PILATI, C. & ZUCMAN-ROSSI, J. 2015. Mutations leading to constitutive active gp130/JAK1/STAT3 pathway. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 26, 499-506.
- POUSSIN, K., PILATI, C., COUCHY, G., CALDERARO, J., BIOULAC-SAGE, P., BACQ, Y., PARADIS, V., LETEURTRE, E., STURM, N., RAMOS, J., GUETTIER, C., BARDIER-DUPAS, A., BOULAI, A., WENDUM, D., SELVES, J., IZARD, T., NAULT, J. C. & ZUCMAN-ROSSI, J. 2013. Biochemical and functional analyses of gp130 mutants unveil JAK1 as a novel therapeutic target in human inflammatory hepatocellular adenoma. *Oncoimmunology*, 2, e27090.
- PRESKY, D. H., YANG, H., MINETTI, L. J., CHUA, A. O., NABAVI, N., WU, C. Y., GATELY, M. K. & GUBLER, U. 1996. 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*, 93, 14002-7.
- RASMUSSEN, T. K., ANDERSEN, T., HVID, M., HETLAND, M. L., HORSLEV-PETERSEN, K., STENGAARD-PEDERSEN, K., HOLM, C. K. & DELEURAN, B. 2010. Increased interleukin 21 (IL-21) and IL-23 are associated with increased disease activity and with radiographic status in patients with early rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*, 37, 2014-20.
- RASSOW, J., HAUSER, K., NETZKER, R. & DEUTZMANN, R. 2012. *Duale Reihe Biochemie*, Georg Thieme Verlag KG.
- RAWLINGS, J. S., ROSLER, K. M. & HARRISON, D. A. 2004. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*, 117, 1281-3.
- RE, F. & STROMINGER, J. L. 2001. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 37692-9.
- REBOUISSOU, S., AMESSOU, M., COUCHY, G., POUSSIN, K., IMBEAUD, S., PILATI, C., IZARD, T., BALABAUD, C., BIOULAC-SAGE, P. & ZUCMAN-ROSSI, J. 2009. Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature*, 457, 200-4.
- REMY, I., WILSON, I. A. & MICHNICK, S. W. 1999. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science*, 283, 990-3.
- ROSE-JOHN, S., SCHELLER, J. & SCHAPER, F. 2015. "Family reunion"--A structured view on the composition of the receptor complexes of interleukin-6-type and interleukin-12-type cytokines. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 26, 471-4.
- RUSSELL, T. D., YAN, Q., FAN, G., KHALIFAH, A. P., BISHOP, D. K., BRODY, S. L. & WALTER, M. J. 2003. IL-12 p40 homodimer-dependent macrophage chemotaxis and respiratory viral inflammation are mediated through IL-12 receptor beta 1. *Journal of Immunology*, 171, 6866-74.
- SABATH, D. F., KAUSHANSKY, K. & BROUDY, V. C. 1999. Deletion of the extracellular membrane-distal cytokine receptor homology module of Mpl results in constitutive cell growth and loss of thrombopoietin binding. *Blood*, 94, 365-7.
- SCHRODER, J., MOLL, J. M., BARAN, P., GROTZINGER, J., SCHELLER, J. & FLOSS, D. M. 2015. 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. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 359-70.
- SCHUSTER, B., MEINERT, W., ROSE-JOHN, S. & KALLEN, K. J. 2003. The human interleukin-6 (IL-6) receptor exists as a preformed dimer in the plasma membrane. *FEBS Letters*, 538, 113-6.
- SCHUTT, A., ZACHARIAS, M., SCHNEIDER, N., HORN, S., GROTZINGER, J., ROSE-JOHN, S. & SCHMIDT-ARRAS, D. 2013. gp130 activation is regulated by D2-D3 interdomain connectivity. *Biochemical Journal*, 450, 487-96.
- SENKEVITCH, E., LI, W., HIXON, J. A., ANDREWS, C., CRAMER, S. D., PAULY, G. T., BACK, T., CZARRA, K. & DURUM, S. K. 2018. Inhibiting Janus Kinase 1 and BCL-2 to treat T cell acute lymphoblastic leukemia with IL7-Ralpha mutations. *Oncotarget*, 9, 22605-22617.
- SHERLOCK, J. P., JOYCE-SHAIKH, B., TURNER, S. P., CHAO, C. C., SATHE, M., GREIN, J., GORMAN, D. M., BOWMAN, E. P., MCCLANAHAN, T. K., YEARLEY, J. H., EBERL, G., BUCKLEY, C. D., KASTELEIN, R. A., PIERCE, R. H., LAFACE, D. M. & CUA, D. J. 2012. IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR-gamma+ CD3+CD4-CD8- enthesal resident T cells. *Nature Medicine*, 18, 1069-76.
- SHOCHAT, C., TAL, N., BANDAPALLI, O. R., PALMI, C., GANMORE, I., TE KRONNIE, G., CARIO, G., CAZZANIGA, G., KULOZIK, A. E., STANULLA, M., SCHRAPPE, M., BIONDI, A., BASSO, G., BERCOVICH, D., MUCKENTHALER, M. U. & IZRAELI, S. 2011. Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor-alpha (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *Journal of Experimental Medicine*, 208, 901-8.
- SHUM, T., OMER, B., TASHIRO, H., KRUSE, R. L., WAGNER, D. L., PARIKH, K., YI, Z., SAUER, T., LIU, D., PARIHAR, R., CASTILLO, P., LIU, H., BRENNER, M. K., METELITSA, L. S., GOTTSCHALK, S. & ROONEY, C. M. 2017. Constitutive signaling from an engineered IL7 receptor promotes durable tumor elimination by tumor-redirectioned T cells. *Cancer Discovery*, 7, 1238-1247.
- SI, W., LI, C. & WEI, P. 2018. Synthetic immunology: T-cell engineering and adoptive immunotherapy. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 3, 179-185.
- SKINIOTIS, G., BOULANGER, M. J., GARCIA, K. C. & WALZ, T. 2005. Signaling conformations of the tall cytokine receptor gp130 when in complex with IL-6 and IL-6 receptor. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12, 545-51.
- STAERK, J., LACOUT, C., SATO, T., SMITH, S. O., VAINCHENKER, W. & CONSTANTINESCU, S. N. 2006. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood*, 107, 1864-71.
- STUHLMANN-LAEISZ, C., LANG, S., CHALARIS, A., KRZYSZTOF, P., ENGE, S., EICHLER, J., KLINGMULLER, U., SAMUEL, M., ERNST, M., ROSE-JOHN, S. & SCHELLER, J. 2006. Forced dimerization of gp130 leads to constitutive STAT3 activation, cytokine-independent growth, and blockade of differentiation of embryonic stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 2986-95.
- SUTHAUS, J., TILLMANN, A., LORENZEN, I., BULANOVA, E., ROSE-JOHN, S. & SCHELLER, J. 2010. Forced homo- and heterodimerization of all gp130-type receptor complexes leads to constitutive ligand-independent signaling and cytokine-independent growth. *Molecular Biology of the Cell*, 21, 2797-807.
- TAIT WOJNO, E. D., HUNTER, C. A. & STUMHOFER, J. S. 2019. The Immunobiology of the Interleukin-12 family: room for discovery. *Immunity*, 50, 851-870.

- TANNER, J. W., CHEN, W., YOUNG, R. L., LONGMORE, G. D. & SHAW, A. S. 1995. The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 6523-30.
- TATO, C. M. & CUA, D. J. 2008a. SnapShot: Cytokines I. *Cell*, 132, 324, 324 e1.
- TATO, C. M. & CUA, D. J. 2008b. SnapShot: Cytokines II. *Cell*, 132, 500.
- TATO, C. M. & CUA, D. J. 2008c. SnapShot: Cytokines III. *Cell*, 132, 900.
- TATO, C. M. & CUA, D. J. 2008d. SnapShot: Cytokines IV. *Cell*, 132, 1062 e1-2.
- TENG, M. W., ANDREWS, D. M., MCLAUGHLIN, N., VON SCHEIDT, B., NGIOW, S. F., MOLLER, A., HILL, G. R., IWAKURA, Y., OFT, M. & SMYTH, M. J. 2010. IL-23 suppresses innate immune response independently of IL-17A during carcinogenesis and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 8328-33.
- TENHUMBERG, S., SCHUSTER, B., ZHU, L., KOVALEVA, M., SCHELLER, J., KALLEN, K. J. & ROSE-JOHN, S. 2006. gp130 dimerization in the absence of ligand: preformed cytokine receptor complexes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346, 649-57.
- TSAI, Y. C. & TSAI, T. F. 2017. Anti-interleukin and interleukin therapies for psoriasis: current evidence and clinical usefulness. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 9, 277-294.
- USACHEVA, A., SANDOVAL, R., DOMANSKI, P., KOTENKO, S. V., NELMS, K., GOLDSMITH, M. A. & COLAMONICI, O. R. 2002. Contribution of the Box 1 and Box 2 motifs of cytokine receptors to Jak1 association and activation. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 48220-6.
- VAKNIN-DEMBINSKY, A., BALASHOV, K. & WEINER, H. L. 2006. IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *Journal of Immunology*, 176, 7768-74.
- VERRECK, F. A., DE BOER, T., LANGENBERG, D. M., HOEVE, M. A., KRAMER, M., VAISBERG, E., KASTELEIN, R., KOLK, A., DE WAAL-MALEFYT, R. & OTTENHOFF, T. H. 2004. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 4560-5.
- VIGNALI, D. A. & KUCHROO, V. K. 2012. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Immunology*, 13, 722-8.
- WANG, R. X., YU, C. R., DAMBUZA, I. M., MAHDI, R. M., DOLINSKA, M. B., SERGEEV, Y. V., WINGFIELD, P. T., KIM, S. H. & EGWUAGU, C. E. 2014. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nature Medicine*, 20, 633-41.
- WANG, R. X., YU, C. R., MAHDI, R. M. & EGWUAGU, C. E. 2012. Novel IL27p28/IL12p40 cytokine suppressed experimental autoimmune uveitis by inhibiting autoreactive Th1/Th17 cells and promoting expansion of regulatory T cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 36012-21.
- WANG, X., WEI, Y., XIAO, H., LIU, X., ZHANG, Y., HAN, G., CHEN, G., HOU, C., MA, N., SHEN, B., LI, Y., EGWUAGU, C. E. & WANG, R. 2016. A novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in Lupus-like mice. *European Journal of Immunology*, 46, 1343-50.
- WATOWICH, S. S., YOSHIMURA, A., LONGMORE, G. D., HILTON, D. J., YOSHIMURA, Y. & LODISH, H. F. 1992. Homodimerization and constitutive activation of the

- erythropoietin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 2140-4.
- WEN, S. R., LIU, G. J., FENG, R. N., GONG, F. C., ZHONG, H., DUAN, S. R. & BI, S. 2012. Increased levels of IL-23 and osteopontin in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, 244, 94-6.
- WIEDERKEHR-ADAM, M., ERNST, P., MULLER, K., BIECK, E., GOMBERT, F. O., OTTL, J., GRAFF, P., GROSSMULLER, F. & HEIM, M. H. 2003. Characterization of phosphopeptide motifs specific for the Src homology 2 domains of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and STAT3. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 16117-28.
- WILMES, S., BEUTEL, O., LI, Z., FRANCOIS-NEWTON, V., RICHTER, C. P., JANNING, D., KROLL, C., HANHART, P., HOTTE, K., YOU, C., UZE, G., PELLEGRINI, S. & PIEHLER, J. 2015. Receptor dimerization dynamics as a regulatory valve for plasticity of type I interferon signaling. *Journal of Cell Biology*, 209, 579-93.
- WILSON, N. J., BONIFACE, K., CHAN, J. R., MCKENZIE, B. S., BLUMENSCHNEIN, W. M., MATTSON, J. D., BASHAM, B., SMITH, K., CHEN, T., MOREL, F., LECRON, J. C., KASTELEIN, R. A., CUA, D. J., MCCLANAHAN, T. K., BOWMAN, E. P. & DE WAAL MALEFYT, R. 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature Immunology*, 8, 950-7.
- WOJNO, E. D. & HUNTER, C. A. 2012. New directions in the basic and translational biology of interleukin-27. *Trends in Immunology*, 33, 91-7.
- WOLF, S. F., TEMPLE, P. A., KOBAYASHI, M., YOUNG, D., DICIG, M., LOWE, L., DZIALO, R., FITZ, L., FERENZ, C., HEWICK, R. M. & ET AL. 1991. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *Journal of Immunology*, 146, 3074-81.
- WU, C., WANG, X., GADINA, M., O'SHEA, J. J., PRESKY, D. H. & MAGRAM, J. 2000. IL-12 receptor beta 2 (IL-12R beta 2)-deficient mice are defective in IL-12-mediated signaling despite the presence of high affinity IL-12 binding sites. *Journal of Immunology*, 165, 6221-8.
- WU, S., RHEE, K. J., ALBESIANO, E., RABIZADEH, S., WU, X., YEN, H. R., HUSO, D. L., BRANCATI, F. L., WICK, E., MCALLISTER, F., HOUSSEAU, F., PARDOLL, D. M. & SEARS, C. L. 2009. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nature Medicine*, 15, 1016-22.
- YAN, J., SMYTH, M. J. & TENG, M. W. L. 2018. Interleukin (IL)-12 and IL-23 and their conflicting roles in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10.
- YANG, X. O., PANOPOULOS, A. D., NURIEVA, R., CHANG, S. H., WANG, D., WATOWICH, S. S. & DONG, C. 2007. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 9358-63.
- YAO, B. B., NIU, P., SUROWY, C. S. & FALTYNEK, C. R. 1999. Direct interaction of STAT4 with the IL-12 receptor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 368, 147-55.
- YOSHIMURA, A., LONGMORE, G. & LODISH, H. F. 1990. Point mutation in the extracellular domain of the erythropoietin receptor resulting in hormone-independent activation and tumorigenicity. *Nature*, 348, 647-9.
- YU, R. Y., BRAZAITIS, J. & GALLAGHER, G. 2015. The human IL-23 receptor rs11209026 A allele promotes the expression of a soluble IL-23R-encoding mRNA species. *Journal of Immunology*, 194, 1062-8.

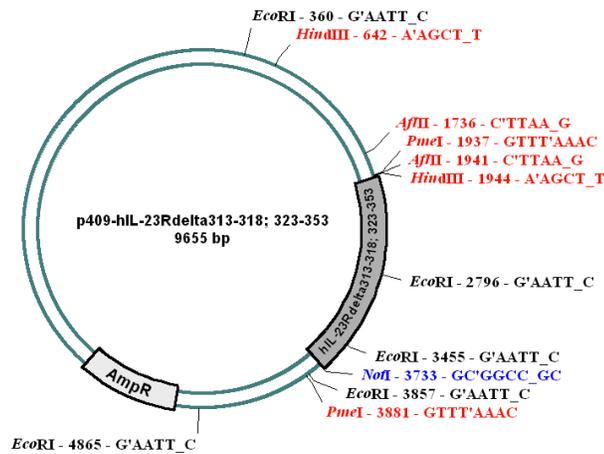
- YU, R. Y. & GALLAGHER, G. 2010. A naturally occurring, soluble antagonist of human IL-23 inhibits the development and in vitro function of human Th17 cells. *Journal of Immunology*, 185, 7302-8.
- ZENATTI, P. P., RIBEIRO, D., LI, W., ZUURBIER, L., SILVA, M. C., PAGANIN, M., TRITAPOE, J., HIXON, J. A., SILVEIRA, A. B., CARDOSO, B. A., SARMENTO, L. M., CORREIA, N., TORIBIO, M. L., KOBARG, J., HORSTMANN, M., PIETERS, R., BRANDALISE, S. R., FERRANDO, A. A., MEIJERINK, J. P., DURUM, S. K., YUNES, J. A. & BARATA, J. T. 2011. Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, 43, 932-9.
- ZHANG, M., CAI, Z. R., ZHANG, B., CAI, X., LI, W., GUO, Z. & MA, L. 2014. Functional polymorphisms in interleukin-23 receptor and susceptibility to coronary artery disease. *DNA and Cell Biology*, 33, 891-7.
- ZOU, J., PRESKY, D. H., WU, C. Y. & GUBLER, U. 1997. Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 6073-7.
- ZUNIGA, L. A., JAIN, R., HAINES, C. & CUA, D. J. 2013. Th17 cell development: from the cradle to the grave. *Immunological Reviews*, 252, 78-88.

6 Anhang

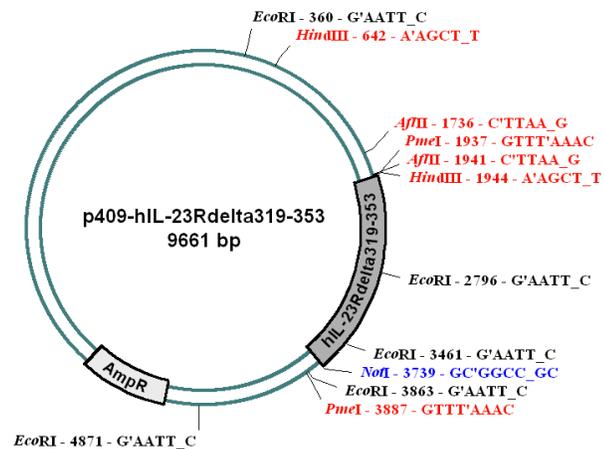
Vektorkarten

Im Folgenden dargestellt sind die in dieser Arbeit klonierten p409-Vektoren der humanen und murinen IL-23R-Deletionsvarianten sowie der GFP- und FLAG-markierten mLIL-23R Δ 317-372-Variante. Markiert sind DNA-Abschnitte, die für den entsprechenden Rezeptor (dunkelgrau), sowie eine Antibiotikaresistenz (AmpR) (hellgrau) kodieren. Zudem sind ausgewählte Restriktionsschnittstellen eingezeichnet. Die jeweiligen Vektorgrößen sind in bp angegeben.

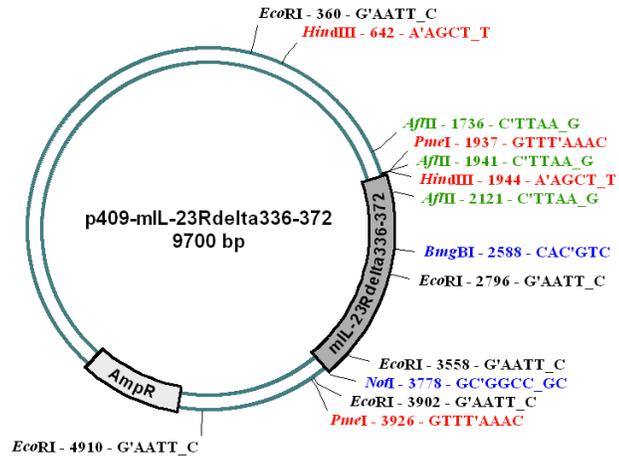
p409-hIL-23R Δ 313-318; 323-353



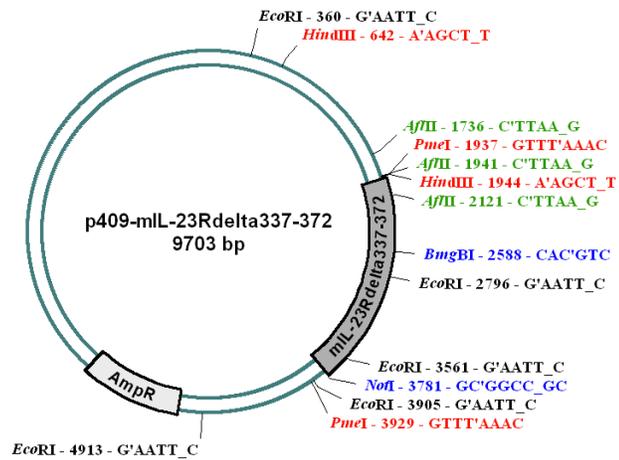
p409-hIL-23R Δ 319-353



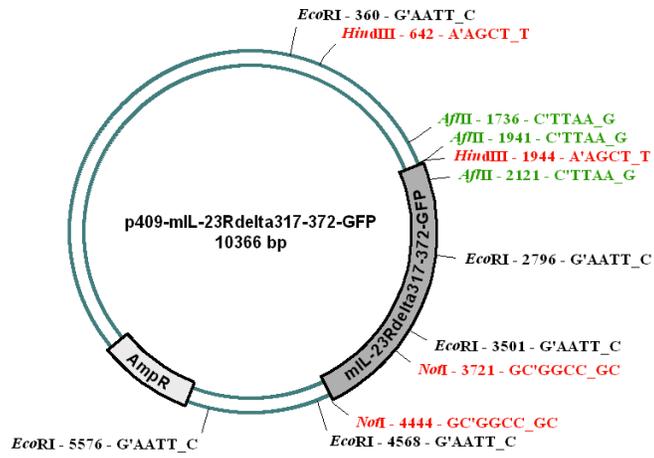
p409-mIL-23RΔ336-372



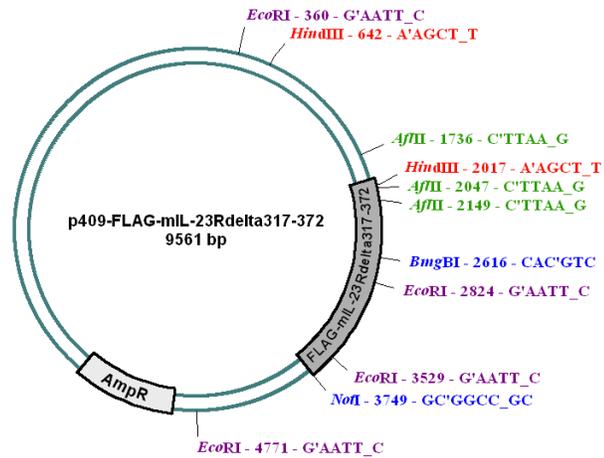
p409-mIL-23RΔ337-372



p409-mIL-23RΔ317-372-GFP



p409-FLAG-mIL-23RΔ317-372



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich sowohl fachlich als auch persönlich im Rahmen dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Scheller, der mir mit der Möglichkeit zur Durchführung dieser Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl die Türe zum wissenschaftlichen Arbeiten geöffnet und mich bei der Umsetzung der gesamten Arbeit stets mit großem Interesse und wertvoller Kritik begleitet hat.

Ganz besonderen Dank spreche ich PD Dr. Doreen Floß für die direkte wissenschaftliche Betreuung während meiner Zeit im Labor und der Niederschrift dieser Arbeit aus. Nur durch ihre ansteckende Begeisterung für das Projekt, ihren unermüdlichen Einsatz und die zuverlässige Unterstützung auch über diese Arbeit hinaus ließ sich diese Dissertation realisieren.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Molekularbiologie und Biochemie II, insbesondere Petra Oprée-Jeremic, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die gelungene Zusammenarbeit. Das angenehme Arbeitsklima habe ich stets genossen und geschätzt.

Großer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder für ihre Geduld und stetigen Rückhalt.

Schließlich danke ich Franziska Wohlfarth für unsere großartige Teamarbeit und unserer Tochter Frida, die mir mit ihrem unermüdlichen Willen gezeigt hat, was Durchhaltevermögen bedeutet.