Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller

Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion von IL-23 und eines möglichen Einflusses von SOCS3 und CIB2

Dissertation

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

vorgelegt von

Franz Christian Horstmeier

2022

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. Jürgen Scheller

Zweitgutacher/in: Prof. Dr. Marc Jacobsen

Zusammenfassung

Interleukine gehören zu den Zytokinen. Ihnen kommt eine wichtige Funktion in der Vermittlung und Regulation in diversen Prozessen zu, insbesondere jedoch im Rahmen der Immunmodulation. Ebenso tragen Interleukine zur Entstehung von Krankheiten bei. Interleukin-23 (IL-23) spielt unter anderem eine Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Psoriasis und rheumatoider Arthritis. Antikörper gegen IL-23 werden bereits erfolgreich zur Behandlung von Morbus Crohn eingesetzt. Die systemische Blockade der IL-23 Signaltransduktion verursacht jedoch auch Nebenwirkungen. Durch Identifikation von weiteren intrazellulären Bindungspartnern des Rezeptors, Modulatoren der IL-23 Signalkaskade und physiologischen Inhibitoren wird eventuell eine gezieltere, nebenwirkungsärmere Therapie möglich. Viele verwandte Interleukine unterliegen einem negativen *feedback loop* durch *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) Proteine, insbesondere SOCS3. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die IL-23 Signaltransduktion keinem negativen *feedback loop* durch SOCS3 unterliegt. SOCS3 zeigt einen starken negativen Effekt auf die Signaltransduktion von IL-6, da es mit der Rezeptoruntereinheit gp130 interagiert. Das SOCS3 Bindemotiv aus gp130 ist bekannt und wurde im Rahmen dieser Arbeit in den IL-23 Rezeptor (IL-23R) eingebracht. Die erzeugte Rezeptorvariante führte jedoch nicht zu einer Inhibition der IL-23 Signaltransduktion durch SOCS3. Im Rahmen der Versuche fiel ein Abbruch der Proliferation von Ba/F3 Zellen mit heterodimerem humanem IL-23 Rezeptor unter hohen IL-23 Konzentrationen auf, dessen Ursache und Funktion bisher nicht geklärt ist.

In Vorarbeiten wurde das Protein *calcium and integrin binding protein 2* (CIB2) als möglicher Bindungspartner des IL-23R identifiziert. Über die Funktion von CIB2 ist bisher wenig bekannt. Unter anderem ist eine tumorsuppressive Wirkung für die onkogene Signaltransduktion über Sphingosinkinase 1 bekannt, durch Blockierung der Translokation des Enzyms zur Zellmembran. Die Bindung an den IL-23R wurde in dieser Arbeit bestätigt. Anhand von Rezeptordeletionsvarianten wurde die Bindestelle am IL-23R eingegrenzt. Für die Untersuchungen wurde das Fusionsprotein CIB2-GFP verwendet. Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Interaktion zwischen CIB2 und dem IL-23R wurde ein Fusionsprotein aus IL-23R und mCherry generiert. Nach Ko-Transfektion adhärenter Zellen mit beiden Fusionsproteinen zeigte sich eine Verlagerung des Transmembranproteins IL-23R vom Außenrand der Zelle in das Zellinnere.

Summary

Interleukins are cytokines that regulate a plethora of different processes. They play an especially important role in immunomodulation. However, interleukins also contribute to the pathogenesis of diseases. Interleukin-23 (IL-23) is involved in crohn's disease, ulcerative colitis, psoriasis and rheumatoid arthritis. Antibodies directed against IL-23 are already successfully used in the treatment of crohn's disease but systemic blockage of IL-23 also causes side effects. By identifying more intracellular interaction partners of the receptor, modulators of the IL-23 signaling cascade and physiological inhibitors new options for a targeted therapy with less side effects might emerge.

The signaling cascade of many related interleukins is inhibited by suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins via negative feedback loop. Esspecially SOCS3 shows a strong inhibitory function. It is shown in this study that SOCS3 does not inhibit the signaling cascade of IL-23. SOCS3 strongy inhibits the IL-6 signaling cascade by interacting with the gp130 subunit of the receptor. The binding motif of SOCS3 in gp130 is already known and was integrated into the IL-23 receptor (IL-23R) in this study. Even the generated variant of the IL-23R did not cause an inhibition of the IL-23 signaling cascade by SOCS3. During the experiments a termination of proliferation of Ba/F3 cells expressing the heterodimeric human IL-23 receptor was observed under high concentrations of IL-23. The cause and function of this phenomenon have not been discovered yet.

In preceeding studies calcium and integrin binding protein 2 (CIB2) was identified as a possible interaction partner of the IL-23R. Until now only little is known about this protein's function. A tumorsuppressive function in the oncogenic signal transduction involving sphingosine kinase 1 is described. CIB2 blocks the translocation of this enzyme to the cell membrane. In this study it is shown that CIB2 binds to the IL-23R. For the experiments the fusion protein CIB2-GFP was used. In order to analyse the interaction using fluorescence microscopy a fusion protein consisting of IL-23R and mCherry was generated. After co-transfection of adherent cells with both fusion proteins the transmembrane protein IL-23R was relocated from the outer edge of the cell to the cell's interior.

Abkürzungsverzeichnis

Elemente, chemische Verbindungen, Enzyme sowie Aminosäuresen werden nach der Nomenklatur der IUPAC und IUBMB abgekürzt. Für die physikalischen Einheiten werden die SI-Einheiten genutzt.

Ab	*antibody*
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
CAU	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
cDNA	*complementary* DNA
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CHO	*chinese hamster ovary*
CIB	*calcium and integrin binding protein*
CIS	*cytokine-inducible SH2-containing protein*
CUL	Cullin
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*deoxyribonucleic acid* (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotide
DAPI	*2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride*
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalitis
ECS	Elongin B/C-Cul2/Cul5-SOCS-*box* Protein
Ebi3	*Epstein-Barr virus induced gene 3*
ECD	extrazelluläre Domäne
E. coli	*Eschericha coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EpoR	Erythropoetin Rezeptor
et al.	*et alii*
FACS	*fluorescence activated cell sorting*

FCS	fetales Kälberserum
FNIII	Fibronektin Typ III
fwd	*forward*
G418	Geneticin
G-CSFR	*granulocyte-colony stimulating factor* Rezeptor
GFP	*green fluorescent protein*
gp	*glycoprotein*
gp130	*glycoprotein 130* (signaltransduzierende IL-6-Rezeptor-β-
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
Hek293	*human embryonic kidney cell line*
HIL-6	Hyper-IL-6
HIV	*human immunodeficiency virus*
mHIL-23	Murines Hyper-IL-23
HRP	*horseradish peroxidase*
Hygro	Hygromycin B
ICD	intrazelluläre Domäne
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFNγ	Interferon-gamma
JAK	Janus Kinase
kDa	Kilodalton
KIR	*kinase inhibitory region*
LB	Luria-Bertani
LepR	Leptinrezeptor
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin
LSM	Laser-*scanning* Mikroskop
mAb	*monoclonal antibody*
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*
mRNA	*messenger* RNA
mTORC1	*mechanistic target of rapamycin complex 1*
MS	Multiple Sklerose
NSCLC	*non small cell lung carcinoma*
NF-κB	*nuclear factor* κB
NK-Zelle	natürliche Killerzelle

PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase
PKB/Akt	Proteinkinase B
POD	Peroxidase
pSTAT3	phospho-STAT3
puro	Puromycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Rezeptor
rev	*reverse*
RFU	*relative fluorescence units*
RNA	Ribonukleinsäure
RORγt	*retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t*
RPE	Retinales Pigmentepitehl
RT-PCR	*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*
SDS	*sodium dodecyl sulphate*
SDS-PAGE	*sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*
SH2	*Src homology domain 2*
SNP	*single nucleotide polymorphism*
SOCS	*suppressor of cytokine signalling*
STAT	*signal transducer and activator of transcription*
TBST	Tris-gepufferte NaCl Lösung mit TritonX-100
TGF-β	*transforming growth factor-β*
Th	T-Helferzellen
TNF	*tumor necrosis factor*
Tyk	Tyrosinkinase der Janus-Familie
WSX-1	*WSXWS type I cytokine receptor*
Wt	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1
1.1 Interleukine ... 1
1.2 Interleukin-12-Familie ... 1
1.3 Interleukin 23 ... 2
Signaltransduktion ... 2
Biologische Funktion ... 5
Krankheit und Therapie ... 5
1.4 *Suppressor of cytokine signaling* (SOCS) ... 7
1.5 *Calcium and integrin binding protein* 2 (CIB2) ... 9
1.6 Ziele der Arbeit ... 10

2 Material und Methoden ... 12
2.1 Material ... 12
2.1.1 Antibiotika ... 12
2.1.2 Antikörper ... 12
2.1.3 Chemikalien ... 13
2.1.4 Geräte ... 14
2.1.5 Kits ... 15
2.1.6 Kulturmedien ... 16
2.1.7 Oligonukleotide ... 16
2.1.8 Plasmide ... 17
2.1.9 Puffer und Lösungen ... 17
2.1.10 Verbrauchsmaterial ... 19
2.1.11 Zellreihen und Bakterienstämme ... 19
2.1.12 Zytokine ... 21
2.2 Molekularbiologische Methoden ... 21
2.2.1 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Eschericha coli Bakterien ... 21
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ... 21
2.2.3 DNA-Gelektrophorese ... 23
2.2.4 Gelextraktion ... 24
2.2.5 Restriktionsspaltung von DNA ... 24

2.2.6 DNA-*blunting* ... 25
2.2.7 DNA-Phosphorylierung ... 25
2.2.8 Dephosphorylierung von DNA ... 25
2.2.9 Ligation ... 25
2.2.10 Präparation von Plasmid-DNA ... 26
2.2.11 Spektroskopische Messung des DNA-Gehalts ... 27
2.2.12 Sequenzierung ... 27
2.3 Zellbiologische Methoden ... 27
2.3.1 Kultivierung von Suspensionszellen ... 27
2.3.2 Kultivierung adhärenter Zellen ... 28
2.3.3 Transfektion adhärenter Zellen ... 28
2.3.4 Retrovirale Transduktion ... 29
2.3.5 Durchflusszytometrie ... 29
2.3.6 Proliferationsassay Ba/F3-gp130 Zellen ... 30
2.3.7 Stimulationsassay ... 31
2.3.8 Fluoreszenzmikroskopie ... 31
2.4 Proteinbiochemische Methoden ... 33
2.4.1 Herstellung von Zelllysaten ... 33
2.4.2 Quantifizierung von Proteinen mittels Bicinchoninsäure (BCA) ... 33
2.4.3 Western Blot ... 33
2.4.4 Immunpräzipitation ... 35

3 Ergebnisse ... 37
3.1 Klonierung eines humanen IL-23R mit SOCS3 Bindemotiv ... 38
3.2 SOCS3 inhibiert nicht die IL-23 Signaltransduktion ... 43
3.3 Ba/F3-gp130 Zellen mit heterodimerem IL-23R und SOCS3 Bindemotiv im IL-23R proliferieren und zeigen ein verändertes Proliferationsverhalten als Zellen mit Wildtyp IL-23 Rezeptor ... 48
3.4 Hohe Konzentrationen von IL-23 verringern die Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen mit heterodimerem hIL-23 Rezeptor ... 50
3.5 Klonierung der CIB2 Expressionsvektoren ... 53
3.6 Das zytoplasmatische Protein CIB2 bindet an den IL-23 Rezeptor ... 56
3.7 CIB2 beeinflusst die IL-23 abhängige STAT3 Phosphporylierung ... 62
3.8 CIB2 beeinflusst die IL-23 abhängige Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen ... 64

3.9 Klonierung des Expressionsvektors p409-hIL-23R-mCherry zur Anwendung in der Fluoreszenzmikroskopie 69
3.10 hCIB2 beeinflusst den intrazellulären Transport des hIL-23R 72

4 Diskussion 74
4.1 SOCS3 inhibiert nicht die IL-23 abhängige STAT3 Phosphorylierung 74
4.2 Hohe IL-23 Konzentrationen inhibieren die Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen mit humanem IL-23 Rezeptor 77
4.3 CIB2-GFP bindet an den humanen und murinen IL-23R und verändert die intrazelluläre Verteilung von hIL-23R-mCherry 80
4.4 Mögliche Bedeutung der Interaktion zwischen CIB2 und IL-23R 83
4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick 85

5 Literatur- und Quellenverzeichnis 87
6 Anhang 94
6.1 Vektorkarten 94

1 Einleitung

1.1 Interleukine

Interleukine sind Peptidhormone, die zur Gruppe der Zytokine gehören (1). Sie werden von Zellen des Immunsystems, wie z.B. Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen, sowie von nicht immunkompetenten Zellen wie Fibroblasten und Keratinozyten synthetisiert und sezerniert (2, 3). Interleukine setzen über Membranrezeptoren auf der Zielzelle intrazelluläre Signalkaskaden in Gang (4). Auf diesem Weg regulieren sie diverse Funktionen wie Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Zytokinproduktion (3). Die Interleukine werden anhand von Ähnlichkeiten in ihrer Sequenz, ihren Funktionen sowie Rezeptoruntereinheiten in unterschiedliche Familien eingeteilt (2).

1.2 Interleukin-12-Familie

Die Interleukin-12-Familie spielt eine wichtige Rolle in der Differenzierung von T-Zellen (2). Die Zytokine der IL-12-Familie bestehen aus einer α-Kette (p19, p28 oder p35) und einer β-Kette (p40 oder *epstein-barr virus induced gene 3* [Ebi3]) (5, 6). Die α-Ketten sind charakterisiert durch eine 4-Helix-Bündel Faltung, die auch in IL-6 und verwandten Zytokinen, die eine Signaltransduktion über gp130 vermitteln, vorliegt (5). Die β-Ketten der IL-12 Zytokine bestehen aus einer Ig-ähnlichen Domäne und zwei FNIII Domänen und sind somit strukturell aufgebaut wie die extrazelluläre Domäne des IL-6R (5, 7). Zur Interleukin-12-Familie gehören die heterodimeren Zytokine IL-12 (p35/p40), IL-23 (p19/p40), IL-27 (p28/Ebi3), IL-35 (p35/Ebi3) und IL-39 (p19/Ebi3) (5, 6, 8, 9). Die Rezeptoren dieser Zytokinfamilie bestehen aus den Untereinheiten IL-12Rβ1, IL-12Rβ2, WSX-1, IL-23R und gp130 (5, 6). Durch Dimerisierung entstehen die heterodimeren Rezeptoren für IL-12 (IL-12Rβ1/IL-12Rβ2), IL-23 (IL-12Rβ1/IL-23R), IL-27 (WSX-1/gp130) und IL-39 (IL23R/gp130) (10–12). IL-35 ist hierbei besonders, da die Signaltransduktion über IL-12Rβ2/gp130, IL-12Rβ2/IL-12Rβ2, gp130/gp130 und IL-12Rβ2/WSX-1 erfolgen kann (6, 13, 14). Aufgrund struktureller Homologien, wird die IL-12 Familie und die IL-6 Familie auch als IL-6/IL-12 Superfamilie zusammengefasst (15). Hierbei stellen IL-27 und IL-35 interfamiliäre Bindeglieder dar, da beide Zytokine gp130 als Rezeptorkette nutzen (16). Die Rezeptorkette gp130 besteht aus einer N-terminalen Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domäne, fünf Fibronektin Typ-III (FNIII) Domänen, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne mit fünf Tyrosinresten (5). Die

beiden N-terminal gelegenen FNIII Domänen bilden gemeinsam die zytokinbindende Domäne, die mit den α-Ketten der IL-6 Zytokine interagieren kann (5). Der Aufbau der Rezeptoruntereinheiten der IL-12 Familie weißt eine ähnliche Struktur auf, wobei IL-12Rβ1 und WSX-1 keine N-terminale Ig-ähnliche Domäne besitzen und der IL-23R anstelle der drei membrannahen FNIII Domänen eine *stalk* Region, ähnlich dem IL-6Rα, aufweißt (s. Abb. 1) (5, 12, 17, 18). Eine weitere Gemeinsamkeit ist das WSXWS Motiv, das C-terminal in der zweiten FNIII Domäne der extrazellulären Rezeptordomäne und ebenfalls in den β-Ketten der IL-12 Zytokine liegt (5). Die Funktion dieses Motivs ist bisher nicht geklärt und es wird eine Beteiligung an der Formierung des Rezeptorkomplexes, der Signaltransduktion sowie der korrekten Faltung und dem Transport des Rezeptors diskutiert (19).

1.3 Interleukin 23

Signaltransduktion

IL-23 besteht aus der α-Kette p19 und β-Kette p40, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (s. Abb. 1) (20). Der heterodimere IL-23 Rezeptor setzt sich aus den Untereinheiten IL-12Rβ1 und IL-23R zusammen (12, 20). Durch Interaktion zwischen p19 und IL-23R sowie p40 und IL-12Rβ1 kommt es zur Dimerisierung der Rezeptorketten (21, 22). Daraufhin kommen rezeptorassoziierte Januskinasen (JAK) in Kontakt miteinander und werden durch gegenseitige Phosphorylierung aktiviert (23). Die Januskinase Tyk2 ist mit dem IL-12Rβ1 assoziiert und JAK2 mit dem IL-23R (24). Tyk2 bindet über die Box1 und Box2 Motive an den IL-12Rβ1 (24). Box1 Motive liegen membrannah in der intrazellulären Rezeptordomäne und zeigen eine hohe Konservierung zwischen verschiedenen Spezies (24, 25). Das Box1 Motiv im murinen IL-12Rβ1 liegt zwischen L598 und C606 (LCPPLPTPC) und weißt eine Ähnlichkeit mit der Box1 Konsensussequenz φφPX(I/V)PXP(E/K) auf (φ = hydrophober Rest) (24, 25). Eine weiter distal gelegene Seuqenz wird als Box2 Motiv bezeichnet, wobei diese bisher nicht genau definiert ist (25). Die Konsensussequenz für das Box2 Motiv ist als φφEφ beschrieben (25). Während das Box2 Motiv für die Bindung von Tyk2 entbehrlich ist, ist das Box1 Motiv obligat (24). Jak2 interagiert nicht über klassische Box1/2 Motive mit dem IL-23R (24). Für die Assoziation von Jak2 an den murinen IL-23R werden die Aminosäuren E455 bis E479 benötigt, wobei eine intakte intrazelluläre Domäne von N396 bis T503 Voraussetzung für eine korrekte Signaltransduktion ist und eine alleinige Bindung der Kinase an den Rezeptor nicht ausreicht (24). Für die Signaltransduktion spielen

die sieben Tyrosinreste der intrazellulären Domäne (human: Y397, Y429, Y550, Y463, Y476, Y484 und Y611) eine maßgebliche Rolle (26). Außer Y463 sind die Tyrosinreste zwischen Maus und Mensch konserviert (murin: Y416, Y448, Y469, Y496, Y504, Y542, Y626) (12). Die Tyrosine Y399, Y484, Y611 sind potentielle Ziele für s*cr homology 2* (SH2) Domänen und an die Tyrosine Y484 und Y611 binden *signal transducers and activators of transcription* (STAT) Proteine (12, 26). Die rezeptorassoziierten Januskinasen phosphorylieren Tyrosinreste der intrazellulären Rezeptordomäne und es werden Signalkaskaden über STAT-Proteine, Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), *mitogen-activated protein* Kinase (MAPK) und *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cell* (NF-κB) in Gang gesetzt (12, 26, 27). Es konnte gezeigt werden, dass JAK2 ein integraler Bestandteil der IL-23 Signaltransduktion ist, während Tyk2 entbehrlich ist (24). STAT-Proteine nutzen die intrazellulären Phosphotyrosine des Rezeptors als Bindestelle und nach Bindung wird ein Tyrosin am C-Terminus des STAT-Proteins durch Januskinasen phosphoryliert (s. Abb. 1) (23, 26). Der phosphorylierte Tyrosinrest ermöglicht die Dimerisierung phosphorylierter STAT-Proteine, woraufhin sie in den Zellkern translozieren und als Transkriptionsfaktor agieren (s. Abb. 1) (23). STAT3 spielt in der IL-23 Signaltransduktion die größte Rolle (12). Phosphoryliertes STAT3 induziert die Expression von *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3), das durch Unterbrechung des JAK/STAT-Signalwegs zu einer negativen Rückkopplung führt (28). Dies scheint der primäre Mechanismus für die Inhibition der IL-6 Signaltransduktion zu sein, allerdings konnte eine SOCS3 induzierte Unterbrechung der IL-23 vermittelten STAT3 Phosphorylierung bisher nicht gezeigt werden (s. Abb. 1) (26, 28, 29). Im Vergleich zur Signaltransduktion von IL-6 kommt es unter Stimulation mit IL-23 zu einer langsameren und prolongierten STAT3 Phosphorylierung (26).

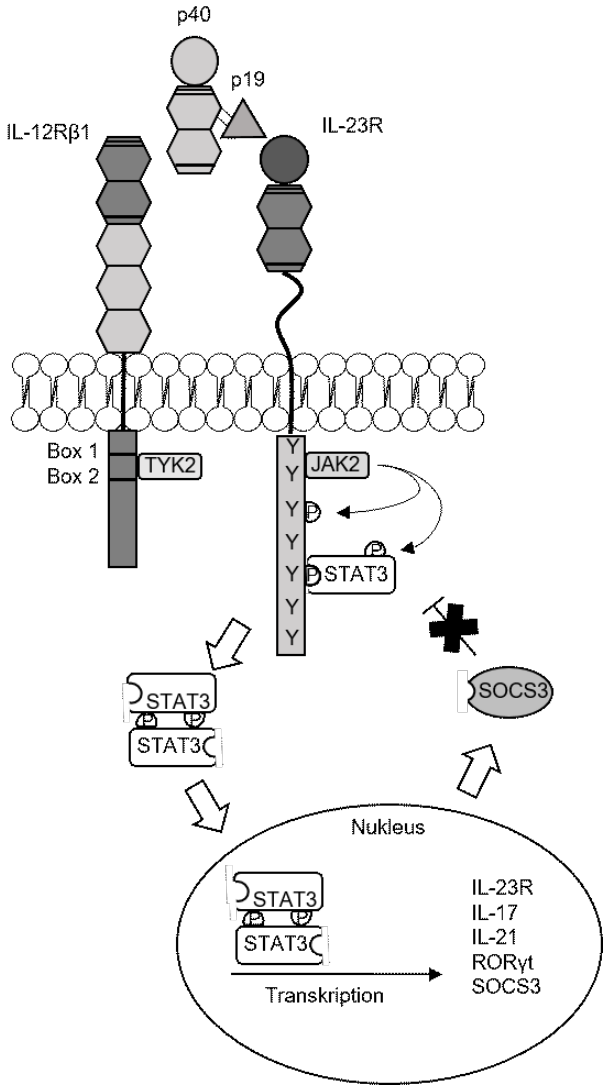


Abb. 1 Schematische Darstellung des IL-23 Rezeptors und der STAT3 Signalkaskade Das Zytokin IL-23 besteht aus der α-Kette p19 und β-Kette p40, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (20). Die Untereinheiten IL-12Rβ1 und IL-23R bilden den heterodimeren IL-23 Rezeptor (12, 20). Die Rezeptoruntereinheiten sind unterteilt in eine extrazelluläre, transmembrane und intrazelluläre Domäne (12). Die IL-23 Rezeptoruntereinheit weißt eine N-terminale Ig-ähnliche Domäne (Kreis), eine zytokinbindende Domäne (dunkelgraues Sechseck), bestehend aus zwei Fibronektin Typ-III Domänen, und eine *stalk*-Region (geschlängelte Linie) auf, über welche die extrazelluläre Domäne mit der Transmembrandomäne verbunden ist (12, 30). Die extrazelluläre Domäne der Rezeptorkette IL-12Rβ1 weißt keine Ig-ähnliche Domäne auf und besteht aus der zytokinbindenden Domäne, gefolgt von drei Fibronektin Typ-III Domänen (hellgraues Sechseck) (31). Über die Box1/2 Motive ist TYK2 mit der intrazellulären Domäne von IL-12Rβ1 assoziiert (24). In der intrazellulären Domäne von IL-23R sind sieben Tyrosinreste, die eine Rolle in der Signaltransduktion einnehmen (26). JAK2 ist mit IL-23R assoziiert und ist im Gegensatz zu Tyk2 unentbehrlich für die IL-23 Signatransduktion (24). Nach Bindung des Zytokins an den Rezeptor kommt es zur Dimerisierung und reziproken Phosphorylierung von Tyorsinresten der intrazellulären Domänen durch die rezeptorassoziierten Kinasen (21–23). STAT3 bindet an Phosphotyrosine und im Anschluss wird am C-Terminus ebenfalls ein Tyrosinrest phosphoryliert (23, 26). Dies ermöglicht eine Dimerisierung von STAT3-Proteinen, woraufhin sie in den Zellkern translozieren und als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Proteine induzieren (23). Unter anderem wird *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3), das durch Unterbrechung des JAK/STAT-Signalwegs zu einer negativen Rückkopplung führt, vermehrt exprimiert (28). Dieser Inhibitionsmechanismus konnte jedoch bisher nicht für die Signaltransduktion von IL-23 nachgewiesen werden (26, 28, 29). Abbildung modifiziert nach Parham *et al.* 2002, Babon *et al.* 2012, Floss *et al.* 2016 (12, 24, 32).

Biologische Funktion

Interleukin 23 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das durch diverse Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen, dendritische Zellen und myeloide Suppressorzellen produziert wird (2, 20, 33). Neben anderen Funktionen ist IL-23 maßgeblich an der Differenzierung und Proliferation von IL-17 produzierenden $CD4^+$-T-Zellen (T_H17-Zellen) beteiligt (1, 34). T_H17-Zellen entstehen wie T_H1- und T_H2-Zellen durch Differenzierung aus naiven $CD4^+$-T-Zellen (34). Für die Differenzierung zu T_H17-Zellen wird ein inflammatorisches Zytokin (IL-6 oder IL-21) und *transforming growth factor β* (TGF-β) benötigt (35, 36). Die zytokinvermittelte STAT3 Phosphorylierung induziert die Expression des Transkriptionsfaktors *retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor γt* (RORγt), der die Differenzierung zur T_H17-Zelle bestimmt (35). Außer RORγt kommt es durch STAT3 zur vermehrten Expression des IL-23R, IL-17 sowie IL-21 (37, 38). Die Funktion von IL-23 besteht in der Aufrechterhaltung des T_H17 Phänotyps, jedoch nicht in einer endgültigen Festlegung auf diesen Phänotyp (39). T_H17-Zellen sind Bestandteil der Immunantwort auf verschiedene pathogene Bakterien und Pilze (40, 41). Außerdem spielen sie in Autoimmunerkrankungen, Krebserkrankungen und Graft-versus-Host-Reaktionen eine Rolle (42–44). Das endogene Zytokin *Transforming growth factor beta-3* (TGF-β3) trägt maßgeblich zur Differenzierung eines pathogenen T_H17 Phänotyps bei und wird in Abhängigkeit von IL-23 produziert (45). Interleukin-23 fördert die Pathogenität weiterhin durch eine verminderte Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 (46).

IL-23 fördert die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-17, IL-22 und *tumor necrosis factor α* (TNFα) in Zielzellen (hauptsächlich T_H17- und IL-17 sezernierende Tγδ17-Zellen) und verursacht dadurch die Rekrutierung sowie Aktivierung von Granulozyten und Makrophagen, wodurch es letztendlich zu einer Gewbeschädigung und dem Entstehen einer chronischen Inflammation kommt (47). Die IL-23 vermittelte Expression von IL-17, IL-22 und RORγt in T_H17-Zellen und einigen Subpopulationen von Neutrophilen läuft über die Aktivierung von *mechanistic target of rapamycin complex 1* (mTORC1) (47, 48).

Krankheit und Therapie

Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) des IL-23R sind assoziiert mit dem Auftreten von verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) und Psoriasis (1). Beispielsweise wirken die IL-23R Varianten G149R und R381Q stark protektiv auf das Auftreten einer CED (49, 50). Die

Rezeptorvariante G149R verbleibt vermehrt im endoplasmatischen Retikulum und wird nicht zur Zellmembran transloziert (51). Durch die Mutation entsteht eine Spaltstelle im Rezeptor für PCSK-SkI-1, eine Convertase, die im Golgi-Apparat vorliegt (51, 52). Möglicherweise wird die G149R Variante im Golgi-Apparat geschnitten und somit ein vermehrter Abbau induziert (51). Die Variante R381Q führt zu einer Instabilität des Proteins, was ebenfalls zu einer geringeren Oberflächenexpression des Rezeptors führt (51). Beide Polymorphismen führen also zu einer geringen IL-23 Signaltransduktion (51). Patienten mit Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn zeigen höhere Konzentrationen von IL-23 im Blut und eine höhere Expression der IL-23 mRNA in der Darmmukosa als gesunde Patienten (53). Des Weiteren ist die IL-23/Th17-Achse als treibender Faktor für das Krankheitsbild Psoriasis beschrieben (44). Erhöhte Konzentrationen von Th17-Zellen und IL-23 konnten im Blut von betroffenen Patienten nachgewiesen werden (54). Außerdem konnte in Hautläsionen von Psoriasispatienten eine vermehrte Expression von *IL-23R* und *IL-23* beobachtet werden (54, 55). Der Nachweis, dass IL-23 notwendig für die Aufrechterhaltung einer chronischen Entzündung des Gehirns ist, gelang erstmals anhand der experimentellen Autoimmunenzephalitis (EAE), einem murinen Modell für multiple Sklerose (MS) (56). In der Entstehung und Progression maligner Tumoren ist die Rolle von IL-23 nicht eindeutig (57). Eine Überexpression von IL-23 korreliert z.B. mit einem erhöhten Risiko zur Entstehung eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC), bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) mit der Metastasierung und bei Patienten mit Brustkrebs mit einer schlechteren Prognose (58–61). Demgegenüber steht die Korrelation einer vermehrten *p19* Expression mit einem besseren Gesamtüberleben bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom (57, 62).

Durch den Einfluss von IL-23 auf viele Erkrankungen ist das Zytokin attraktiv für die gezielte Therapie mit spezifischen Antikörpern. Ustekinumab ist ein humaner, monoklonaler Antikörper, der gegen die p40 Untereinheit von IL-12 und IL-23 gerichtet ist (63). Die Wirksamkeit von Ustekinumab in der Behandlung der Psoriasis und Morbus Crohn konnte in randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudien belegt werden (64, 65). Eine Wirksamkeit in der Behandlung der Colitis ulcerosa wurde vor kurzem ebenfalls bestätigt (66). Mit Guselkumab, Tildrakizumab, Risankizumab, und Mirikizumab stehen Antikörper gegen die p19 Untereinheit von IL-23 zur Verfügung, die eine selektive Inhibition von IL-23 ohne Einfluss auf IL-12 ermöglichen (63). Die Wirksamkeit von Guselkumab und Tildrakizumab in der Behandlung von Psoriasis konnte bereits belegt werden und wird für Behandlung von CEDs untersucht (67–69).

1.4 *Suppressor of cytokine signaling* (SOCS)

Zur Familie der intrazellulären SOCS Proteine gehören SOCS1-7 und *cytokine-inducible SH2-containing protein* (CIS) (70–72). Diese Proteine haben eine zentrale SH2-Domäne, eine SOCS *box* am C-Terminus und unterscheiden sich in der Länge und Sequenz ihrer N-terminalen Domäne (s. Abb. 2) (70, 71). Die SOCS *box* besteht aus 40 Aminosäuren und zeigt bei den SOCS Proteinen eine starke Homologie (71). Die Regulation der SOCS Proteine kann auf der Ebene der Transkription und Translation erfolgen, aber auch post-translational (73). SOCS Proteine können durch den JAK/STAT Signalweg induziert werden und üben auf diesen Signalweg, im Sinne einer negativen Rückkopplung, eine hemmende Wirkung aus (73, 74). Dies kann durch Blockierung der STAT Rekrutierung an den Rezeptor, Markierung des Rezeptors für den Abbau, Inhibition der Kinasefunktion der JAKs und durch Markierung der JAKs für den Abbau erfolgen (73). Die SOCS Proteine haben die Funktion einer E3 Ubiquitin-Ligase, worüber die Markierung der genannten Proteine für den Abbau durch das Proteasom erfolgt (75). Die hierfür benötigte Einbindung in den Elongin B/C-Cul2/Cul5-SOCS-*box* Protein (ECS) Komplex erfolgt durch Interaktion zwischen der SOCS *box* und Elongin B/C sowie Cul5 (76, 77). Die zentrale SH2-Domäne diktiert das spezifische Ziel des jeweiligen SOCS Proteins, indem sie an weitere Aminosäurereste in der direkten Umgebung des Phosphotyrosins bindet (32, 72, 75).

Durch Gen-*knockout* Versuche konnte IL-6 als eins der Zytokine identifiziert werden, das am stärksten durch SOCS3 reguliert wird (78). In Versuchen mit Mäusen mit einem SOCS3 *knockout* in Hepatozyten oder Makrophagen wurde gezeigt, dass es in Abwesenheit von SOCS3 zu einer verlängerten IL-6 induzierten STAT1 und STAT3 Aktivierung kommt (78). SOCS3 wird durch STAT3 induziert und terminiert über eine negative Rückwirkung die JAK/STAT Signalkaskade, was der primäre Mechanismus zur Regulation der IL-6 Signaltransduktion zu sein scheint (28). Die zentrale SH2-Domäne von SOCS3 vermittelt eine starke Bindung an Phsphotyrosinreste von Rezeptoren, an die JAKs binden (79). In gp130, einer Rezeptoruntereinheit, die sich Zytokine der IL-6 Familie teilen, konnte im murinen Rezeptor pY757 (p759 human) als hochaffine Bindungsstelle für SOCS3 indentifiziert werden (28, 79, 80). Die SH2-Domäne von SOCS3 bindet ihr Substrat mit einer höheren Affinität als andere SH2-Domänen, indem sie zusätzlich mit N-terminal gelegenen Aminosäureresten in Kontakt tritt, während die meisten SH2-Domänen nur an C-terminal gelegene Reste binden (32, 79). Dementsprechend wurde in gp130 das SOCS3 Bindemotiv „VE(pY)STVVH“ identifiziert (79). Hierbei ist anzumerken, dass SOCS3 mit

einer höheren Affinität an gp130 bindet, als an die identifizierte Bindestellen im Leptin- oder Erythropoetin-Rezeptor, wobei insbesondere das Valin an Stelle pY-2 in gp130 für eine hohe Affinität sorgt (79, 81). Eine weitere Besonderheit von SOCS3 ist die N-terminal gelegene *kinase inhibitory region* (KIR), die eine direkte Inhibition der katalytischen Funktion der Januskinase ermöglicht (s. Abb. 2) (28, 82). Sie verwehrt Substraten wie STAT3 durch partielle Blockierung der Substratbindestelle den Zugang zur Kinase, beeinflusst aber nicht die Bindung von ATP an die Kinase (28). Somit ist SOCS3 ein nicht-kompetitiver Inhibitor von JAK (83).

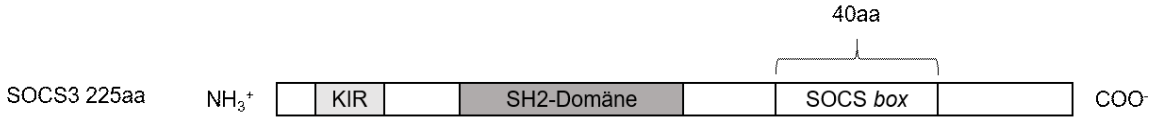


Abb. 2 Schematischer Aufbau von SOCS3
SOCS3 besteht aus 225 Aminosäuren (uniprot O14543). Am N-terminalen Ende findet sich die *kinase inhibitory region* (KIR), die JAK inhibiert (28, 82). Die zentrale SH2-Domäne vermittelt die Bindung an spezifische Zielproteine (32, 72, 75). Die C-terminal gelegene SOCS *box* interagiert mit Elongin B/C und Cul5 und ist für die Funktion als Ubiquitin-Ligase verantwortlich (76, 77). Abbildung in Anlehnung an Mahony *et al.* 2016 (84).

Der Inhibitionsmechanismus von SOCS3 beruht nach dem Modell von Babon *et al*. auf der Formation eines ternären Komplexes, in dem alle Einheiten direkte Bindungen mit den anderen beiden Einheiten eingehen (s. Abb. 3) (32).

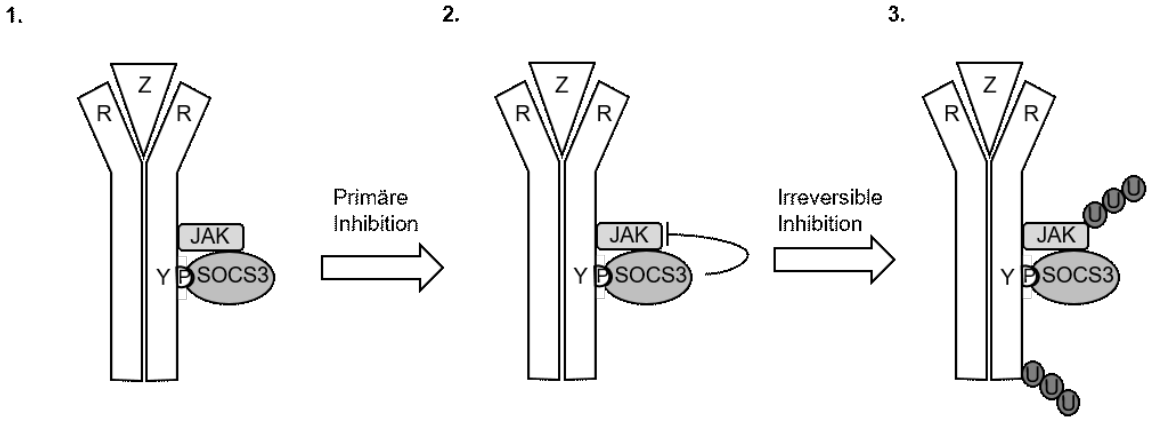


Abb. 3: Schematische Darstellung der Mechanismen, über die SOCS3 die zytokinvermittelte STAT3 Phosphorylierung inhibiert.
Durch Bindung des Zytokins an den Rezeptor kommt es zu einer Dimerisierung und zur Phsophrylierung von Tyrosinresten der intrazellulären Rezeptordomäne durch rezeptorassoziierte Januskinasen (in der Abb. beispielhaft JAK2) (22, 23).
1.) Über die zentrale SH2-Domäne bindet SOCS3 an das Phosphotyrosin und an weitere N-terminal sowie C-terminal gelegene Aminosäuren (SOCS3 Bindemotiv) (32, 79). Ein ternärer Komplexes aus SOCS3,

Januskinase und Rezeptor entsteht (32).
2.) Durch die N-terminal gelegene *kinase inhibitory region* (KIR) von SOCS3 kommet es zur nicht kompetitiven Hemmung der Januskinase (28, 82, 83). Durch Inhibition der Kinasefunktion können keine weiteren STAT Moleküle phosphoryliert werden und die Signalkaskade wird unterbrochen (32).
3.) Durch die Funktion als E3 Ubiquitin-Ligase markiert SOCS3 die Januskinase und den Rezeptor zum proteosomalen Abbau (73, 75). Abbildung modifiziert nach Babon *et al.* 2012 (32).
Z: Zytokin, R: Rezeptor, P: Phosphotyrosin, U: Ubiquitin

Demnach kann SOCS3 nach der Bindung an die spezifische Bindesequenz des Rezeptors via SH2-Domäne, über eine angrenzende Oberfläche JAK1, JAK2 und Tyk2 binden und deren katalytische Funktion inhibieren (32). SOCS3 kann JAK zwar in Abwesenheit eines Rezeptors binden, allerdings mit einer geringen Affinität (32). Dieses Modell erklärt, warum SOCS3 die Signaltransduktion von Zytokinen, deren Rezeptoren eine SOCS3 Bindesequenz aufweisen, stärker inhibiert, als die Signaltransduktion von Zytokinen, die über die gleichen JAKs und STATs vermittelt wird, deren Rezptoren aber keine Bindesequenz für SOCS3 aufweisen (32).

1.5 *Calcium and integrin binding protein 2* (CIB2)

In Vorarbeiten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Saftig (CAU, Biochemisches Institut) wurde das Protein CIB2 mittels Massenspektrometrie als möglicher Interaktionspartner des murinen und humanen IL-23R identifiziert. Die Schwachstelle dieses Verfahrens liegt im Nachweis vieler unspezifischer Bindungen, sodass eine vermutete Interaktion durch andere Methoden *in vitro* bestätigt werden muss (85).

Die vier Proteine der CIB-Familie (CIB1-4) haben ein Molekulargewicht von ungefähr 22 kDa und zeigen eine hohe Konservierung der Basensequenz zwischen Mensch und anderen Säugetieren (86). Sie zeichnen sich durch EF-Hand Aminosäuremotive aus, die eine Bindung von Calcium und Magnesium ermöglichen (86). CIB2 hat ein Molekulargwicht von 24,2 kDa und wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert (86, 87). Über die physiologische Rolle von CIB2 ist bisher wenig bekannt, jedoch sind zwei grundlegende Funktionen von CIB2 beschrieben: die Bindung von Calcium und Magnesium über EF-Hand Motive, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt und die Bindung an Integrin αIIb sowie an die zytoplasmatische Domäne von Integrin α7β1 erfolgt (86, 88, 89). Hieraus lässt sich die Funktion eines Kationensensors in Signalkaskaden vermuten. Darüberhinaus könnten Interaktionen zwischen Integrinen und Bestandteilen (Rezeptoren, Kinasen, Substrate etc.) verschiedener Signalkaskaden über CIB2 vermittelt werden.

In Versuchen, in denen CIB2 mit GFP gekoppelt war, wurde eine Dimerisierung von CIB2

beobachtet, deren Funktion allerdings noch unklar ist (90, 91). Aktuellere Daten aus Versuchen der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie und Massenspektrometrie zeigen allerdings, dass CIB2 *per se* als Monomer vorliegt und die ungewöhnlichen hydrodynamischen Eigenschaften des Proteins oder die Interaktion durch *Tag*-Proteine wie *green fluorescent protein* (GFP) oder *Flag* zur fälschlichen Annahme einer Dimerisierung führten (88). Allerdings wird vermutet, dass die Bindung von CIB2 an Integrin α7B3 die Bindung eines weiteren CIB2 Monomers induzieren kann, wodurch ein Dimer entsteht, der durch das Integrin als Brücke verbunden ist (88).

Besonders beschrieben ist die Rolle von CIB2 in der Entstehung von hereditärer, nicht syndromaler Taubheit (91–93). Eine Beteiligung an der Pathogenese des Usher-Syndrom Typ 1J, einer erblichen Erkankung, die sich in Taubheit und progredienter Erblindung manifestiert, wurde beschrieben (88, 91). Allerdings deuten neuere genetische Untersuchungen darauf hin, dass Mutationen von CIB2 nicht ursächlich für die Entstehung des Usher-Syndroms sind, sondern nicht syndromale Taubheit auslösen (93). Hieraus ergibt sich die Vermutung, dass CIB2 für die Entwicklung der Haarzellen im Innenohr eine tragende Rolle spielt (88). In Versuchen mit *knockout* Mäusen, die nicht funktionales CIB2 exprimierten, konnte eine gestörte Entwicklung der Stereozilien im Innenohr nachgewiesen werden (92). Darüberhinaus führte die Expression von nicht funktionalem CIB2 in den Haarzellen der Mäusen zu einem Erliegen der mechanoelektrischen Transduktion, wobei ein Ausbleiben der physiologischen Interaktion mit den Untereinheiten t*ransmembrane channel-like protein 1* (TMC1) und t*ransmembrane channel-like protein 2* (TMC2) des *mechanoelectrical transduction* (MET) Kanal ursächlich zu sein scheint (90, 92). Weiterhin ist beschrieben, dass CIB2 eine Rolle in der Muskeldystrophie Typ 1A, der HIV Infektion und Ovarialkrebs spielt (89, 94, 95). CIB2 wirkt hemmend auf die onkogene Signaltransduktion des Enzyms Sphingosinkinase 1 in der Entstehung von Ovarialkrebs (95).

1.6 Ziele der Arbeit

Interleukin 23 spielt eine Rolle in einer Reihe von chronischen Erkrankungen und stellt ein attraktives Ziel für die gerichtete Therapie mit monoklonalen Antikörpern dar. Hier stehen bereits einige Wirkstoffe zur Verfügung oder befinden sich in der Entwicklung. Die detaillierte Untersuchung der IL-23 vermittelten Signaltransduktion, samt Inhibition und Interaktionspartnern des Rezeptors, dient somit einem besseren Verständnis physiologischer

Abläufe, der Pathophysiologie diverser Erkrankungen sowie der Identifikation neuer Ziele für weitere Therapieansätze.

Eine Inhibition der IL-23 vermittelten STAT3 Phosphorylierung durch SOCS3 wurde in zwei unabhängigen Studien nicht gezeigt (26, 29). Ebenfalls wurde für den IL-23 Rezeptor bisher kein SOCS3 Bindemotiv identifiziert. Allerdings konnte gezeigt werden, dass SOCS3 einen inhibierenden Einfluss auf die IL-23 Signaltransduktion in der Differenzierung von naiven T-Helferzellen zu T_H17-Zellen ausübt (96). Diese Autoren zeigen auch einen Einfluss von SOCS3 auf die IL-23 abhängige Phosphorylierung von STAT3. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Einfluss von SOCS3 auf die IL-23 vermittelte Signaltransduktion untersucht werden. Hierzu sollen IL-23 Rezeptorvarianten mit SOCS3 Bindemotiv erzeugt werden und retroviral in Ba/F3-gp130 Zellen transduziert (s. 2.3.4) werden. Im Ba/F3 Zellmodell soll mittels Western Blot (s. 2.4.3) eine Analyse der STAT3 Phosphorylierung und SOCS3 Expression erfolgen.

Die angenommene Interaktion zwischen CIB2 und dem IL-23R soll im Rahmen dieser Arbeit durch Ko-Immunpräzipitationsanalysen (s. 2.4.4) mit dem IL-23R bestätigt werden. Im Falle einer bestätigten Interaktion soll die Bindestelle von CIB2 am IL-23R mithilfe von Rezeptordeletionsvarianten weiter eingegrenzt werden.
Weiterhin sollen neue Expressionsvektoren mit dem CIB2-GFP Fusionsprotein erzeugt werden, um einen Einfluss von CIB2 auf die IL-23 Signaltransduktion im Ba/F3-gp130 Zellmodell mittels Stimulations- und Proliferationsassays zu untersuchen. Für fluoreszenzmikroskopische Studien zur Interaktion von CIB2 und dem IL-23R soll ein Expressionsvektor für ein IL-23R-mCherry Fusionsprotein erzeugt werden. Durch Ko-Expression von CIB2-GFP und IL-23R-mCherry in einer Zelle, kann mittels Fluoreszenzmikroskop die Interaktion zwischen den beiden Proteinen analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antibiotika sind in Tabelle 1 gelistet.

Tabelle 1: Übersicht verwendeter Antibiotika

Antibiotika	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg/mL	Agarplatten: 200 µg/mL Flüssigmedium: 100 µg/mL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
G418 (Geneticin)	50 mg/ml	400 µg/ml	Genaxxon, Ulm, Deutschland
Hygromycin B	100 mg/mL	1 mg/mL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin	10000 U/mL	60 mg/L	Genaxxon, Ulm, Deutschland
Puromycin	1 mg/mL	1,5 µg/mL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin	10 mg/mL	100 mg/L	Genaxxon, Ulm, Deutschland

2.1.2 Antikörper

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 gelistet.

Tabelle 2: Übersicht verwendeter Antikörper

Antikörper	Stammkonzentration	Verdünnung	Hersteller
Ratte α-murin-IL-23R mAb (MAB 1686)	0,2 mg/mL	1:20	R&D Systems GmBH, Minneapolis, USA
Ziege α-murin-IL-12Rß1 PE konjugiert Ab (FAB 1998)	50 µg/mL	1:10	R&D Systems GmBH, Minneapolis, USA
Ziege α-human-IL-23R biotinyliert Ab (BAF 1400)	0,2 mg/mL	1:40	R&D Systems GmBH, Minneapolis, USA
Kaninchen α-phospho-STAT3 mAb (Tye705, D3A7, XP®), (MAB 9145)	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
Maus α-STAT3 (124H6) mAb (MAB 9139)	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
Kaninchen α-hCIS3/SOCS-3 Ab (C005)	k.A.	1:1000	IBL, Hamburg, Deutschland
Maus α-hIL-12Rβ1 PE konjugiert mAb (FAB 839P)	k.A.	1:300	R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA

Antikörper	Stammkonzentration	Verdünnung	Hersteller
Ziege α-Maus Ab POD konjugiert	2 mg/ml	1:2000	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Ziege α-Kaninchen IgG-POD konjugiert	0,4 mg/mL	1:2000	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Maus α-GFP mAb (Klone 7.1 und 13.1)	k.A.	1:1000	Roche, Basel, Schweiz
Maus α-alpha Tubulin (ab24610)	1,1 mg/ml	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Ziege α-Maus Alexa Fluor 633 konjugiert (A21052)	2 mg/ml	1:1000	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

Zur Detektion biotinylierter Antikörper in der Durchflusszytometrie (s. 2.3.5) wurde Streptavidin-APC (cat. 554067) von BD Biosience (Heidelberg, Deutschland) verwendet. Im Western Blot (s. 2.4.3) wurde zu diesem Zweck Streptavidin-POD (Part # 890803) von R&D Systems GmbH (Minneapolis, USA) genutzt.

2.1.3 Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3 gelistet.

Tabelle 3: Übersicht verwendeter Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
7- Aminooactinomycin D (7-AAD)	R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA (*bovine serum albumine*)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DAPI *staining solution*	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsufoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
dNTP Mix (25 mM)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Chalfront St Giles, GB
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Express DNA Ladder 100-5000 bp	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumacetat (CH_3COOK)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	VWR International BVBA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
LB-Medium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Loading-Dye Solution (6x)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NP-40	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Prolongold	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
ß-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris	Bethesda Research Laboratories, New Jersey, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypan Blue Dye 0,4%	Bio-Rad, München, Deutschland
Turbofect™ Transfektionsreagenz	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

2.1.4 Geräte

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 gelistet.

Tabelle 4: Übersicht verwendeter Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage Precisia 100M-300C	Precisia, Hartenstein, Deutschland
Autoklav Laboklav 25	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle, Deutschland
BD FACSCanto II	Becton Dickson GmbH, Heidelberg, Deutschland
CO_2-Inkubator HERAcell® 150	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
ECL ChemoCam Imager	INTAS, Göttingen, Deutschland
Einmal-Zählkammer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop BZ 9000	Keyenc, Osaka, Japan

Gerät	Hersteller
Fluorometer Infinite® M200 PRO	Tecan, Männedorf, Schweiz
Gefrierschrank Forma® 900	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Geldokumentationssystem	INTAS, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München, Deutschland
Heizbad Julabo sw21	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Rostock, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer mit Heizung	Heidolph Instr. GmbH, Schwabach, Deutschland
Messpipetten	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Mikropipetten Research®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle Optiquick	Moulinex (Krups), Offenbach, Deutschland
Minizentrifuge	Axon, Kaiserslautern, Deutschland
NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
PCR Thermozykler peqStar	Peqlab, Erlangen, Deutschland
pH-Meter	Sartorius, Ratingen, Deutschland
Pipetus®-Akku	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Rollenmischer SRT 9D	Bibby Scientific, Staffordshire, England
Spannungsquelle Power Pac™ Basic	Bio-Rad, München, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Sterilbankpumpe	HLC BioTech, Bovenden, Deutschland
TC20 Automated Cell Counter	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermomixer® comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™	Bio-Rad, München, Deutschland
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland
Vortexer	Neolab, Heidelberg, Deutschland

2.1.5 Kits

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 5 gelistet.

Tabelle 5: Übersicht verwendeter Kits

Kit	Hersteller
BCA Protein Assay	Thermo Scientific, Waltham, USA
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Gene JET Plasmid Miniprep KIT	Thermo Scientific, Waltham, USA
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

Kit	Hersteller
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

2.1.6 Kulturmedien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kulturmedien sind in Tabelle 6 gelistet.

Tabelle 6: Übersicht verwendeter Kulturmedien

Kulturmedium	Zusammensetzung
$DMEM^{-/-}$	*Dulbecco´s Modified Eagle Medium, high Glucose (4,5 g/L) with stable Glutamine*
$DMEM^{+/+}$	*Dulbecco´s Modified Eagle Medium, high Glucose (4,5 g/L) with stable Glutamine* + 10% FBS, 1%; Penicillin/Streptomycin
LB-Agar	0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, Trypton (10g/l), 1,5% Agar-Agar
LB-Medium	0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, Trypton (10g/l)

2.1.7 Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung stammen von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) und sind in Tabelle 7 gelistet.

Tabelle 7: Übersicht verwendeter Oligonukleotide

Name	Bezeichnung	Sequenz (5‘-3‘)
DF 38	pCR-Script fwd1	TGCTGCAAGGCGATTAAG
DF 39	pCR-Script rev1	ATGCTTCCGGCTCGTATG
DF 85	5' pMOWS	AGCCCTTTGTACACCCTAAGC
DF 120	T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG
DF 155	NDEL2b	GTACTCTACCACCTATCCTAACAAT
DF 263	CIB2-3'	CGAGCGGCCGCCCGATCCGGATGTGGA
DF 333	hIL23R-EcoRV-RP	ATCTGGCGGATATCCAGAAGA
DF 468	3'mCherry	GACGCGGCCGCCTACTTGTACAGCTCGTCCATG
DF 473	mCherry FP-NotI	GACGCGGCCGCAATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAG
EE6	hIL23RSOCSSOE fw	TATTCTACCGTGGTACACACTGGATATAAACCCCAAAT
EE7	hIL23RSOCSSOE re	GTGTGTACCACGGTAGAATACTGAACTGTAGTATTGTCG
EE8	hIL23RSnaBI fw	GCCAAACATTAAGTACGTATTTCAAGTCAG

2.1.8 Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 8 gelistet.

Tabelle 8: Übersicht verwendeter Plasmide

Plasmid	Herkunft	Resistenz
pcDNA3.1-hCIB2-GFP	AG Scheller	Ampicillin
pMOWS-puro-GFP	Ketteler (97)	Puromycin
pMOWS-hygro-GFP	Suthaus (98)	Hygromycin B
pCR-Script	AG Scheller	Ampicillin
p409-hIL-23R-P310	Franke (99)	Ampicillin
p409-mIL-23R	Floss (26)	Ampicillin
pcDNA3.1-mCherry	Engelowski (29)	Ampicillin
pcDNA3.1-GFP	AG Scheller	Ampicillin
p409- mIL-23RΔ415	Floss (26)	Ampicillin
p409-mIL-23RY416FΔ446	Floss (26)	Ampicillin
p409-mIL-23RΔ503	Floss (26)	Ampicillin
p409-mIL-23RY416FΔ503	Floss (26)	Ampicillin

2.1.9 Puffer und Lösungen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 9 gelistet.

Tabelle 9: Übersicht verwendeter Puffer und Lösungen

Lösung/Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
10x Standard Restriktionspuffer	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
10x T4 DNA Ligasepuffer	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	10% APS
Blockierlösung	5% Magermilchpulver in TBS-T
BSA-Lösung	5% BSA in TBS-T
Ethanol	Sigma-Aldrich, München
FACS-Puffer	1% BSA in PBS
Gibco® fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
IP *lysis buffer*	20 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA 150 mM NaCl 1 mM Na_3VO_4 10 mM NaF 1 mM PMSF 0,5% NP-40 *cOmplete™ protease inhibitor* (1 Tablette für 50 ml Puffer)
Lämmli-Puffer (5x)	1 M Tris-HCl pH 8,8 50% Glycerol 20% SDS

Lösung/Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
	10% β-Mercaptoethanol Bromphenolblau
lysis buffer (phospho-STAT3)	150 mM NaCl 2 mM EDTA 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 1% Triton W-100 1% NP-40 1 mM Na_3VO_4 1 mM NaF *cOmplete™ protease inhibitor* (1 Tablette für 50 ml Puffer)
Orange G Ladepuffer	30% Glyerin 50 mM EDTA 0,25% Orange G
PBS *(phosphate buffered saline*)	1,5 mM KH_2PO_4 2,7 mM KCl 8,1 mM Na_2HPO_4 137 mM NaCl pH 7,4
PBS+/+	1,47 mM KH_2PO_4 2,67 mM KCl 8,1 mM Na_2HPO_4 138 mM NaCl pH 7,4 0,5 mM $MgCL_2$-$6H_20$ 0,9 mM $CaCl_2$
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4% SDS
SDS-PAGE Laufpuffer	0,4 M Tris-HCl, pH 8,25 0,1 M Glycin 0,1% SDS
solution 1 (S1) für DNA-Minipräparation	1 M Tris-HCl, pH 7,4 0,5 M EDTA 4 M NaOH 10% SDS 1:1000 RNAse
solution 2 (S2) für DNA-Minipräparation	4 M NaOH 10% SDS
solution 3 (S3) für DNA-Minipräparation	3 M Kaliumacetat
stripping buffer	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 2% SDS 0,1% ß-Mercaptoethanol
TAE-Puffer	0,4 M Tris-HCl, pH 8,8 0,01 M EDTA 0,2 M Essigsäure
TBS (*tris buffered saline*)	200 mM Tris pH 7,5 5 M NaCl
TBS-T	200 mM Tris pH 7,5 5 M NaCl 0,5% Tween 20
Transferpuffer	250 mM Tris-HCl, pH 8,0 2 M Glycerin 0,01% SDS 5% Methanol
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4% SDS
Trypsin/EDTA-Lösung	1:10 Trypsin/EDTA (10x) in PBS

2.1.10 Verbrauchsmaterial

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 10 gelistet.

Tabelle 10: Übersicht verwendeter Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland
Falcon Reaktionsgefäße (15 mL und 50 mL)	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
Kryoröhrchen	VWR, Randor, USA
Microtubes (1,5 mL und 2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nitrilhandschuhe	Ansell, München, Deutschland
Objektträger	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland
PCR Kappen Gr. 125	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
PCR Tubes 0,2 mL	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
PVDF-Transfermembran	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Whatman-Papier	VWR, Randor, USA
Zellkulturschale 10 cm (adhärent)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale 15 cm (adhärent)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale 10 cm	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
Zellkulturschale *6-well*	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale *12-well*	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale *96-well*	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.11 Zellreihen und Bakterienstämme

Zur Klonierung und Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli XL1-Blue* (endA1 gyrA96(naIR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F‘ [: TN10 proAB+ laclqΔ(lacZ)M15] hsdR17(rk-mK+)) verwendet (Agilent Technologies, Waldbronn).

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten adhärenten Zelllinien sind in Tabelle 11 gelistet. Die verwendeten Suspensionszelllinien sind in Tabelle 12 gelistet.

Tabelle 11: Übersicht verwendeter adhärenter Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Zellart	Hersteller
CHO-K1 (ACC-110)	Ovarialzellen des chinesischen Zwerghamsters	Adhärente Zellen	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
COS-7 (ACC-60)	Nierenzellen der grünen Meerkatze	Adhärente Zellen	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
HEK293 (ACC-305)	Humane embryonale Nierenzellen	Adhärente Zellen	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
HeLa (ACC-57)	Humane Epithelzellen eines Cervixkarzinoms	Adhärente Zellen	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
NIH3T3 (ACC-59)	Murine embryonale Fibroblasten	Adhärente Zellen	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
Phoenix-Eco (ATCC© CRL-3214)	Humane embryonale Nierenzellen	Adhärente Zellen	DKFZ, Ursula Klingmüller, Heidelberg, Deutschland
U4C	Humane Fibrosarkomzellen (Jak1 defizient)	Adhärente Zellen	Universität Würzburg, Heike Hermanns, Deutschland

Tabelle 12: Übersicht verwendeter Suspensionszellen

Ba/F3-gp130 Zelllinie	Zytokin	Resistenz	Herkunft
Ba/F3gp-130 (Oberflächenexpression des humanen gp130)	Murine prä B-Zelllinie	G418	Immunex, Seattle, USA
hIL-12Rß1/hIL-23R-P310	HIL-6	Puromycin, Hygromycin B	Franke et al. (99)
hIL-12Rß1/hIL-23RW395V	HIL-6	Puromycin, Hygromycin B	AG Scheller
hIL-12Rß1/hIL-23RI400V/P401V	HIL-6	Puromycin, Hygromycin B	AG Scheller
hIL-12Rß1/hIL-23RW395V/I400V/P401V	HIL-6	Puromycin, Hygromycin B	AG Scheller
hIL-12Rß1	HIL-6	Hygromycin B	Hummel et al. (18)
hIL-23R-P310	HIL-6	Puromycin	Hummel et al. (18)
mIL-12Rß1/mIL-23R	HIL-6	Puromycin, Hygromycin B	Floss et al. (26)
mIL-12Rß1	HIL-6	Hygromycin B	Floss et al. (26)
mIL-23R	HIL-6	Puromycin	Floss et al. (26)

2.1.12 Zytokine

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zytokine sind in Tabelle 13 gelistet.

Tabelle 13: Übersicht verwendeter Zytokine

Zytokin	Stammkonzentration	Herkunft
Konditionierter Zellkulturüberstand von CHO-K1 Zellen mit Hyper-mIL-23 Expression	5 µg/mL	Floss et al. (26)
Konditionierter Zellkulturüberstand von CHO-K1 Zellen mit Hyper-IL-6 Expression	5 µg/mL	AG Scheller

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Eschericha coli Bakterien

Chemisch kompetente *E. coli XL-1 Blue* Zellen wurden für 10 min auf Eis aufgetaut. Danach wurde 1 µg Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsprodukt zugegeben und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 1 min und eine weitere Inkubation von 5 min auf Eis. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 500 µl warmen LB-Medium und ein letzter Inkubationsschritt für 1 h bei 37°C und 1100 rpm im Heizblock. Abschließend wurden 100-200 µl der Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*)

Die PCR wurde in dieser Arbeit zur Amplifikation ausgewählter DNA-Fragmente, zur Selektion von Bakterienklonen nach einer Ligation (*colony* PCR) und zur Einbringung gezielter Deletionen/Mutationen (*splicing by overlapping extension-PCR,* SOE-PCR) eingesetzt.

Der Reaktionsansatz setzt sich aus der ursprünglichen DNA (*template*), jeweils einem vorwärts- und rückwärtsgerichteten Primer, einer hitzestabilen Polymerase und freien Didesoxynukleotiden zusammen.

PCR zur Amplifikation von DNA für Klonierungen

Hier wurde die *Pfu* Polymerase mit Korrekturlesefunktion (*proof reading*) verwendet. Mittels ihrer 3'→5'-Exonuklease-Aktivität kann diese Polymerase falsch eingebaute

Nukleotide erkennen und entfernen. Ein 50 µl Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

0,5 pg Plasmid-DNA (*template* DNA)
5 µl 10x PCR-Puffer (mit 20 mM $MgSO_4$)
10 µM *forward primer*
10 µM *reverse primer*
1 µl dNTPs (je 10 mM)
0,5 µl Pfu Polymerase (2,5 U/µl)
H_2O_{dd} *ad* 50 µl

Die Reaktion lief im *Thermocycler* mit folgendem Standardprogramm ab:

Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	1 min	
annealing	60°C	1 min	30 Zyklen
Elongation	72°C	2 min/kb	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Kühlung	4°C	∞	

colony PCR

Eine Bakterienkolonie wurde von der Agarplatte mit Selektionsantibiotikum in ein PCR-Reaktionsgefäß mit 20 µl H_2O_{dd} überführt. Anschließend folgte eine Inkubation von 5 min bei 95°C im *Thermocycler*. Nach abgeschlossener Inkubation wurde folgender PCR-Ansatz zugegeben:

5 µl 10x DreamTaq Puffer (mit 20 mM $MgCl_2$)
4 µl $MgCl_2$ (25 mM)
10 µM 2,5 µl *forward Primer*
10 µM 2,5 µl *reverse Primer*
1 µl dNTPs (je 10 mM)
1 µl DreamTaq Polymerase (1 U/µl)
H_2O_{dd} *ad* 30 µl

Die Reaktion im *Thermocycler* lief mit bereits erwähntem PCR-Standardprogramm (s.o.), allerdings erfolgte die Elongation für 1 min/kb.

SOE-PCR (*splicing by overlap extension*)

Der Ablauf ist schematisch in Abb. 4 dargestellt. Zunächst erfolgt die Amplifikation beider DNA-Fragmente unter Verwendung flankierender *Primer*. Die innen liegenden *Primer* enthalten die gewünschte Mutationssequenz und eine zum späteren Fusionspartner komplementäre Nukleotidsequenz. Im nächsten Schritt (Fusions-PCR) werden die jeweils äußeren *Primer* genutzt und das aneinandergelagerte Fusionsprodukt kann amplifiziert werden. Für diese Reaktion wurde die *Pfu* Polymerase mit dem bereits erwähnten Reaktionsansatz und Standardprogramm verwendet.

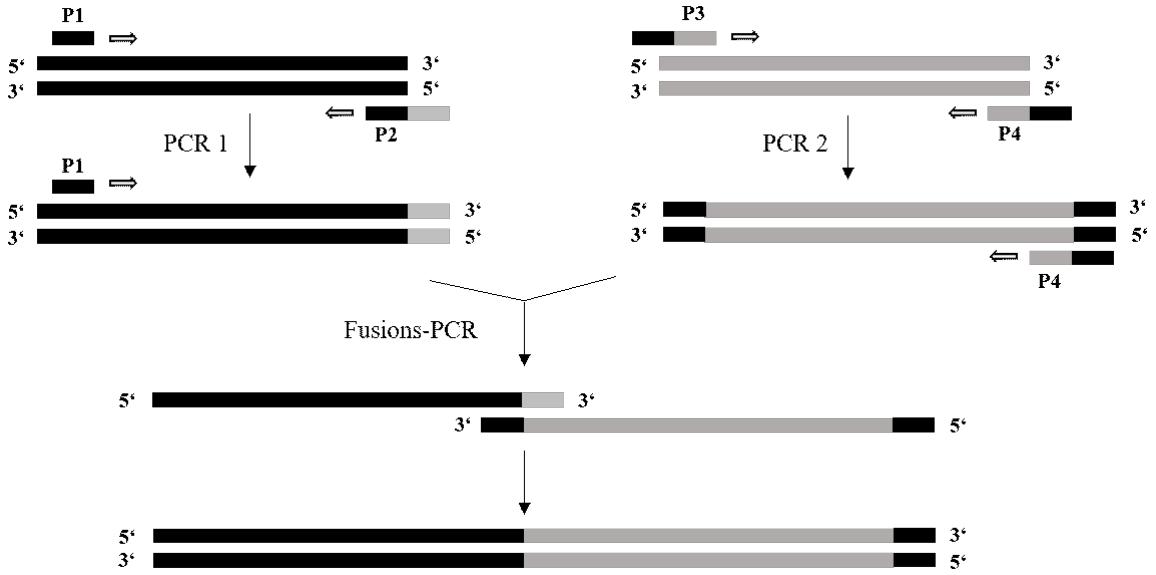


Abb. 4: Ablauf der SOE-PCR
Im ersten Schritt werden zwei unabhängige PCR-Reaktionen durchgeführt. Die innen liegenden *primer* (P2 und P3) enthalten die Mutationssequenz und eine zum späteren Fusionspartner komplementäre Sequenz. In der Fusions-PCR lagern sich die Fusionspartner durch die komplementäre Nukleotidsequenz aneinander an. Unter Verwendung der äußeren *primer* (P1 und P4) wird das hybridisierte Fusionsprodukt mit eingefügter Mutation amplifiziert.
P1-4: *primer 1-4*, PCR: Polymerasekettenreaktion

2.2.3 DNA-Gelektrophorese

Zur Analyse von DNA Fragmenten wurde standardmäßig ein 1%iges Agarosegel mit 0,0002% HD Green hergestellt. HD Green interkaliert in die DNA und ermöglicht eine spätere Detektion unter UV-Licht. Die DNA wurde mit Ladepuffer Orange versetzt und definierte Mengen in die Taschen des Gels geladen. Nach Beladen des Gels mit den zu analysierenden Proben auf Seite der Kathode wurde eine Spannung im elektrischen Feld

angelegt und die negativ geladene DNA wandert durch das Gel zur Anode. Dabei bewegen sich größere DNA-Fragmente langsamer, sodass es zu einer größenabhängigen Trennung der Fragmente kommt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde *Gene Ruler™ Express Ladder* oder *Gene Ruler™ 1kb Ladder* verwendet. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung des Geldokumentationssystems der Firma INTAS (Göttingen, Deutschland).

2.2.4 Gelextraktion

Zur Gewinnung der getrennten DNA-Fragmente nach Agarosegelelektrophorese, wurden die Fragmente unter UV-Licht visualisiert, mithilfe eines Skalpells aus dem Gel entfernt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde die DNA mittels *NucleoSpin ® Gel and PCR Clean-up Kit* nach Herstellerangaben gereinigt und isoliert. Abschließend wurde die DNA-Konzentration im *NanoDrop* bestimmt (s. 2.2.11).

2.2.5 Restriktionsspaltung von DNA

Bakterielle Endonukleasen schneiden die DNA an enzymspezifischen palindromischen Sequenzen. Dadurch entstehen DNA-Fragmente mit (*sticky ends*) oder ohne (*blunt ends*) Überhang. Alle verwendeten Restriktionsenzyme und dazugehörige Puffer stammen von der Firma Thermo Scientific Fischer (Waltham, USA). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zwischen analytischer und präperativer Restriktionsspaltung unterschieden. Eine analytische Restriktionsspaltung erfolgte als Kontrolle nach der Gewinnung von Plasmid-DNA. Hierfür wurde folgender Ansatz verwendet:

500 ng Plasmid-DNA
0,5-2 µl Restriktionsenzym
2 µl 10x Puffer (passend zu Restriktionsenzym)
H_2O_{dd} *ad* 20 µl

Im Rahmen einer Klonierung erfolgte eine präperative Restriktionsspaltung:

10 µg Plasmid-DNA
2 µl Restriktionsenzym
4 µl 10x Puffer (passend zu Restriktionsenzym)
H_2O_{dd} *ad* 40 µl

Anschließend wurden die Fragmente mittels Agaraosegelelektrophorese analysiert (s. 2.2.3).

2.2.6 DNA-*blunting*

DNA Fragmente mit *sticky ends* nach Restriktionsspaltung (s. 2.2.5) können durch Auffüllen des 5‘-Endes, bzw. Abtrennen des 3‘-Endes durch das Klenow-Fragment zu Fragmenten mit *blunt ends* verändert werden. Dies ist nötig, wenn das *insert* für die folgende Ligation (s. 2.2.9) *blunt ends* hat.

Hierfür wurde folgender Anatz im *Thermocycler* für 10 min bei 37°C und 10 min bei 95°C inkubiert:

26 µl Eluat aus Gelextraktion (s. 2.2.4) nach Restriktionsspaltung
3 µl 10x Klenow Puffer
0,5 µl 2 mM dNTP-Mix
0,5 µl Klenow

Das verwendete Enzym und der dazugehörige Puffer sind von Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA).

2.2.7 DNA-Phosphorylierung

Zur erfolgreichen Ligation (s. 2.2.9) von zwei DNA Fragmenten, benötigt die T4 DNA-Ligase einen Phosphatrest am 5‘-Ende der *insert* DNA. PCR Produkte besitzen kein 5‘-Phosphatende und müssen demzufolge phosphoryliert werden. Hierfür wurde folgender Ansatz hergestellt und für 30 min bei 37°C inkubiert.

95 µl PCR-Produkt (*insert*)
2 µl PNK (T4-Polynukleotidkinase)
11 µl T4 DNA-Ligase Puffer
2 µl H_2O_{dd}

2.2.8 Dephosphorylierung von DNA

Um eine erneute Verknüpfung der Plasmid-DNA nach Restriktionsspaltung zu vermeiden, wurde dem Restriktionsansatz 1 U *Fast-AP* (thermosensitive *alkaline phosphatase*, Thermo Scientific Fischer, Waltham, USA) zugegeben und dieser für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Unterbindung der Reaktion erfolgte durch Zugabe von DNA-Ladepuffer.

2.2.9 Ligation

Insert und Vektor-DNA können durch eine Phosphodiesterbindung am 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatende unter ATP-Hydrolyse verknüpft werden. Diese Reaktion wird durch die T4

DNA-Ligase katalysiert. Mithilfe folgender Formel wurde die benötigte Menge an *insert*-DNA bestimmt:

$$Menge\ Insert\ [ng] = \frac{5\ x\ Menge\ Vektor\ [ng]\ x\ Länge\ des\ Inserts\ [bp]}{Länge\ des\ Vektors\ [bp]}$$

Folgender Reaktionsansatz wurde bei 4°C über Nacht inkubiert:

50-100 ng Vektor
x ng Insert
2 µl T4 DNA-Ligase Puffer
2 µl PEG4000 (bei *blunt end* Ligationen)
2 µl T4 DNA-Ligase
H_2O_{dd} *ad* 20 µl

2.2.10 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA Minipräparation

Nach einer Transformation (s. 2.2.1) und erfolgreicher colony PCR (s. 2.2.2) wurde von putativ positiven Klonen mittels Mini-Präparation Plasmid-DNA isoliert. Hierzu wurde zunächst eine Bakterienkolonie in 2 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 1100 rpm im Heizblock kultiviert. Am nächsten Tag wurden 100 µl der Kultur abgenommen und bei 4°C gelagert zur späteren Inokulation einer Bakterienkultur für eine Midi-Präparation. Anschließend wurde die Bakterienkultur für 3 min und 1300 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die pelletierten Zellen wurden in 100 µl eiskaltem S1-Puffer resuspendiert. Danach wurden 200 µl S2-Puffer zur Lyse der Bakterien zugegeben. Die Lösung wurde durch mehrfaches Invertieren vermischt, bis die Flüssigkeit leicht viskös und klar wurde. Dieser Schritt sollte nicht länger als 5 min dauern. Anschließend wurden 150 µl eiskalter S3-Puffer zur Präzipitation von denaturierten Proteinen, chromosomaler DNA und sonstigen Zelltrümmern zugefügt. Erneut wurde der Reaktionsansatz durch mehrfaches Invertieren vermischt und für 10 min auf Eis gekühlt. Zur Pelletierung der unerwünschten Substanzen erfolgte eine zehnminütige Zentrifugation mit 13000 rpm bei 4°C an. Zur Fällung der DNA wurde der Überstand in ein frisches Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 900 µl 100% Ethanol versehen. Eine erneute Inkubation auf Eis für 5 min folgte und eine weitere Zentrifugation mit 13000 rpm für 15 min bei 4°C. Nun wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert, ohne das Pellet zu entfernen. Das DNA-Pellet wurde in 500 µl 70% Ethanol bei 13000 rpm für 5 min bei 4°C

gewaschen. Der Überstand wurde wieder vorsichtig entfernt und das Pellet für 20 min an der Luft getrocknet. Abschließend erfolgte eine Resuspension der DNA in 30 µl H_2O_{dd}.

Plasmid-DNA Midipräparation

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde eine Midipräparation durchgeführt. Hierfür wurde ein Bakterienklon nach Transformation von der Agarplatte in 100 ml LB-Medium mit passendem Selektionsantibiotikum überführt und bei 37°C und 120 rpm über Nacht kultiviert. Nach Zentrifugation mit 4000 rpm bei 4°C für 10 min wurde der Überstand entfernt und die Plasmid-DNA konnte mithilfe des *NucleoBond Xtra Midi Kit* aus dem Bakterienpellet extrahiert werden. Abschließend erfolgte die Resuspension der extrahierten Plasmid-DNA in 100 µl H_2O_{dd} und die Konzentrationsbestimmung mittels *Nanodrop* (s. 2.2.11). Zur Kontrolle erfolgte eine analytische Restriktionsspaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen (s. 2.2.5) und eine anschließende Analyse mittels Gelelektrophorese (s. 2.2.3).

2.2.11 Spektroskopische Messung des DNA-Gehalts

Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte mittels NanoDrop 2000. Hierfür wird die Absorption der DNA bei 260 nm gemessen. Als Ergebnis wurde weiterhin das Absorptionsverhältnis A260/A280 sowie A260/A230 angegeben. Das Absorptionsmaximum von Proteinen und Phenol liegt bei 280 nm und das Absorptionsmaximum von Kohlenhydraten bei 230 nm. Die Verhältnisse A260/A280 und A260/A230 geben somit die Reinheit der DNA-Probe an.

2.2.12 Sequenzierung

Zur Kontrolle der Plasmide nach abgeschlossener Klonierung erfolgte eine Sequenzierungsreaktion. Hierfür wurden die Plasmide mitsamt erforderlicher *primer* an Seqlab-Sequence Laboratories geschickt. Die Auswertung der Nukleotidsequenz erfolgte mit den Programmen Clustal Omega und Chromas Lite.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von Suspensionszellen

Alle Ba/F3-gp130 Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden in 10 cm Petrischalen mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 oder 0,2% konditionierter Zellkulturüberstand einer

Hyper-IL-6 sekretierenden CHO-K1 Zelllinie und 10 mL $DMEM^{+/+}$ bei 37°C und 5% CO_2 in einer gesättigten Wasserdampfatmosphäre kultiviert. Alle 7 Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 000 passagiert. Die Selektion erfolgte alle 2 Wochen, entsprechend der im Rahmen der retroviralen Transduktion verwendeten Vektoren, mit Hygromycin B in einer Konzentration von 1 mg/ml und/oder Puromycin in einer Konzentration von 1,5 µg/ml.

2.3.2 Kultivierung adhärenter Zellen

Die adhärenten Zelllinien wurden zweimal pro Woche in variierendem Verhältnis (1:10 - 1:50, je nach Zelllinie und Zelldichte) passagiert. Zur Beurteilung der Zelldichte wurden die Petrischalen zuvor unter dem Mikroskop analysiert. Zunächst wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Schalen mit PBS gewaschen. Danach wurde 2 ml Trypsin-EDTA in PBS auf die Petrischalen gegeben und für 5 min bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurden 15 ml Falcon-Röhrchen mit 8 ml $DMEM^{+/+}$ und neue 10 cm Petrischalen mit 10 ml $DMEM^{+/+}$ vorbereitet. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren von den Petrischalen gelöst und in die Falcon-Röhrchen überführt. Abschließend wurden zwischen 200 und 1000 µl aus den Falcon-Röhrchen in eine der vorbereiteten Petrischalen überführt. U4C Zellen wurde 400 µg/ml zur Selektion ins Medium gegeben.
Für HEK- und Phoenixzellen unterschied sich das Verfahren insofern, dass die Zellen nicht mit PBS gewaschen und nicht mit Trypsin-EDTA versehen wurden. Hier wurden die Zellen lediglich mit 2 ml PBS von der Petrischale gelöst.

2.3.3 Transfektion adhärenter Zellen

Zur Vorbereitung einer Transfektion wurden die adhärenten Zellen mit folgenden Zellzahlen auf 10 cm Petrischalen ausgebracht:

U4C Zellen: 2 x 10^6 Zellen in 10 ml Medium
HeLa Zellen: 2 x 10^6 Zellen in 10 ml Medium
COS-7 Zellen: 1 x 10^6 Zellen in 10 ml Medium
Phoenix-Zellen: 8 x 10^5 Zellen pro 2 ml Medium pro Vertiefung einer 6-*well*-Platte.

Hierzu wurden, wie unter Punkt 2.3.2 beschrieben, die Zellen von den Schalen abgelöst. Anschließend wurde die Zellzahl mittels Zellzählgerät bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 10 µl der Probe mit 10 µl Trypanblau vermischt und davon 10 µl auf eine Zählplatte pipettiert.

Am Folgetag erfolgte die Transfektion. Dazu wurde zunächst 1 ml $DMEM^{-/-}$ mit 5 µg Plasmid-DNA und 10 µl TurboFect gemischt und für 20 min inkubiert. Zur Transfektion von

Phoenix-Zellen wurden 200 µl DMEM$^{-/-}$, 1 µg Plasmid-DNA und 2 µl TurboFect verwendet. Nach 20 min wurde die Lösung tropfenweise zu den Zellen auf die Petrischalen gegeben. Die Platten wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 in einer gesättigten Wasserdampfatmosphäre gelagert und nach 4-6 h erfolgte ein Wechsel des Mediums. Hierbei wurde das alte Medium abgesaugt und 10 ml DMEM$^{+/+}$ zugegeben. Bei den Phoenix-Zellen erfolgte der Mediumwechsel mit 2 ml DMEM$^{+/+}$ mit 30% FCS. Die Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte wie in Punkt 2.3.1 beschrieben.

2.3.4 Retrovirale Transduktion

Zu Beginn wurden Ba/F3-gp130 Zellen samt Medium von einer konfluenten 10 cm Petrischale in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei Raumtemperatur mit 1000 rpm und zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt, das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und weitere 9 ml PBS wurden zugegeben. Anschließend folgte eine weitere Zentrifugation. Danach wurde das PBS abgesaugt und das Pellet in einer adäquaten Menge DMEM$^{+/+}$ resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zellzählgerät gezählt und mit DMEM$^{+/+}$ auf 2 x 10^6 Zellen/ml verdünnt.

Zur retroviralen Transduktion wurden die Überstände transfizierter Phoenix Zellen verwendet (s. 2.3.3). Dazu wurde 1 ml aus den Vertiefungen der 6-*well* Platten in ein Mikroreaktiongefäß überführt und für 5 min bei 1500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden 250 µl des Überstands in ein frisches Röhrchen überführt und 50 µl der Ba/F3-gp130 Zellen (dies entspricht 1 x 10^5 Zellen) zugegeben. Zusätzlich wurden 3 µl Polybren (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) mit einer Konzentration von 800 µg/ml zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 1800 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen in 1 ml DMEM$^{+/+}$ resuspendiert. In eine 6-*well* Platte wurden 4 ml DMEM$^{+/+}$ und 10 ng/ml Hyper-IL-6 vorgelegt und die Zellen zugefügt. Die Kultivierung erfolgte wie in Punkt 2.3.1 beschrieben. Zur Selektion wurde nach 24 h 1 mg/mL Hygromycin B und/oder nach 48 h 1,5 µg/mL Puromycin zugegeben.

2.3.5 Durchflusszytometrie

Zur Bestätigung der Oberflächenexpression der Zytokinrezeptoren auf den retroviral transduzierten (s. 2.3.4) Ba/F3-gp130 Zellen wurde die Durchflusszytometrie angewendet. Dabei wurden von den Zellen ausgehende optische Signale mittels eines Lasers registriert. Ermöglicht wurde dies durch Antikörper, die gegen die Zytokinrezeptoren auf der Oberfläche gerichtet sind. Diese Antikörper waren mit einem Fluorophor gekoppelt.

Zunächst wurden die Ba/F3-gp130 Zellen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und gezählt. 5 x 10^5 Zellen wurden in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert und bei 4°C mit 2500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in FACS-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in dem primären Antikörper (verdünnt in 100 µl FACS-Puffer) resuspendiert und der Reaktionsansatz für 2 h lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 ml FACS-Puffer zugegeben und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, der sekundäre Antikörper (ebenfalls verdünnt in 100 µl FACS-Puffer) zugegeben und für 1 h lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde erneut gewaschen, das Pellet in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Durchflusszytometrie erfolgte am FACS Canto II. Die Daten wurden mit der *FCS Express 4 Flow Software* ausgewertet.

2.3.6 Proliferationsassay Ba/F3-gp130 Zellen

Zur Vorbereitung wurden die Ba/F3-gp130 Zellen in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und dreimal mit PBS gewaschen. Ein Waschschritt umfasste eine Zentrifugation bei Raumtemperatur und 1500 rpm für 5 min, das Absaugen des Überstands und die Resuspension in 10 ml PBS. Nach dem letzten Waschschritt erfolgte die Resuspension in $DMEM^{+/+}$ und es wurde auf eine Konzentration von 5 x 10^4 Zellen/ml eingestellt. Pro Variante wurden 400 µl Zellsuspension in ein Mikroreaktionsgefäß vorgelegt und mit entsprechendem Zytokin versehen. Anschließend wurden die Vertiefungen einer 96-*well* Platte mit je 100 µl der Suspension versehen und für 72 h inkubiert (Inkubation wie in 2.3.1 beschrieben). Die Messung erfolgte am *Tecan Infinite M200 PRO Reader*. Hierfür wurde 20 µl *CellTiter-Blue*® in jede Vertiefung der 96-*well*-Platte gegeben. Unmittelbar nach Zugabe des Reagenz erfolgte die erste Messung (= Zeitpunkt 0).

Die Analyse des Proliferationsverhaltens stabil transduzierter Ba/F3-gp130 Zellen beruht auf dem Umsatz von Resazurin zu Resorufin durch metabolisch aktive Zellen. Im *Tecan Infinite M200 PRO Reader* kann Resorufin bei 560 nm detektiert werden. Resazurin befindet sich in dem Reagenz *CellTiter-Blue*®. Für einen Zeitraum von maximal 2 h wurde alle 20 min eine weitere Messung durchgeführt. Von den gemessenen Werten wurde der Messwert von Zeitpunkt 0 subtrahiert (Normalisierung) und die Ergebnisse in *relative fluorescence units* (RFU) angegeben. Für repräsentative Ergebnisse wurden die Messwerte in Drei- oder Vierfachbestimmung ermittelt.

Eine Verdünnungsreihe von Hyper-mIL-23 von 2 µg/mL bis 0,015 ng/mL wurde verwendet,

um das Proliferationsverhalten von Ba/F3-gp130 Zellen in Abhängigkeit steigender Zytokinkonzentrationen zu untersuchen. Als Kontrolle diente die Proliferation ohne Zytokin und mit 0,2% Hyper-IL-6. Zur Normierung wurden die Messwerte in Relation zur Proliferation unter Hyper-IL-6 gesetzt, die als 100% angesehen wurde.

2.3.7 Stimulationsassay

Im Rahmen dieser Arbeit dienten Stimulationsassays der Untersuchung der IL-23 abhängigen Phosphorylierung von STAT3 über einen Zeitraum von 0 min bis 4 h oder in Abhängigkeit unterschiedlicher Zytokinkonzentrationen.

Stimulationsassay mit adhärenten Zellen

Zur Vorbereitung wurden 2 x 10^6 Zellen auf eine 10 cm Zellukulturschale ausgesät und am Folgetag mit den gewünschten Plasmiden transfiziert (s. 2.3.3). Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel ohne Zugabe von FCS durchgeführt (*starven*). Nach 24 h wurden die Zellen stimuliert und an den entsprechenden Zeitpunkten wie in Punkt 2.4.1 beschrieben lysiert. Die Schale für Zeitpunkt 0 blieb ohne Zytokinzusatz und wurde sofort lysiert. Die gewonnen Lysate wurden bei -20°C gelagert.

Stimulationsassay mit Ba/F3-gp130 Zellen

Zunächst wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen (s. 2.3.6) und in einer adäquaten Menge $DMEM^{-/-}$ resuspendiert. Jeweils 2 ml der Zellsuspension wurden pro Vertiefung einer 6-*well*-Platte ausgebracht. Nach 5 h im Inkubator (*starven*) erfolgte die Zugabe des Zytokins. Zur Kontrolle wurden Zellen ohne Zytokinzugabe verwendet. Die Stimulation erfolgte für 15 min im Inkubator. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml Mikroreaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 1500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Pellets in Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Die weitere Verwendung ist in 2.4.1 beschrieben.

2.3.8 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Interaktionen zwischen dem Interleukin-23 Rezeptor und CIB2 zu untersuchen, wurden beide Proteine mit unterschiedlichen fluoreszierenden Proteinen fusioniert (IL-23R mit rot fluoreszierendem mCherry, CIB2 mit GFP) und die entsprechenden Expressionsvektoren in HeLa Zellen transfiziert. Zur Darstellung des Zellkerns wurde DAPI verwendet. Zur Darstellung des Zellskeletts wurde α-Tubulin mithilfe eines Primärantikörpers markiert und ein sekundärer Antikörper, an den der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 633 gekoppelt war, diente zur Visualisierung. Die unterschiedlichen Farbsignale

konnten getrennt aufgenommen werden und anschließend mit der *LSM Image Browser Software* übereinander gelegt werden (*merge*).

Die Vorbereitung verlief über 4 Tage. Am ersten Tag erfolgte die Transfektion (s. 2.3.3) der HeLa Zellen mit den gewünschten Plasmiden.

Am zweiten Tag wurden die Zellen auf *cover plates* überführt. Dazu wurde das Medium aus den 10 cm Schalen abgesaugt, 2 ml Trypsin-EDTA zugegeben und für 5 min inkubiert. Währenddessen wurden 15 ml Falcon-Röhrchen mit 8 ml $DMEM^{+/+}$ vorbereitet, in die die Zellen samt Trypsin-EDTA überführt wurden. Die Röhrchen wurden für 5 min bei 1200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 4 ml $DMEM^{+/+}$ resuspendiert. In jede Vertiefung einer 6-*well* Platte wurde ein *cover plate* gelegt und 250 µl - 1 ml (je nach Zelldichte) der Zellsuspension zugefügt. Mit $DMEM^{+/+}$ wurden alle Vertiefungen auf ein Gesamtvolumen von 2 ml aufgefüllt. Über Nacht wurden die Zellen im Inkubator gelagert.

An Tag drei wurde der primäre Antikörper (gerichtet gegen α-Tubulin) zugegeben. Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen und es wurde 1% PFA in PBS zugegeben, für 4 min bei Raumtemperatur inkubiert und abgesaugt. Im Anschluss wurden 0,2% Triton in $PBS^{+/+}$ zugefügt und die Platten lichtgeschützt für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Flüssigkeit wurde danach durch 1% BSA in PBS ersetzt und es folgte eine lichtgeschützte Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und 200 µl des Antikörpers in einer Konzentration von 1:1000 in 1% BSA in PBS in jede Vertiefung gegeben. Die Platte wurde lichtgeschützt bei 4°C über Nacht gelagert.

An Tag vier wurde der sekundäre Antikörper (fusioniert mit Alexa fluor 633, gerichtet gegen den primären Antikörper) und DAPI zugegeben. Die Zellen wurden zweimal mit 1 ml $PBS^{+/+}$ gewaschen, dabei jeweils 2 min im frischen $PBS^{+/+}$ inkubiert. 200 - 400 µl DAPI und Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:1000 in 1% BSA in PBS wurden in jede Vertiefung der 6-*well*-Platte gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 1 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Dann wurde zweimal mit PBS gewaschen, wobei das frische PBS jeweils 2 min einwirken sollte. Um die *cover plates* auf Objektträger zu bringen, wurde ein Tropfen Prolongold blasenfrei auf den Objektträger aufgetragen und die *cover plates* mit der zellbedeckten Seite auf den Objektträger gelegt. Nach lichtgeschützter Lagerung bei Raumtemperatur über Nacht konnten die Objektträger analysiert werden. Die Objektträger wurden lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Adhärente Zelllinien wurden 48 h nach der Transfektion (s. 2.3.3) lysiert. Die Zellkulturschalen wurden hierfür mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und anschließend in 1 ml kaltem PBS mittels Zellschaber von der Schale gelöst und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach Pelletierung durch Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm für 5 min wurde der Überstand verworfen und die Zellen in Lysepuffer (*mild-lysis-buffer* oder *pSTAT3 lysis buffer*) resuspendiert.

Ba/F3-gp130 Zellen wurden zunächst 5 min bei 1500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Pellets in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Lyse erfolgte nach Zugabe des Puffers analog zur Lyse der adhärenten Zellen.

Die Lyse verlief für 2 h bei 4°C unter konstanter Rotation. Danach wurden die Reaktionsgefäße bei 4°C und 14000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Überstand beinhaltete das Zelllysat und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde der Proteingehalt bestimmt (s. 2.4.2).

2.4.2 Quantifizierung von Proteinen mittels Bicinchoninsäure (BCA)

Diese Methode beruht auf der Reduktion von zweiwertigen zu einwertigen Kupferionen im alkalischen Medium in Anwesenheit von Proteinen. Im zweiten Schritt der Reaktion bildet BCA einen Komplex mit den einwertigen Kupferionen, was zu einer violetten Färbung führt. Diese kann bei 562 nm am *Tecan Infinite M200 PRO Reader* gemessen werden und ist proportional zur Proteinkonzentration der Probe. Anhand einer Eichgrade konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe des *BCA Protein Assay Kit* und es wurden die Herstellerangaben zur Durchführung befolgt.

2.4.3 Western Blot

SDS-Page

Zunächst wurden die Proteine aus Zelllysaten mithilfe einer *sodium dodecyl sulphate* (SDS) Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*PAGE*) anhand ihres Molekulargewichts voneinander getrennt. Je kleiner das Molekulargewicht eines Proteins, desto schneller wandert es durch das Polyacrylamidgel.

In dieser Arbeit wurden 10%ige, 1,5 mm dicke SDS-Polyacrylamidgele gegossen. Die Gele waren in 6 cm Trenngel (unten) und 1 cm Sammelgel (oben) unterteilt. In vorgefertigte Taschen im Sammelgel wurden 20 µl Probe mit einem Proteingehalt von 2,5 µg/µl pipettiert. Zur Vorbereitung der Proben erfolgte eine zehnminütige Inkubation bei 95°C in 5 x Lämmlipuffer. Durch das im Puffer enthaltene β-Mercaptoethanol wurden die Proteine denaturiert und durch Auflösung von Disulfidbrücken wurden Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgehoben. Das SDS lagerte sich an die denaturierten Proteine und gab ihnen eine zum Molekulargewicht proportionale negative Ladung. Die Auftrennung erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 95 V über einen Zeitraum von 2 h.

Transfer und Detektion

Nach Trennung im SDS-Gel wurden die Proteine zur Detektion auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Transfer basiert auf hydrophoben und polaren Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der Membran. Verwendet wurde das *Trans-Blot-Turbo semidry Transfer* System. Zunächst wurde die Membran 2 min in Methanol getränkt und im Anschluss 1 min in Transferpuffer gewaschen. Währenddessen wurde Whatmann-Papier in Transferpuffer getränkt und fünflagig in der Transferbox platziert. Die gewaschene PVDF-Membran wurde auf das Whatmann-Papier gelegt und das SDS-Gel mittig auf der Membran platziert. Auf das SDS-Gel wurden weitere fünf Lagen, in Transferpuffer getränktes, Whatmann-Papier gelegt. Die Transferbox wurde geschlossen und für 1 h eine Spannung von 25 V angelegt. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für mindestens 2 h in 10 ml 5% Magermilchpulverlösung bei Raumtemperatur und dauerhafter Rotation inkubiert, um freie Proteinbindestellen auf der Membran zu blockieren. Vor Zugabe des primären Antikörpers wurde die Membran dreimal mit TBS-T für jeweils 10 min unter ständigem Rollen gewaschen. Der primäre Antikörper wurde zugegeben und die Membran über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-T gewaschen. Danach wurde der sekundäre Antikörper zugegeben und die Membran für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Membran zweimal mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen. Durch Zugabe von *ECL Prime Western Blot Detection Reagent*, konnte die Detektion am INTAS *Chemo Cam Imager* erfolgen.

Stripping

Nach erfolgter Visualisierung konnten weitere Proteine detektiert werden. Bevor jedoch die neuen Antikörper zugegeben wurden, musste der vorher benutzte Antikörper entfernt werden. Zu diesem Zweck wurde die Membran für 30 min in einem 60°C Wasserbad in *stripping-buffer* inkubiert, dreimal für je 10 min mit TBS-T gewaschen und für 2 h in 5% Magermilchpulverlösung inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgen wie oben beschrieben.

2.4.4 Immunpräzipitation

In dieser Arbeit wurde die Immunpräzipitation genutzt, um eine Interaktion zwischen CIB2 und dem IL-23-Rezeptor zu bestätigen. Dazu wurde in Vorarbeiten ein CIB2-GFP Fusionsprotein erzeugt und Sepharose *beads* mit einem gegen GFP gerichteten *Nanobody* hergestellt (99).

Nanobodies (Einzeldomänenantikörper) bestehen aus dem variablen, antigenbindenen Fragment eines Schwere-Ketten-Antikörpers. Das angewendete Verfahren wird als GFP-*nanotrap* (s. Abb. 5) bezeichnet und kann zur Ausfällung von Proteinen mit ihren dauerhaften sowie transienten Bindungspartnern genutzt werden (100, 101).

Nach der Transfektion adhärenter Zellen (s. 2.3.3) mit den beschriebenen Expressionsvektoren wurde eine Zelllyse durchgeführt. Dabei wurde auf Eis gearbeitet. Das Medium aus den Zellkulturschalen wurde entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 250 µl IP-Lysepuffer auf die Platten gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt, in Mikroreaktionsgefäße überführt und für 30 min auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Proben für 20 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in neue Mikroreaktionsgefäße überführt. Aus diesen wurden 50 µl abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß mit 50 µl 5 x Lämmli-Puffer pipettiert und für 10 min bei 95°C inkubiert. Diese Probe wurde bei -20°C gelagert und diente später als *input* Kontrolle.

Bevor die Sepharose *beads* zu den übrigen Lysaten zugegeben wurden, mussten sie mehrmals gewaschen werden. Dazu wurden sie für 2 min bei 4°C mit 2700 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgten drei Waschschritte, mit je 1 ml IP-Lysepuffer und Zentrifugation für 2 min bei 2700 rpm und 4°C. Abschließend wurden die Sepharose *beads* in 1 ml IP-Lysepuffer resuspendiert und auf die Lysate verteilt. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C unter konstantem, leichten Invertieren inkubiert.

Die Proben wurden dreimal mit IP-Lysepuffer (bei diesem Schritt ohne NP-40) gewaschen (s.o.). Nach dem letzten Waschschritt wurde die Flüssigkeit komplett entfernt und 50 µl

2,5 x Lämmli-Puffer zugefügt. Abschließend erfolgte eine zehnminütige Inkubation bei 95°C und die Lagerung bei -20°C.

Nach Entfernung der Proteine, die nicht an den Komplex aus Sepharose *bead* und CIB2 gebunden waren (s. Abb. 5), wurde ein Western Blot (s. 2.4.3) zur Detektion von GFP und dem IL-23-Rezeptor durchgeführt.

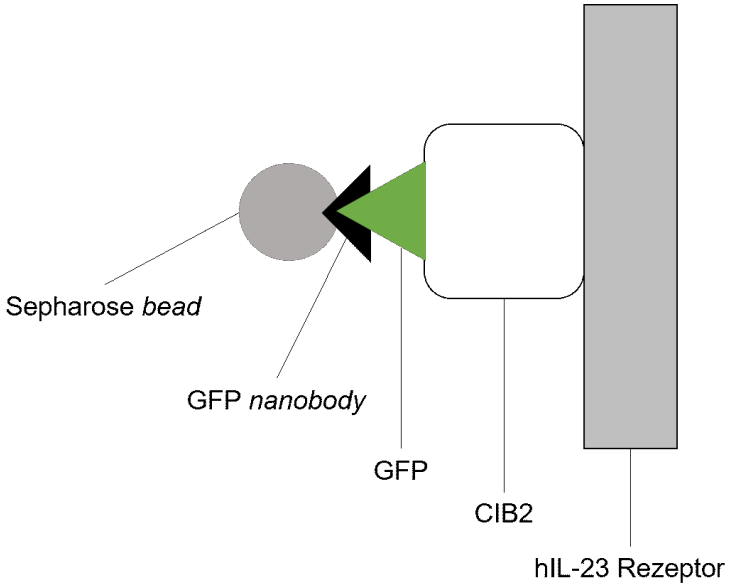


Abb. 5: Prinzip der Immunpräzipitation mit GFP *nanobody*
Die Abbildung zeigt schematisch die im Rahmen dieser Arbeit angewendete Immunpräzipitation. Die Sepharose *beads* sind mit GFP *nanobodies* versehen. Diese binden GFP, das an CIB2 gebunden vorliegt (CIB2-GFP Fusionsprotein). Durch Entfernen aller Proteine, die nicht an die Sepharose *beads* gebunden sind, werden alle Proteine entfernt, die keine Bindung mit CIB2 eingehen.

3 Ergebnisse

Der IL-23 Rezeptor besteht aus 629 Aminosäuren und ist unterteilt in ein Signalpeptid am N-Terminus (23 aa), eine extrazelluläre (330 aa), transmembrane (23 aa) und intrazelluläre Domäne (252 aa) (12). Die Aminosäuresequenz ist in Abb. 6 dargestellt. Das Signalpeptid ist grau, die Transmembrandomäne gelb und die Tyrosinreste schwarz markiert. Die sieben Tyrosinreste der intrazellulären Domäne (Y397, Y429, Y550, Y463, Y476, Y484 und Y611) sind schwarz hervorgehoben. Im humanen IL-23 Rezeptor spielen Tyr-484 und Tyr-611 eine Rolle in der STAT3 Aktivierung, während Y397 in die Aktivierung von PI3K/Akt involviert ist und für eine STAT3 unabhängige Proliferation sorgt (26). Die Bindestellen für STAT Proteine um Y484 und Y611 ist blau hinterlegt (26). Die postulierte JAK2-Bindestelle ist grün hervorghehoben (102). Allerdings konnte diese im murinen Rezeptor nicht bestätigt werden (24).

```
hIL-23R  MNQVTIQWDAVIALYILFSWCHGGITNINCSGHIWVEPATIFKMGMNISIYCQAAIKNCQ   60
         PRKLHFYKNGIKERFQITRINKTTARLWYKNFLEPHASMYCTAECPKHFQETLICGKDIS  120
         SGYPPDIPDEVTCVIYEYSGNMTCTWNAGKLTYIDTKYVVHVKSLETEEEQQYLTSSYIN  180
         ISTDSLQGGKKYLVWVQAANALGMEESKQLQIHLDDIVIPSAAVISRAETINATVPKTII  240
         YWDSQTTIEKVSCEMRYKATTNQTWNVKEFDTNFTYVQQSEFYLEPNIKYVFQVRCQETG  300
         KRYWQPWSSLFFHKTPETVPQVTSKAFQHDTWNSGLTVASISTGHLTSDNRGDIGLLLGM  360
         IVFAVMLSILSLIGIFNRSFRTGIKRRILLLIPKWLYEDIPNMKNSNVVKMLQENSELMN  420
         NNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTGPLETRDYPQNSLFDNTTVVYIPDL  480
         NTYYKPGISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPPVDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSL  540
         SNTIFLGELSLILNQGECSSPDIQNSVEEETTMLLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSCLGI  600
         VNEELPSINTYFPNNILESHFNRISLLEK                                 629
```

Abb. 6: Aminosäuresequenz des humanen IL-23 Rezeptors
Die intrazellulären Tyrosinreste sind schwarz markiert, grau hinterlegt: Signalpeptid, gelb: Transmembrandomäne, grün: postulierte JAK2 Bindestelle (102) , blau: STAT Bindestellen (26). Der Rezeptor besteht aus 629 Aminosäuren, davon entfallen 252 auf die intrazelluläre Domäne. In der intrazellulären Domäne finden sich sieben Tyrosinreste (Y397, Y429, Y550, Y463, Y476, Y484 und Y611).

Zur Untersuchung eines Einflusses von SOCS3 auf die IL-23 vermittelte Signaltransduktion wurde ein humaner IL-23 Rezeptor mit dem SOCS3 Bindemotiv aus gp130 generiert und in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. In adhärenten Zellen und im Ba/F3-gp130 Zellmodell wurde dann der Einfluss von SOCS3 auf die IL-23 Signaltransudktion anhand von Stimulations- und Proliferationsassays (s. 2.3.7, 2.3.6) analysiert.

3.1 Klonierung eines humanen IL-23R mit SOCS3 Bindemotiv

In Vorarbeiten wurde das, in gp130 identifizierte SOCS3 Bindemotiv „VQYSTVVH“ (79), um den ersten Tyrosinrest (Y397) der intrazellulären Domäne des humanen IL-23 Rezeptors eingebracht, woraus die nicht funktionsfähige Rezeptorvariante hIL-23R-VQY$_{397}$STVVH resultierte. In dieser Arbeit wurde die Sequenz um das Tyrosin 476 (Y476) der intrazellulären Rezeptordomäne eingebracht, sodass die Variante hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH entstand. Abb. 7 zeigt das *Alignment* des Wildtyp hIL-23 Rezeptors und beider mutierten Rezeptorvarianten mit eingefügtem SOCS3 Bindemotiv. Die Transmembrandomäne ist gelb hinterlegt. Der Ort der eingeführten Mutation ist rot markiert.

```
hIL-23R                    LLLGMIVFAVMLSILSLIGIFNRSFRTGIKRRILLLIPKWLYEDIPNMKNSNVVKMLQENSELMN    420
hIL-23R-VQY476STVVH        LLLGMIVFAVMLSILSLIGIFNRSFRTGIKRRILLLIPKWLYEDIPNMKNSNVVKMLQENSELMN    420
hIL-23R-VQY397STVVH        LLLGMIVFAVMLSILSLIGIFNRSFRTGIKRRILLLIPKVQYSTVVHMKNSNVVKMLQENSELMN    420

hIL-23R                    NNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTGPLETRDYPQNSLFDNTTVVYIPDLNTGYK    485
hIL-23R-VQY476STVVH        NNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTGPLETRDYPQNSLFDNTTVQYSTVVHTGYK    485
hIL-23R-VQY397STVVH        NNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTGPLETRDYPQNSLFDNTTVVYIPDLNTGYK    485

hIL-23R                    PQISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPPVDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELS    550
hIL-23R-VQY476STVVH        PQISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPPVDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELS    550
hIL-23R-VQY397STVVH        PQISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPPVDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELS    550

hIL-23R                    LILNQGECSSPDIQNSVEEETTMLLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSCLGIVNEELPSINTYFPQN    615
hIL-23R-VQY476STVVH        LILNQGECSSPDIQNSVEEETTMLLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSCLGIVNEELPSINTYFPQN    615
hIL-23R-VQY397STVVH        LILNQGECSSPDIQNSVEEETTMLLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSCLGIVNEELPSINTYFPQN    615

hIL-23R                    ILESHFNRISLLEK                                                       629
hIL-23R-VQY476STVVH        ILESHFNRISLLEK                                                       629
hIL-23R-VQY397STVVH        ILESHFNRISLLEK                                                       629
```

Abb. 7: *Alignment* des humanen IL-23 Rezeptors und des Rezeptors mit SOCS3 Bindemotiv
Rote Markierung: SOCS3-Bindemotiv, gelbe Markierung: Transmembrandomäne, Zahlen am rechten Bildrand geben die Anzahl/Position der Aminosäuren an.
In dieser Arbeit wurde das in gp130 identifizierte SOCS3-Bindemotiv „VQYSTVVH“ um das Tyrosin 476 (Y476) der intrazellulären Domäne eingebracht. In Vorarbeiten wurde das Bindemotiv näher um Tyrosin 397 (Y397) eingebracht und lag näher an der Transmembrandomäne.
Das *alignment* wurde mit Clustal Omega erstellt.

Als Ausgangsplasmid der Klonierung diente p409-hIL-23R-P310. Mittels SOE-PCR (s. 2.2.2) wurde das SOCS3 Bindemotiv an gewünschter Stelle eingebracht. Im ersten Schritt der SOE-PCR wurden zwei DNA Fragmente unter Vewendung der *primer* EE7+EE8 (Fragment 1) und EE8+DF155 (Fragment 2) amplifiziert und anschließend als *template* für die Fusions-PCR mit den *primern* EE8 und DF155 verwendet. Die erschaffene Sequenz, die für den humanen IL-23 Rezeptor mit SOCS3 Bindemotiv kodiert, wurde amplifiziert, mittels Gelextraktion (s. 2.2.4) isoliert, phosphoryliert (s. 2.2.7) und in pCR-Script ligiert (s.2.2.9, s. Abb. 8A).

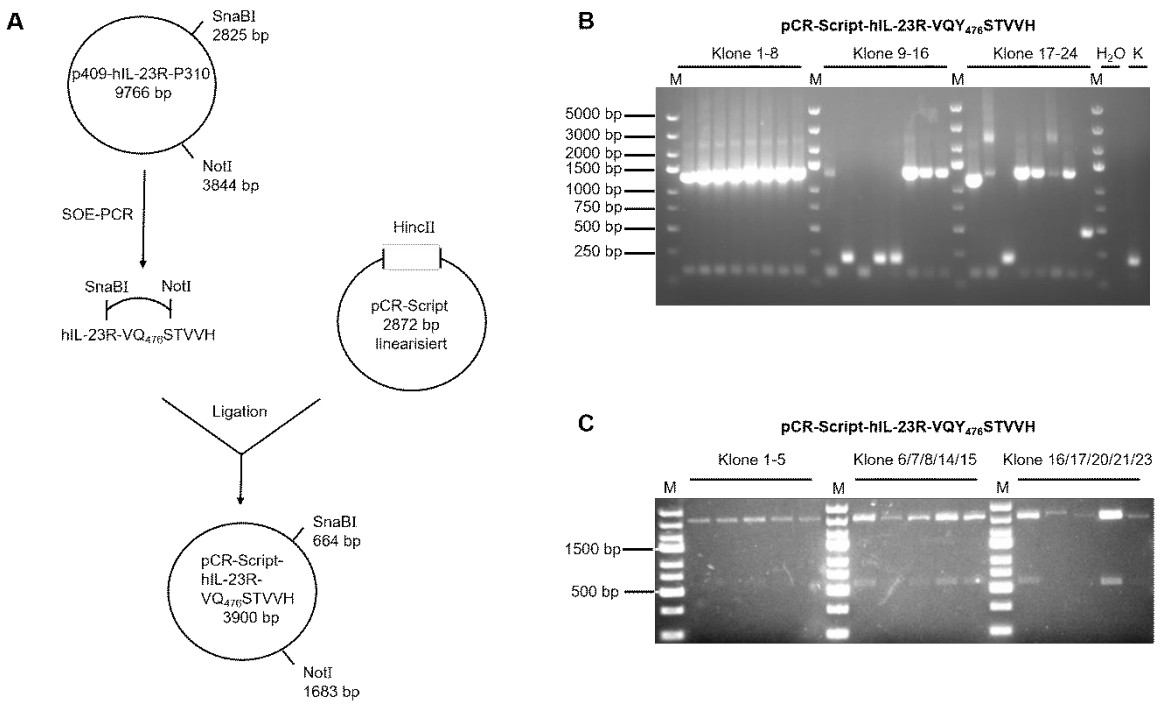


Abb. 8: Klonierung des Vektors pCR-Script-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH
A: Klonierungsschema
Als Ausgangsplasmid diente p409-hIL-23R-P310. Das Bindmotiv für SOCS3 (VQYSTVVH) wurde unter Verwendung der Primer EE6, EE7, EE8 und DF155 mittels SOE-PCR eingefügt. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde in den, mit HincII linearisierten, Vektor pCR-Script ligiert.
B: Agarosegelelektrophorese der *colony* PCR Produkte pCR-Script-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH
Nach Transformation der Ligationsprodukte in chemisch kompetente E. coli Zellen, wurden einzelne Bakterienklone mittels *colony* PCR analysiert. Die erwartete Fragmentgröße unter Verwendung der *primer* DF37 und DF38 betrug1238 bp. Als Kontrolle diente H_2O und DNA aus einem Bakterienklon, der nur mit dem Vektor transformiert wurde.
C: Agarosegelelektrophorese der Mini-Präparation Produkte pCR-Script-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH
Nach Isolation der Plasmid-DNA mittels Mini-Präparation, wurde die DNA putativ positiver Klone mit EcoRI geschnitten und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Die erwarteten Fragmente sollten eine Größe von 615 bp und 3285 bp aufweisen.
bp: Basenpaare, M: *marker* (*Express DNA Ladder 100-5000 bp*, Thermo Scientific) SOE-PCR: *splicing by overlapping extension polymerase chain reaction*

Nach der Ligation erfolgte die Transformation (s. 2.2.1) in chemisch kompetente *E.coli XL-1 Blue* Zellen. Zur Selektion der Bakterienklone, die das Plasmid aufgenommen haben, wurde eine *colony* PCR (s. 2.2.2) unter Verwendung der *primer* DF38 und DF39 durchgeführt. Das amplifizierte Fragment hatte eine Größe von 1238 bp. Mittels Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.3, Abb. 8B) konnten Bakterienklone, die das Plasmid exprimieren, identifiziert werden. In der Abbildung zeigen die Klone 1-8, 14-17, 20, 21 und 23 ein Signal bei 1238 bp. Die Plasmid-DNA dieser putativ positiven Klone wurde mittels DNA-Mini-Präparation (s. 2.2.10) isoliert. Die gewonnene DNA aus der Mini-Präparation wurde einer analytischen Restriktionsspaltung (s. 2.2.5) mit EcoRI unterzogen und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (s. Abb. *8*C). EcoRI schneidet pCR-Script-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH in zwei Fragmente (615 bp und 3285 bp). Die Klone

6, 14-16 und 21 zeigen das erwartete Restriktionsmuster. Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA folgte eine Midi-Präparation (s. 2.2.10) dieser Klone. Nach der Midi-Präparation erfolgte eine abschließende analytische Restriktionsspaltung mit EcoRI.

Im nächsten Schritt der Klonierung wurde die DNA Sequenz für den hIL-23 Wildtyprezeptor im Expressionsvektor p409-hIL-23R-P310 durch die erschaffene Sequenz des hIL-23R mit dem SOCS3 Bindemotiv aus pCR-Script-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH ersetzt (s. Abb. 9A).

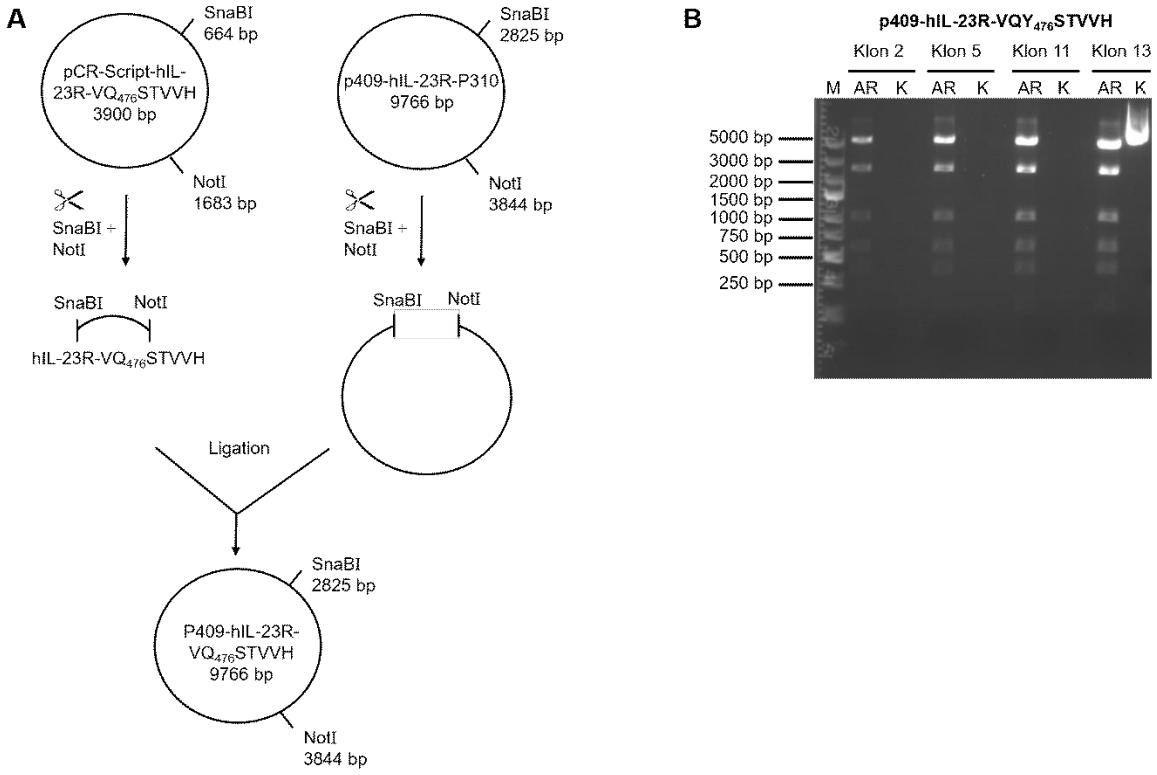


Abb. 9: Klonierung des Vektors p409-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH
A: Klonierungsschema
Zur Gewinnung des Vektors wurde das Ausgangsplasmid p409-hIL-23R-P310 mit SnaBI und NotI geschnitten. Das Insert wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen aus dem Plasmid pCR-Script-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH geschnitten und anschließend in p409 ligiert.
B: Agarosegelelektrophorese der Midi-Präparation Produkte p409-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH
Nach Isolation der Plasmid-DNA mittels Midi-Präparation, wurde eine Restriktionsanalyse mit EcoRI durchgeführt und mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Die erwarteten Fragmente sollten eine Größe von 155 bp, 402 bp, 615 bp, 1008 bp, 2436 bp und 5150 bp aufweisen. Als Kontrolle diente nicht geschnittene Plasmid-DNA.
Schere: Restriktionsspaltung bp: Basenpaare, M: *marker* (*Express DNA Ladder 100-5000 bp*, Thermo Scientific), AR: analytische Restriktionsspaltung, K: Kontrolle (ungeschnittenes Plasmid)

Dazu wurden beide Plasmide mit SnaBI und NotI präparativ geschnitten (s. 2.2.5). Die geschnittene DNA wurde in einer Agarosegelelektrophorese getrennt und die gewünschten Fragmente mittels Gelextraktion (s. 2.2.4) isoliert. Das 8747 bp große Fragment aus der Restriktionsspaltung von p409-hIL-23R-P310 diente als Vektor und das 1019 bp große Fragment aus der Restriktionsspaltung von pCR-Script-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH als *insert*

für die folgende Ligation. Vor der Ligation wurde die Vektor-DNA dephosphoryliert (s. 2.2.8), da SnaBI *blunt ends* erzeugt.

Das Ligationsprodukt wurde in chemisch kompetente *E.coli XL-1 Blue* Zellen transformiert. Wie bereits beschrieben erfolgte die Selektion der Bakterienklone, die das Plasmid in der Transformation aufgenommen haben, anhand einer *colony* PCR. Nach der anschließenden Mini-Präparation der putativ positiven Klone, folgte eine analytische Restriktionsspaltung mit EcoRI und eine Midi-Präparation. Die abschließende analytische Restriktionsspaltung nach Midi-Präparation erfolgte ebenfalls mit EcoRI. In der Kontrolle mittels Agarosegelelektrophorese (s. Abb. 9B) wurden Fragmente der Größe 155 bp, 402 bp, 615 bp, 1008 bp, 2436 bp und 5150 bp erwartet. Alle analysierten Klone zeigen das erwartete Restriktionsmuster.

Im letzten Schritt der Klonierung (s. Abb. 10A) wurde die Sequenz für den hIL-23 Rezeptor mit SOCS3 Bindemotiv in den Vektor pMOWS-puro kloniert, für retrovirale Transduktionen (s. 2.3.4) der Ba/F3-gp130 Zellen (s. Abb. 10).

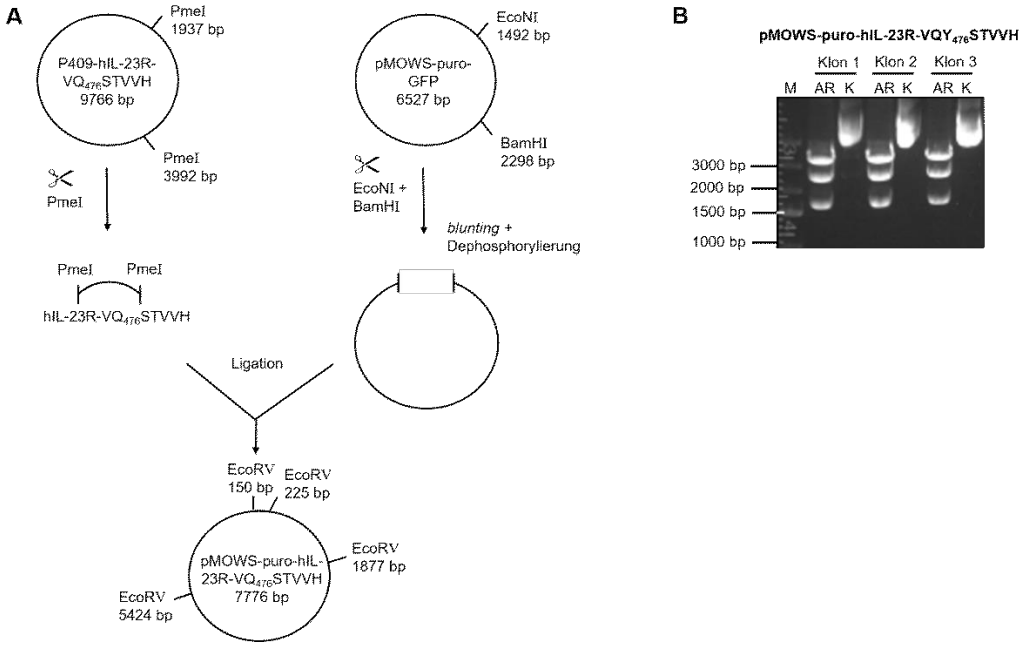


Abb. 10: Klonierung des retroviralen Vektors pMOWS-puro-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH
A: Klonierungsschema
Zur Vorbereitung des Vektors wurde pMOWS-puro-GFP mit EcoNI und BamHI geschnitten. Anschließend erfolgte ein DNA-*blunting* (s. 2.2.6) und eine Dephosphorylierung (s.2.2.8). Das *insert* wurde aus dem Plasmid p409-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH mit PmeI ausgeschnitten und in pMOWS-puro ligiert. Dieser Vektor trägt ein Gen, das eine Resistenz gegen Puromycin vermittelt.
B: Agarosegelelektrophorese der Midi-Präparation Produkte pMOWS-puro-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH
Nach Isolation der Plasmid-DNA mittels Midi-Präparation, wurde eine Restriktionsanalyse mit EcoRV durchgeführt und mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Die erwarteten Fragmente sollten eine Größe von 1652 bp, 3457 bp, 2502 bp und 75 bp bp aufweisen. Als Kontrolle diente nicht geschnittene Plasmid-DNA. Schere: Restriktionsspaltung, bp: Basenpaare, M: *marker* (*Express DNA Ladder 100-5000 bp*, Thermo Scientific), AR: analytische Restriktionsspaltung, K: Kontrolle (ungeschnittenes Plasmid)

Zur Gewinnung des Vektors wurde pMOWS-puro-GFP einer präparativen Restriktionsspaltung mit EcoNI und BamHI unterzogen. Anschließend wurden *blunt ends* am Vektor geschaffen (s. 2.2.6) und der Vektor dephosphoryliert, um eine Religation zu vermeiden. Das *insert* stammt aus p409-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH und wurde durch Restriktionsspaltung mit PmeI gewonnen. Nach Ligation und Transformation wurde eine *colony* PCR zur Identifikation putativ positiver Klone durchgeführt. Nach Restriktion von Plasmid-DNA, die mittels Mini-Präparation isoliert wurde, wurden drei Klone selektiert, deren Plasmid-DNA anhand einer Midi-Präparation isoliert wurde. Abb. 10B zeigt das Agarosegel nach Restriktionsspaltung der Plasmid-DNA aus der Midi-Präparation mit EcoRV. Die erwarteten Signale lagen bei 1652 bp, 3457 bp, 2502 bp und 75 bp. Das Signal bei 75 bp lässt sich aufgrund ihrer geringen Größe in dem angewendeten Verfahren nicht darstellen. Als Kontrolle wurde nicht geschnittene Plasmid-DNA verwendet. Die drei analysierten Klone zeigen die erwarteten Fragmentgrößen.

Die Plasmide p409-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH und pMOWS-puro-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH wurden zur Kontrolle sequenziert (s. 2.2.12).

Zur Überprüfung der korrekten Funktion wurden die generierten p409-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH Plasmide in U4C Zellen transfiziert (s. 2.3.3) und mittels Western Blot (s.2.4.3) analysiert (s. Abb. 11). Der verwendete Primärantikörper richtete sich gegen den humanen IL-23R. Hierbei ist zu beachten, dass das detektierte Signal für den hIL-23R nicht bei der berechneten Proteingröße von 71,7 kDa liegt. Dies liegt an posttranslationaler Modifikation des Rezeptors, der acht Glykosilierungsstellen aufweist (30). Als Kontrolle dienten Zelllysate von untransfizierten Zellen, von Zellen, die mit pEGFP transfiziert wurden und von Zellen, die mit p409-hIL-23R-P310 (Wildtyprezeptor) transfiziert wurden. Zellen, die mit den Plasmiden p409-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH 5 oder 11 transfiziert wurden, zeigen im Western Blot das gleiche detektierte Signal wie Zellen, die mit dem Wildtyprezeptor transfiziert wurden. Dies bestätigt die Expression des humanen IL-23R und somit die korrekte Funktion der generierten Plasmide. In den Kontrollen (untransfiziert, pEGFP) lässt sich keine Expression des hIL-23R detektieren. Klon 2 und 13 des Plasmids p409-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH führten nicht zu einer Expression des hIL-23R (s. Abb. 11).

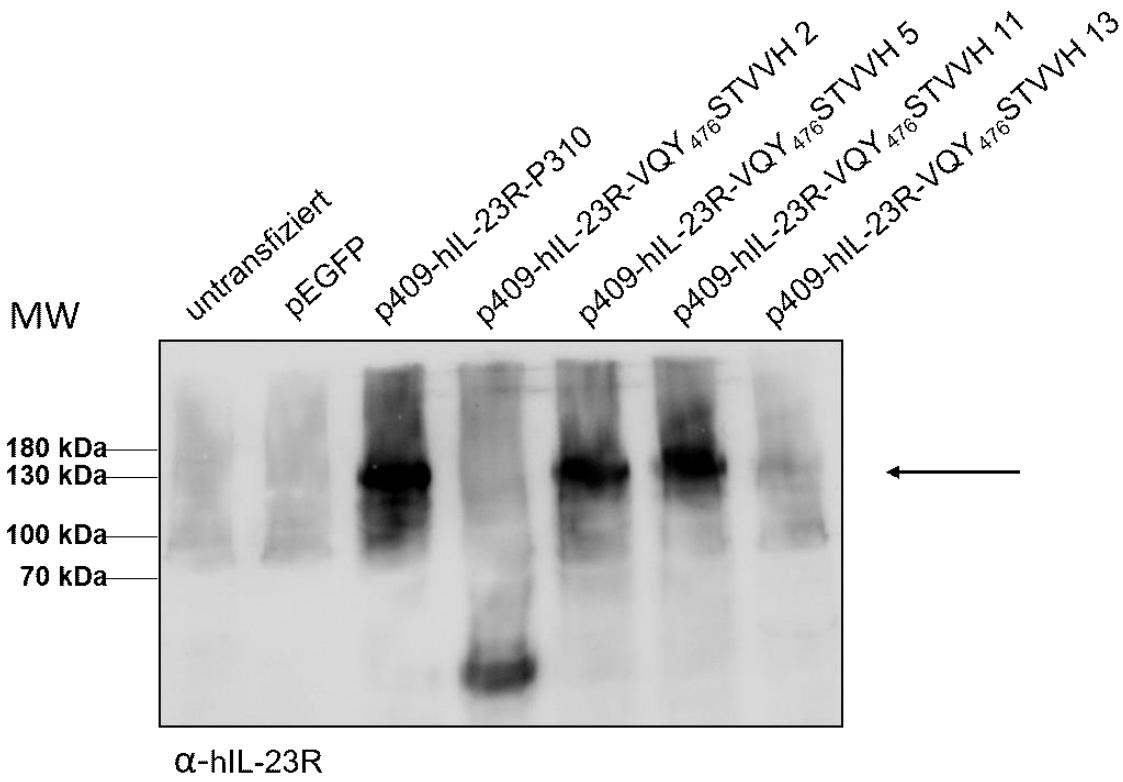


Abb. 11: Expression hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH in transient transfizierten U4C Zellen
Molekulargewicht: hIL-23R 71,7 kDa (uniprot Q5VWK5)
Transient transfizierte U4C Zellen wurden 48 h nach Transfektion lysiert. Die Lysate wurden mittels Immunoblox unter der Verwendung eines biotinylierten hIL-23R Antikörpers analysiert. Als Negativkontrollen dienten die Zelllysate von pEGFP und untransfizierten Zellen. Die Positivkontrolle war der Wildtyprezeptor hIL-23R. Das Plasmid hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH 2 führt zur Expression eines inkorrekten Proteins. Als Molekulargewichtsmarker wurde *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific) verwendet.
kDa: Kilodalton, MW: Molekulargewicht, Pfeil: erwartete Bande

3.2 SOCS3 inhibiert nicht die IL-23 Signaltransduktion

Die Untersuchung des Einflusses von SOCS3 auf die IL-23 Signaltransduktion wurde in einem Modell aus Ba/F3-gp130 Zellen durchgeführt, die abhängig von Hyper-IL-6 (HIL-6) proliferieren. Zur retroviralen Transduktion (s. 2.3.4) wurden die Expressionsvektoren pMOWS-puro und pMOWS-hygro verwendet, die eine Resistenz gegen Puromycin bzw. Hygromycin B vermitteln und dadurch eine Selektion der Zellen ermöglichen (97, 98). Ein weiterer Selektionsmechanismus ergibt sich durch die Expression beider Untereinheiten des heterodimeren hIL-23 Rezeptors. Im Gegensatz zu Zellen, die keine oder nur eine Untereinheit exprimieren, proliferieren Zellen mit beiden Untereinheiten des Rezeptors IL-23 abhängig. Abb. 12 zeigt schematisch den Ablauf der retroviralen Transduktionen von Ba/F3-gp130 Zellen mit pMOWS-puro-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH. Hierzu wurde eine

Ba/F3-gp130 Zelllinie verwendet, die in Vorarbeiten bereits mit pMOWS-hygro-hIL-12Rβ1 retroviral transduziert wurde (18). Nach erfolgreicher Transduktion konnten die Zellen über Zugabe von Hygromycin B selektiert werden. Nach retrovrialer Transduktion mit pMOWS-puro-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH, exprimierten die Zellen beide Untereinheiten des heterodimeren hIL-23 Rezeptors und konnten durch Zugabe von Hyper-murines-IL-23 (mHIL-23) kultiviert werden. Zusätzlich erfolgte eine Selektion über die Zugabe von Puromycin und Hygromycin B.

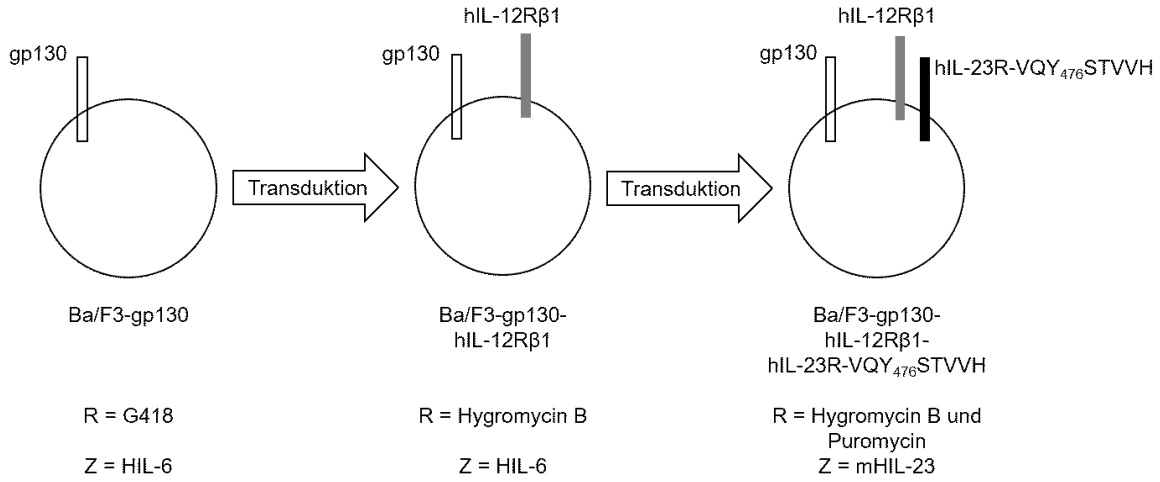


Abb. 12: Retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen zur Etablierung einer stabilen Zelllinie mit mutiertem IL-23 Rezeptor
Ba/F3-gp130 Zellen wurden in Vorarbeit der Arbeitsgruppe mit pMOWS-hygro-hIL-12Rβ1 versehen und durch Zugabe von Hygromycin selektiert (18). Anschließend wurde das generierte Plasmid pMOWS-puro-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH mittels retroviraler Transduktion eingebracht und die Zellen mit einer Kombination aus Hygromycin B und Puromycin selektiert. Die ersten beiden Varianten proliferien abhänging von HIL-6. Zelllinien, die beide Untereinheiten des heterodimeren IL-23 Rezeptors exprimieren proliferieren abhängig von IL-23.
Weiß: gp130, Grau: hIL-12Rβ1, Schwarz: hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH, R: Resistenz, Z: Zytokin

Die Oberflächenexpression der Rezeptoren wurde mittels Durchflusszytometrie (s.2.3.5) bestätigt (s. Abb. 13). Hierfür wurden die Zellen mit rezeptorspezifischen Antikörpern gefärbt. Der Antikörper gegen hIL-12Rβ1 war bereits mit einem Fluorophor gekoppelt, wohingegen der hIL-23R Antikörper sekundär mit Allophycocyanin (APC) markiert wurde. Als Negativkontrolle wurden Ba/F3-gp130 Zellen mit beiden Antikörpern gefärbt. Die deutliche Verschiebung der Histogramme der Ba/F3-gp130 Zelllinien mit beiden IL-23 Rezeptoren zeigt, dass diese Zellen die entsprechenden Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Als Positivkontrolle fungierte die bereits etablierte Zelllinie Ba/F3-gp130-hIL-12Rβ1-hIL-23R (99).

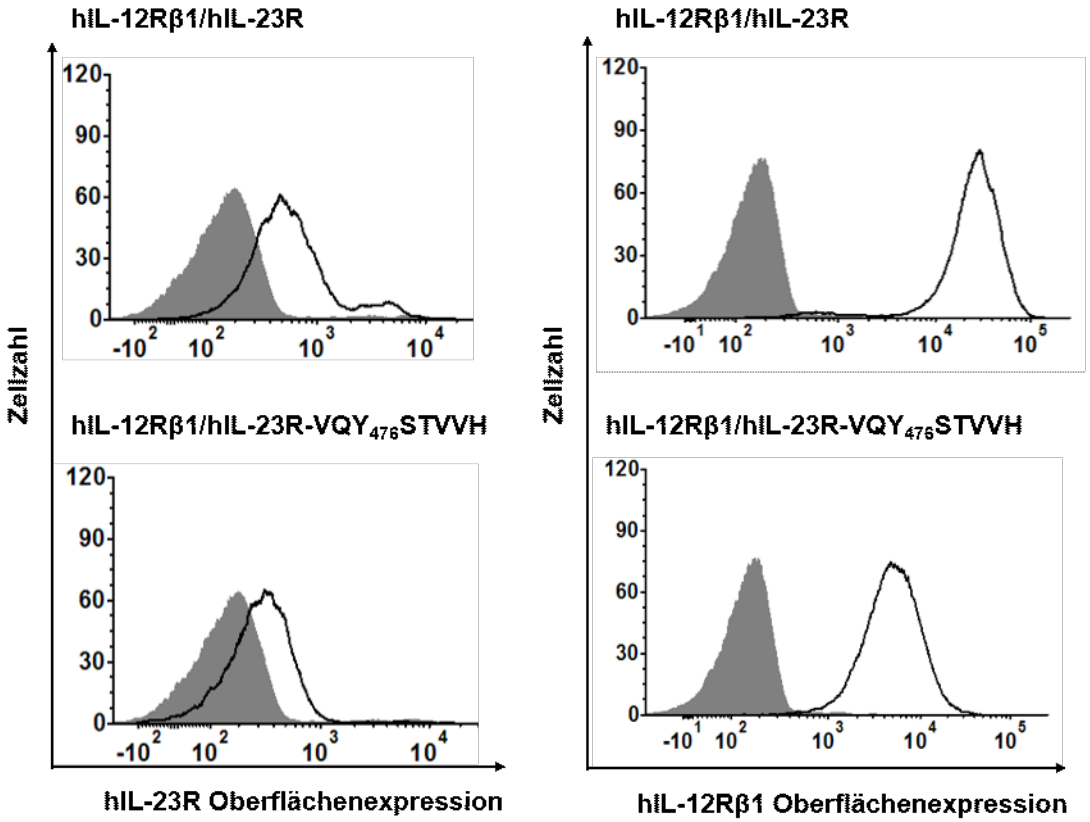


Abb. 13: Analyse der Oberflächenexpression von IL-23 Rezeptoren bei retroviral transduzierten BaF3-gp130 Zellinien
Auf der x-Achse ist die Fluoreszenzintensität abgebildet. Sie ist ein Maß für die Intensität der Rezeptorexpression an der Zelloberfläche. Die y-Achse repräsentiert die Anzahl gemessener Zellen. In grau dargestellt sind die Ergebnisse der Negativkontrolle (Ba/F3-gp130). Das weiß hinterlegte Histogramm stellt die Ergebnisse der generierten Zelllinie Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH, bzw. der bereits vorhandenen Zelllinie Ba/F3-gp130-hIL-12Rβ1-hIL-23R, dar. Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit rezeptorspezifischen Antikörpern gefärbt und über Fluorophore analysiert.

Anschließend wurde die zeitabhängige Phosphorylierung von STAT3 unter Stimulation mit HIL-6 oder mHIL-23 in Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23R Zellen beobachtet. Hierfür wurden die Zellen *gestarvt* und bis zu 6 h mit HIL-6 oder mHIL-23 stimuliert (s. 2.3.7). Nach Ernte wurden die Zellen lysiert (s. 2.4.1) und mittels Western Blot (s. 2.4.3) hinsichtlich der Aktivierung des Jak-STAT-Signalwegs (pSTAT3) untersucht. Hierfür wurden Antikörper zur Detektion von STAT3, phosphoryliertem STAT3 und SOCS3 verwendet. Nach Stimulation mit mHIL-23 wurde in Ba/F3-gp130hIL-12Rβ1/hIL-23R Zellen eine Induktion von SOCS3 nach 2 h detektiert. Die Phosphorylierung von STAT3 war nach einer Stimulation von 30 min mit mHIL-23 nachweisbar. Nach Stimulation mit mHIL-23 über 6 h kommt es nicht zu einer Abnahme der STAT3 Aktivierung. Zellen, die mit HIL-6 stimuliert wurden, zeigten bereits eine Expression von SOCS3 nach 1 h. Die STAT3 Phosphorylierung war ebenfalls nach 30 min nachweisbar. Allerdings verminderte sich unter HIL-6 Stimulation nach 2 h die Phosphorylierung von STAT3 (s. Abb. 14).

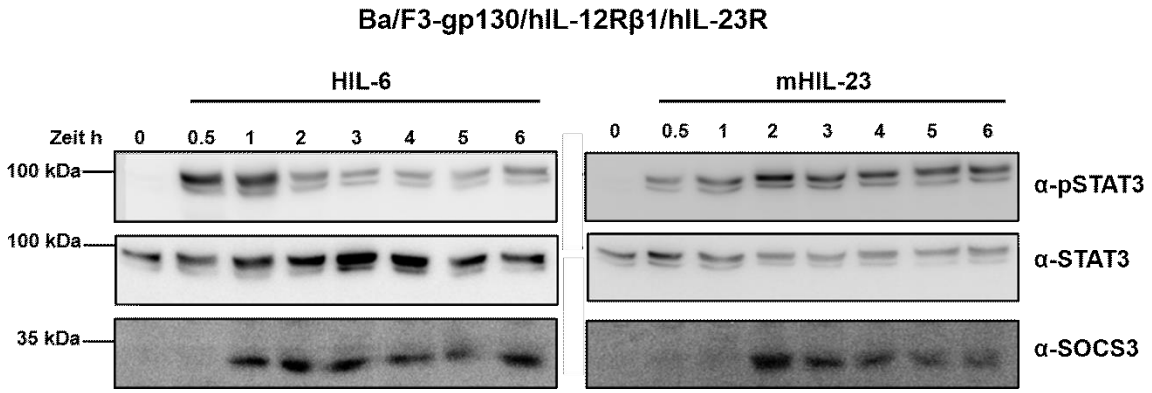


Abb. 14: SOCS3 führt nicht zu einer Supprimierung der IL-23 vermittelten STAT3 Phosphorylierung
Die Stimulation von Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23R mit HIL-6 und mHIL-23 erfolgte für 6 h. Anschließend wurden die Zellen lysiert und unter Verwendung des Western Blots analysiert. Ein repräsentatives Ergebnis von n=4 ist dargestellt. Die verwendeten Primärantikörper richteten sich gegen phosphoryliertes STAT3 (pSTAT3), STAT3 und SOCS3. Als Molekulargewichtsmarker wurde *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific) verwendet.
kDa: Kilodalton, h: Stunden

Dieser Stimulationsassays wurde im Rahmen dieser Arbeit mit den generierten Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH Zellen wiederholt (s. Abb. 15).

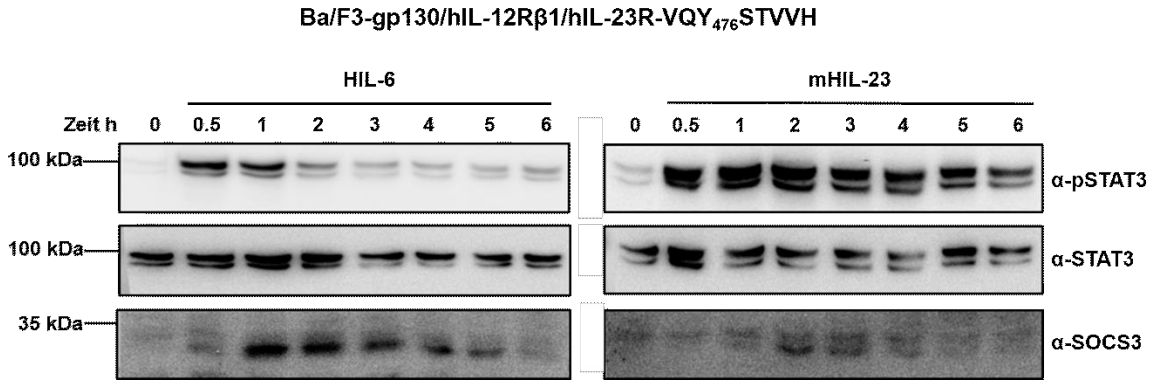


Abb. 15: Einfügen des SOCS3-Bindemotivs in den IL-23 Rezeptor ist nicht ausreichend, um eine SOCS3 vermittelte Supprimierung der IL-23 vermittelten STAT3 Phosphorylierung herbeizuführen
Die Stimulation von Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH mit HIL-6 und mHIL-23erfolgte für 6 h. Anschließend wurden die Zellen lysiert und unter Verwendung des Western Blots analysiert. Ein repräsentatives Ergebnis von n=4 ist abgebildet. Die verwendeten Primärantikörper richteten sich gegen phosphoryliertes STAT3 (pSTAT3), STAT3 und SOCS3. Als Molekulargewichtsmarker wurde *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific) verwendet.
kDa: Kilodalton, h: Stunden

Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 6 h entweder mit HIL-6 oder mHIL-23 stimuliert. Im Western Blot wurden Antikörper zur Detektion von phosphoryliertem STAT3, STAT3 und SOCS3 verwendet. Die Ergebnisse sind identisch zu den Ergebnissen in Zellen mit Wildtyprezeptor. Bei Stimulation mit mHIL-23 lässt sich eine Zunahme der STAT3 Aktivierung nach 30 min beobachten. Eine Induktion von SOCS3 ist nach 2 h nachweisbar. Innerhalb der sechsstündigen mHIL-23 Stimulation war keine Abnahme der STAT3 Aktivierung nachweisbar. Bei Stimulation mit HIL-6 zeigt sich eine vermehrte STAT3

Phosphorylierung nach 30 min, eine Induktion von SOCS3 nach 1 h und eine Abnahme der STAT3 Aktivierung nach 2 h.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die IL-6 vermittelte STAT3 Phosphorylierung über gp130 einer Inhibition durch SOCS3 unterliegt. Wie bereits beschrieben, kann die IL-23 vermittelte STAT3 Phosphorylierung über den heterodimeren hIL-23 Rezeptor allerdings nicht durch SOCS3 inhibiert werden (29). Das Einfügen der SOCS3 Bindestelle aus gp130 in den hIL-23R gemäß Punkt 3.1 führte nicht zur SOCS3 vermittelten Inhibtion der Aktivierung von STAT3.

3.3 Ba/F3-gp130 Zellen mit heterodimerem IL-23R und SOCS3 Bindemotiv im IL-23R proliferieren und zeigen ein verändertes Proliferationsverhalten als Zellen mit Wildtyp IL-23 Rezeptor

Zunächst wurde unter Verwendung eines Zellviabilitätsassays (s. 2.3.6) untersucht, ob die generierten Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH Zellen (s. 3.2) eine regelrechte zytokinabhängige Proliferation zeigen. Abb. 16 zeigt ein repräsentatives Ergebnis.

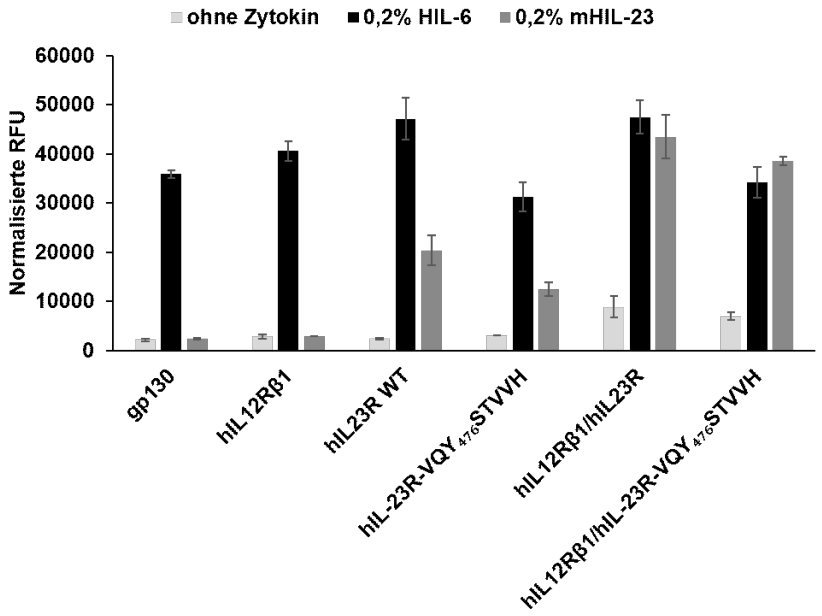


Abb. 16: Ba/F3-gp130 Zellen mit hIL-12Rβ1 und der generierten IL-23 Rezeptorvariante proliferieren IL-23 abhängig
Die Proliferation verschiedener Ba/F3-gp130 Zelllinien (x-Achse) wurde ohne Zytokin, in Abhängigkeit von IL-6 und in Abhängigkeit von IL-23 untersucht. Ohne Zugabe von Zytokin zeigt keine Zelllinie eine Proliferation. Alle Zelllinien exprimieren gp130 und proliferieren unter HIL-6. Nur die Zelllinien, die beide Untereinheiten des IL-23 Rezeptors exprimieren proliferieren IL-23 abhängig.
RFU: *relative fluorescence units*

Das Proliferationsverhalten der stabilen Zelllinien Ba/F3-gp130, Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1, Ba/F3-gp130/hIL-23R, Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23R und Ba/F3 gp130/hIL 12Rβ1/hIL 23R-VQY$_{476}$STVVH ohne Zytokinzugabe, mit HIL-6 und mit mHIL-23 wurde miteinander verglichen. Die verschiedenen Zelllinien sind auf der x-Achse abgebildet. Auf der y-Achse ist der Parameter RFU (*relative fluorescence units*) als Maß für die Intensität der Fluoreszenz und somit der Proliferation aufgetragen. Keine der analysierten Zelllinien zeigt eine zytokinunabhängige Proliferation. Da alle Zelllinien gp130 exprimieren, zeigen sie eine vergleichbare Proliferation mit HIL-6. Nur die Zelllinien, die beide IL-23 Rezeptoruntereinheiten exprimieren zeigen eine IL-23 abhängige Proliferation. Da die Zellen ohne Zugabe von Zytokin keine eigenständige Proliferation zeigen, kann davon

ausgegangen werden, dass die Mutation des IL-23 Rezeptors im intrazellulären Bereich gemäß Punkt 3.1 nicht zu einer konstitutiv aktiven Rezeptorvariante führte.

Nachdem eine regelrechte Zellproliferation in Abhängigkeit von IL-23 gezeigt werden konnte, wurde das Proliferationsverhalten von Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23R und Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH Zellen unter steigenden Konzentrationen von IL-23 (s. 2.3.6) verglichen (s. Abb. 17).

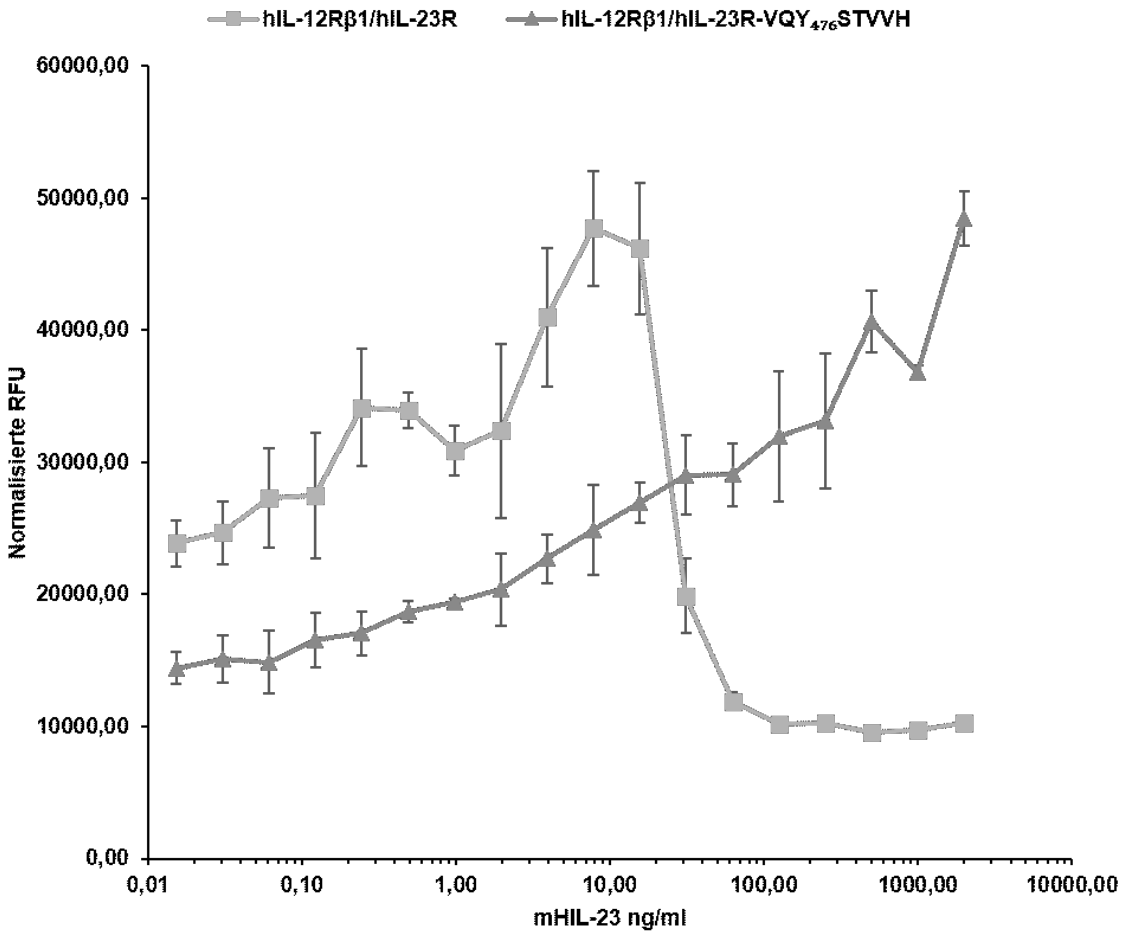


Abb. 17: Ba/F3-gp130 Zellen mit IL-12Rβ1 und der generierten Rezeptorvariante zeigen ein verändertes konzentrationsabhängiges Proliferationsverhalten als Zellen, die den Wildtyp IL-23 Rezeptor exprimieren
Die Proliferation von Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23R und Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH wurde in Abhängigkeit steigender Konzentrationen von mHIL-23 (x-Achse) untersucht. Bei Ba/F3-gp130 Zellen, die den IL-23 Wildtyprezeptor exprimieren, ist die Proliferation bei geringen Zytokinkonzentrationen bereits auf einem höheren Niveau und es kommt unter höheren Konzentrationen von mHIL-23 zu einer Abnahme der Proliferation, bis auf niedrigere Werte als ohne Zytokin. Zellen, die die mutierte Rezeptorvariante exprimieren, zeigen eine Verschiebung des Proliferationsverhaltens. Bei den gemessenen Konzentrationen lässt sich für Zellen mit der mutierten IL-23 Rezeptorvariante keine Abnahme der Proliferation zeigen. Ein repräsentatives Ergebnis von n=5 ist dargestellt. RFU: *relative fluorescence units*

Auf der x-Achse sind die steigenden mHIL-23 Konzentrationen von 0,01 ng/ml bis 2 µg/ml aufgetragen. Die y-Achse repräsentiert die RFU und somit ein Maß für die Zellproliferation.

Unerwarteterweise führen hohe IL-23 Konzentrationen (> 10 ng/ml) zu einer Abnahme der Proliferation der Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23R Zellen. Bei höheren IL-23 Konzentrationen sinkt der RFU Wert sogar auf niedrigere Werte als ohne Zytokin. Für dieses Phänomen gibt es bisher keine Erklärung. Zellen mit der mutierten IL-23R Variante zeigen bei diesen IL-23 Konzentrationen weiterhin eine zunehmende Proliferation. Durch die eingefügte SOCS3 Bindestelle kommt es zu einer Verschiebung des Proliferationsverhaltens. Bei höheren Zyotkinkonzentrationen wird das Maximum an RFU wie bei Zellen mit Wildtyprezeptor erreicht (ca. 45000). Allerdings kommt es auch bei den höchsten untersuchten Zytokinkonzentrationen nicht zu einer Reduktion der IL-23 abhängigen Proliferation. Außerdem fällt auf, dass das Niveau der Proliferation bei geringen Zytokinkonzentrationen geringer ist, als bei Zellen mit dem Wildtyprezeptor.

3.4 Hohe Konzentrationen von IL-23 verringern die Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen mit heterodimerem hIL-23 Rezeptor

In Abb. 17 (s. 3.3) wurde gezeigt, dass es in Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23R Zellen unter hohen Konzentrationen von IL-23 (> 10 ng/ml) zu einem Abbruch der Zellproliferation kommt, wohingegen dies bei Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23R-VQY_{476}STVVH Zellen nicht der Fall war. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurden mutierte Rezeptorvarianten (s. Abb. 18) des IL-23R verwendet.

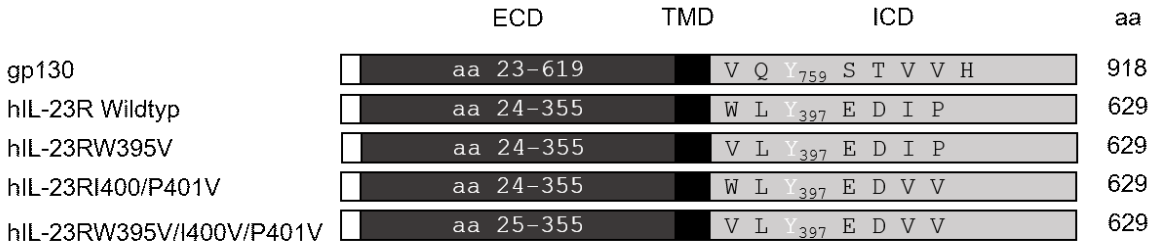


Abb. 18: Mutierte Rezeptorvarianten des hIL-23R
Schematische Darstellung von gp130 und Varianten des hIL-23R. Die Tyrosine in der intrazllulären Domäne sind hervorgehoben und numeriert.
aa: Aminosäure, weiß: N-Terminus, ECD (dunkelgrau): Extrazelluläre Domäne, TMD (schwarz): Transmembrandomäne, ICD (hellgrau): intrazelluläre Domäne

Die Mutationsvarianten wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe erstellt. Im Gegensatz zur Einbringung der SOCS3 Bindesequenz (s. 3.1) um das intrazelluläre Tyrosin 476, wurden Aminosäuren um das intrazelluläre Tyrosin 397 mutiert. In der Variante hIL-23RW395V wurde Tryptophan (W395) durch Valin ersetzt, in der Variante hIL-23RI400/P401V wurde Isoleucin (I400) und Prolin (P401) zu Valin mutiert und in hIL23RW395/I400/P401V

wurden W395, I400 und P401 durch Valin ersetzt. Diese Mutationen beruhen auf dem SOCS3 Bindemotiv (VQYSTVVH) in gp130 mit pTyr759 im Zentrum (28, 32).

Die beschriebenen Mutationsvarianten wurden bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Scheller in Ba/F3-gp130 Zellen eingebracht (s.2.3.4). In Proliferationsassays (s. 2.3.6) unter Verwendung steigender Konzentrationen von IL-23 wurde im Rahmen dieser Arbeit das Proliferationsverhalten der generierten Zelllinien Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23W395V, Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23I400/P401V und Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23W395V/I400V/P401V untersucht und mit dem Proliferationsverhalten von Wildtyp Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23R Zellen verglichen.

Abb. 19 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen konzentrationsabhängingen Proliferationsassays.

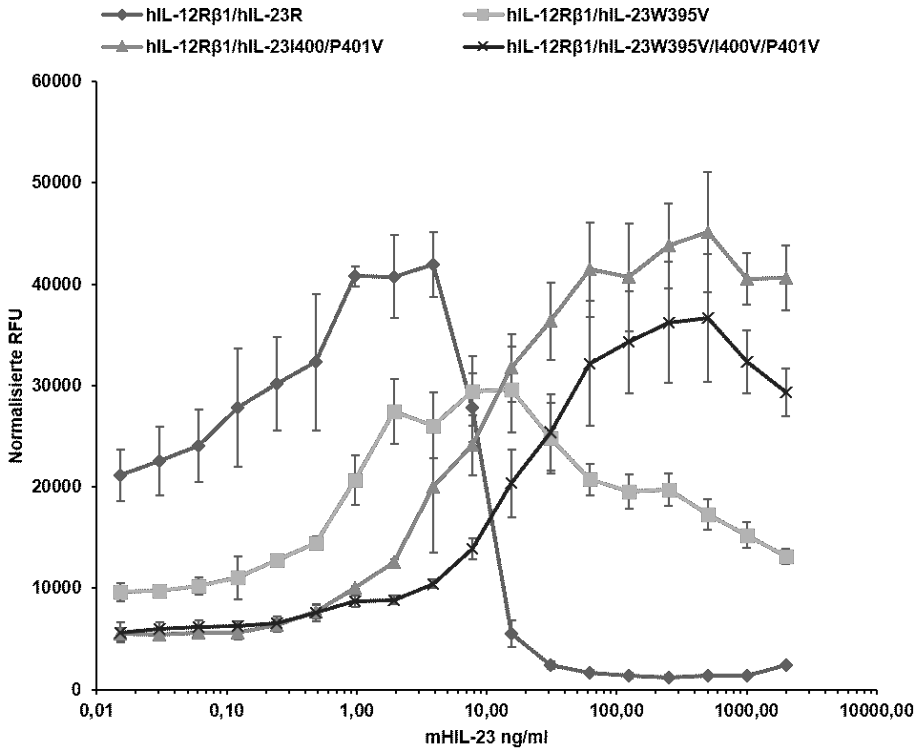


Abb. 19: Mutationen im IL-23 Rezeptor ändern das konzentrationsabhängige Proliferationsverhalten von Ba/F3-gp130 Zellen mit IL-23 Rezeptoren
Auf der x-Achse sind die steigenden mHIL-23 Konzentrationen in ng/ml aufgetragen und auf der y-Achse ein Maß für die Proliferation (RFU). Alle Zelllinien exprimieren beide Untereinheiten des IL-23 Rezeptors. Zellen, die den Wildtyprezeptor exprimieren, zeigen eine Abnahme der Proliferation bei hohen IL-23 Konzentrationen. Die eingebrachten Mutationen führen zu einer Rechtsverschiebung der Kurven, wobei die höchste untersuchte Konzentration nicht zu einer vergleichbar starken Abnahme der Proliferation führt. Ein repräsentatives Ergebnis von n=3 ist dargestellt.
RFU: *relative fluorescence unit*

Auf der x-Achse sind die steigenden mHIL-23 Konzentrationen und auf der y-Achse ein Maß für die Proliferation (RFU) aufgetragen. Bei einer Konzentration von > 10 ng/ml kommt es zum bereits beschriebenen Abbruch der Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen mit Wildtyprezeptoren. Durch die Mutationen um Y397 verändert sich das Proliferationsverhalten der Ba/F3-gp130 Zellreihen. Die Zellen mit Mutationsvarianten des IL-23 Rezeptors zeigen eine schwächere Proliferation bei niedrigen Zytokinkonzentrationen als der Wildtyp. Zellen mit den Varianten hIL-23I400/P401V (VV6) und Zellen mit der Variante hIL-23W395V/I400V/P401V (VVV11) zeigen eine starke Zunahme der Proliferation zwischen Zytokinkonzentrationen von 1 ng/ml bis 100 ng/ml. Ab 100 ng/ml hat die Intensität der Proliferation ein Plateau erreicht, bis es ab 1000 ng/ml zu einer leichten Abnahme der Proliferation kommt. Zellen mit der Variante hIL-23W395V (V3) zeigen das niedrigste Proliferationsmaximum der 4 Zelllinien, das zwischen 1 ng/ml und 10 ng/ml erreicht ist. Konzentrationen über 10 ng/ml führen zu einer Abnahme der Proliferation. Allerdings ist die Abnahme im Vergleich zum Wildtyprezeptor vermindert und unter den gemessenen Konzentrationen kommt es auch bei dieser Variante nicht zu einem Abbruch der Proliferation.

Die Ergebnisse zeigen, dass Mutationen um Y397, sowie Mutationen um Y476 (s. 3.3) zu einer Veränderung des IL-23 abhängigen Proliferationsverhalten der Ba/F3-gp130 Zellen führen.

Die verwendeten Rezeptorvarianten sind chimäre Rezeptoren, wobei die extrazelluläre und transmembrane Domäne aus dem murinen Rezeptor stammt und die Intrazellulärdomäne aus dem humanen Rezeptor. Zellen mit Deletionsvarianten des Rezeptors vor Y476 zeigen keine STAT3 Phosphorylierung, aber dennoch eine vergleichbare Proliferation wie Zellen mit vollständiger Intrazellulärdomäne (26). Sobald jedoch Y397, das obligat zur MAPK/PI3K Aktivierung ist, mutiert wird, erliegt die Zellproliferation (26). Dies kann erklären, warum das Einbringen der SOCS3 Bindestelle um Y397 in Vorarbeiten zu einer nicht proliferierenden Rezeptorvariante geführt hat. Aus den Ergebnissen von Vorarbeiten scheint Y476 keine kritische Rolle in der Zellproliferation von Ba/F3-gp130 Zellen zu spielen, sodass die SOCS3 Bindestelle um diesen Tyrosinrest eingebracht wurde (26). Dieser Tyrosinrest ist im murinen und humanen Rezeptor homolog. Überraschenderweise führt diese Mutation jedoch zu einer Änderung des Proliferationsverhaltens gegenüber dem Wildtyp. Es ergibt sich der Verdacht, dass Y476 eine bisher nicht geklärte Rolle in der IL-23 Signaltransduktion einnimmt.

Nach Mutationen um Y397 verändert sich das Proliferationsverhalten im Vergleich zum Wildtyp. Für die Varianten Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23I400V/P401V und Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23W395V/I400V/P401V scheint eine höhere Konzentration von IL-23 benötigt zu werden, um das Maximum der Proliferation des Wildtyps zu erreichen. Außerdem führt eine derart hohe Zytokinkonzentration nicht zum kompletten Erliegen der Proliferation. Dies lässt vermuten, dass die Mutationen um Y397 zu einer ineffzienteren Aktivierung des MAPK/PI3K Signalwegs führen. Darüberhinaus legt das beobachtete Proliferationsverhalten nahe, dass der beobachtete Abbruch der Proliferation durch Faktoren verursacht wird, die von einer regelrechten IL-23 Signaltransduktion ausgelöst werden. Die Proliferation der Varianten Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23I400V/P401V und Ba/F3-gp130/hIL-12Rβ1/hIL-23W395V/I400V/P401V zeigt nach Erreichen des Maximums ebenfalls ein Absinken des Proliferationsniveaus bei weiter steigenden Zytokinkonzentrationen.

3.5 Klonierung der CIB2 Expressionsvektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Fusionsprotein CIB2-GFP für Interaktionsstudien verwendet. Das Plasmid pcDNA3.1-hCIB2-GFP lag in der Arbeitsgruppe Scheller vor. Durch die Fusion mit GFP wurde eine Immunpräzipitation (s. 2.4.4) mit GFP-*nanobodies* ermöglicht. Außerdem erfolgte mittels GFP die Lokalisation von CIB2 durch Fluoreszenzmikroskopie (s. 2.3.8). Zur Expression in Ba/F3-gp130 Zellen wurde die cDNA für CIB2-GFP in den retroviralen Vektor pMOWS-hygro kloniert. Als Ausgang der Klonierung diente das Plasmid pcDNA3.1-hCIB2-GFP, das zur Expressionskontrolle in U4C Zellen transfiziert (s. 2.3.3) wurde. Als Kontrollen wurden untransfizierte Zellen genutzt sowie Zellen, die mit pEGFP transfiziert wurden. Nach Gewinnung der Zelllysate (s. 2.4.1) erfolgte der Nachweis des Fusionsproteins mittels Western Blot (s. 2.4.3, s. Abb. ***20***).

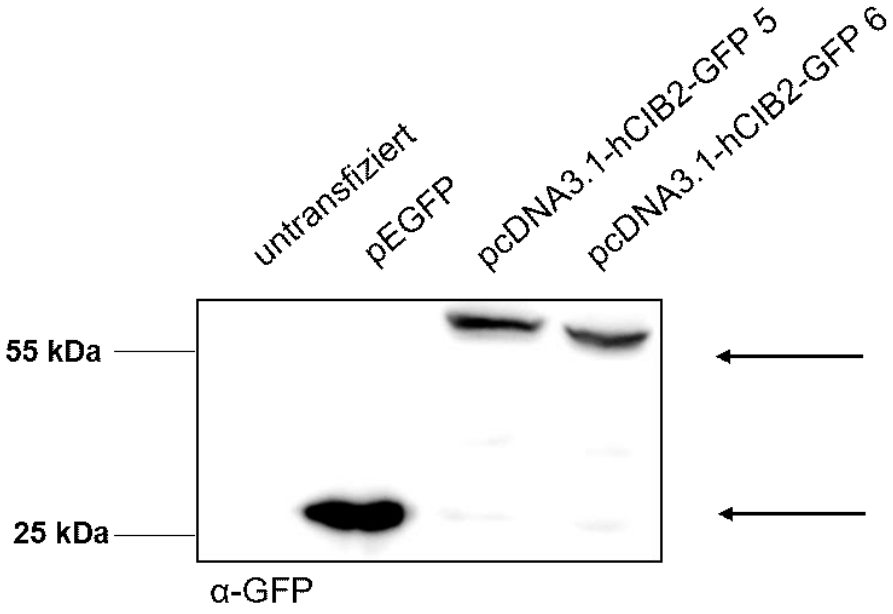


Abb. 20: Analyse der Expression des Fusionsproteins hCIB2-GFP in eukaryotischen Zellen
48 h nach transienter Transfektion wurden die eukaryotischen Zellen (U4C) geerntet, lysiert und mittels Western Blot analysiert. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet. Die Detektion der Proteine erfolgte unter Verwendung des anti-GFP Antikörpers. Die Molekulargewichte der Proteine betragen 29,6 kDa für GFP und 47,6 kDa für das Fusionsprotein hCIB2-GFP.
kDA: Kilodalton, Pfeil: erwartete Band

Der verwendete Primärantikörper richtete sich gegen GFP. Untransfizierte Zellen zeigen kein Signal für GFP. Zellen, die mit pEGFP oder einem der beiden pcDNA3.1-hCIB2-GFP Plasmiden transfiziert wurden, zeigen ein Signal für GFP (29,6 kDa) oder das Fusionsprotein (47,6 kDa).

Das Klonierungsschema für den retroviralen Vektor pMOWS-hygro-hCIB2-GFP ist Abb. *21*A zu entnehmen.

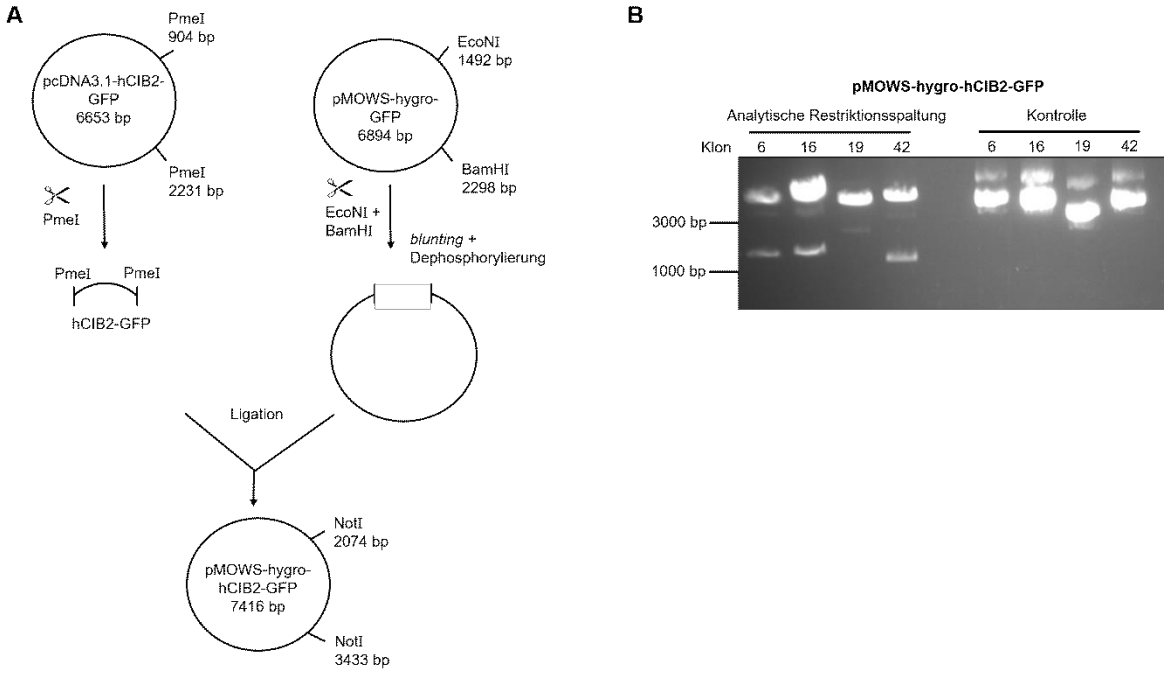


Abb. 21: Klonierung des retroviralen Vektors pMOWS-hygro-hCIB2-GFP
A: Klonierungsschema
Im Ausgangsplasmid pcDNA3.1-hCIB2-GFP ist GFP mit CIB2 fusioniert. Das Fragment, das für dieses Fusionsprotein kodiert, wurde mit PmeI ausgeschnitten und als *insert* in pMOWS-hygro ligiert. Der Vektor pMOWS-hygro wurde durch Restriktionsspaltung von pMOWS-hygro-GFP mit EcoNI und BamHI gewonnen. Anschließen erfolgte in DNA-*blunting* (s.2.2.6) und eine Dephosphorylierung (2.2.8). Der Vektor trägt ein gegen Hygromycin B gerichtetes Resistenzgen.
B: Agarosegelelektrophorese der Midi-Präparation Produkte pMOWS-hygro-hCIB2-GFP
Nach Isolation der Plasmid-DNA mittels Midi-Präparation, wurde eine Restriktionsanalyse mit NotI durchgeführt und mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Die erwarteten Fragmente sollten eine Größe von 6057 bp und 1359 bp aufweisen. Als Kontrolle diente nicht geschnittene Plasmid-DNA. bp: Basenpaare, Marker (*Express DNA Ladder 100-5000 bp*, Thermo Scientific)

Zunächst wurde in einer präparativen Restriktionsspaltung (s. 2.2.5) mit dem Enzym PmeI das *insert* mit der cDNA für das Fusionsprotein hCIB2-GFP aus dem Plasmid pcDNA3.1-hCIB2-GFP geschnitten, die Fragmente in einer Gelektrophorese (s. 2.2.3) voneinander getrennt und anschließend mittels Gelextraktion (s. 2.2.4) das 1327 bp große Fragment isoliert. Zur Gewinnung des Vektors wurde das Plasmid pMOWS-hygro-GFP mit den Enzymen BamHI und EcoNI geschnitten und nach Gelextraktion einem DNA-*blunting* (s. 2.2.6) und einer Dephosphorylierung (s. 2.2.8) unterzogen, um eine *blunt-end* Ligation (s. 2.2.9) zu ermöglichen. Nach erfolgter Ligation wurde das Ligationsprodukt in chemisch kompetente *E.coli XL-1 Blue* Zellen transformiert (s. 2.2.1). Zur Selektion von putativen Bakterienklonen, die das Plasmid in der Transformation aufgenommen haben, wurde eine *colony* PCR (s. 2.2.2) durchgeführt. Von putativ positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert (s. 2.2.10) und mittels Restriktionsspaltung analysiert. Abb. 21B zeigt das Ergebnis der abschließenden Restriktionsanalyse mit NotI. Die erwarteten Fragmente lagen bei

1359 bp und 6057 bp. In der Abbildung zeigen die Klone 6, 16 und 42 ein positives Ergebnis. Als Kontrolle wurden nicht geschnittene Plasmide ebenfalls im Agarosegel analysiert.

3.6 Das zytoplasmatische Protein CIB2 bindet an den IL-23 Rezeptor

Zur Bestätigung der angenommenen Bindung von CIB2 an den IL-23 Rezeptor wurde eine Ko-Immunpräzipitation (s. 2.4.4) von CIB2-GFP und dem IL-23R durchgeführt. Hierfür wurden COS-7 Zellen mit den zwei Expressionsvektoren pcDNA3.1-hCIB2-GFP und p409-hIL-23R-P310 transient transfiziert (s. 2.3.3). Zur Kontrolle wurden COS-7 Zellen verwendet, die mit pcDNA3.1-GFP und p409-hIL-23R-P310 transfiziert wurden. Abb. 22 zeigt das Ergebnis des Western Blots (s. 2.4.3) zum Nachweis des humanen IL-23R und dem GFP-Fusionsprotein.

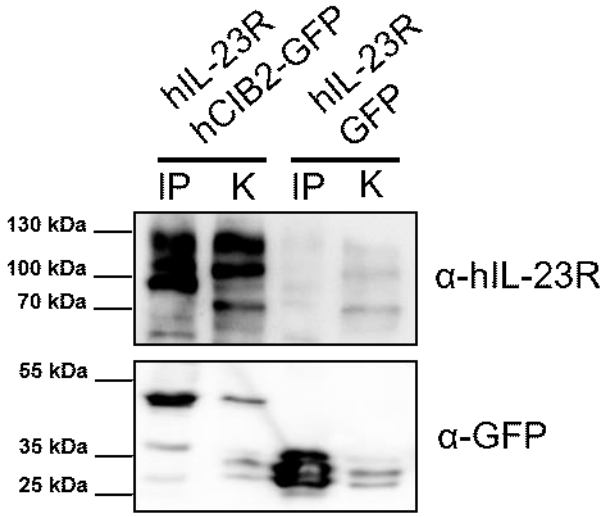


Abb. 22: Ko-Immunpräzipitation hCIB2-GFP und hIL-23 Rezeptor in transient transfizierten COS-7 Zellen
Es wurden Zellen mit dem humanen IL-23R und dem Fusionsprotein hCIB2-GFP transfiziert (links). Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die mit dem humanen IL-23R und GFP transfiziert wurden (rechts). Nach der Zelllyse wurde ein Teil des Lysats zur Immunpräzipitation mit den GFP-*nanobody* tragenden Sepharose *beads* versehen. Das restliche Lysat diente als *input* Kontrolle und wurde keiner Immunpräzipitation unterzogen. Die verwendeten Primärantikörper richteten sich gegen den hIL-23R und gegen GFP. Die Molekulargewichte der Proteine betragen 29,6 kDa für GFP, 47,6 kDa für das Fusionsprotein hCIB2-GFP und 71,7 kDa für den hIL-23R. Als Molekulargewichtsmarker wurde *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Ein repräsentatives Ergebnis von n=6 ist abgebildet. K: *input* Kontrolle, IP: Immunpräzipitation, kDa: Kilodalton

Zur Detektion des humanen IL-23 Rezeptors und GFP wurden verschiedene Primärantikörper verwendet. Als *input* Kontrolle (in der Abbildung mit „K“ gekennzeichnet) diente ein Teil des Zelllysats, das nicht mit den GFP-*nanobody* tragenden Sepharose *beads*

versehen wurde. Alle COS-7 Zellen, die mit p409-hIL-23R-P310 transfiziert wurden, zeigen in der *input* Kontrolle ein Signal für den humanen IL-23R. Dies bestätigt eine korrekte Expression des Rezeptors nach Transfektion. Nur nach Ko-Transfektion mit pcDNA3.1-hCIB2-GFP lässt sich nach durchgeführter Immunpräzipitation (Probe in der Abbildung mit „IP“ markiert) ein Signal für den humanen IL-23R detektieren, sodass eine Interaktion von GFP mit dem IL-23R nicht ursächlich ist. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich die Bindung von CIB2 and den humanen IL-23 Rezeptor bestätigen.

Zur weiteren Eingrenzung der exakten Bindestelle von CIB2 am IL-23R, wurde das beschriebene Verfahren mit Deletionsvarianten des murinen IL-23 Rezeptors, die bereits in der AG Scheller vorlagen, durchgeführt. Das *alignment* des humanen und murinen CIB2 (s. Abb. 23) zeigt eine hohe Homologie von beiden Proteinen (97,3% Identität), somit kann davon ausgegangen werden, dass das humane CIB2 dieselbe Interaktion mit dem murinen IL-23R zeigt wie mit dem humanen Rezeptor.

```
CIB2 human  MGNKQTIFTEEQLDNYQDCTFFNKKDILKLHSRFYELAPNLVPMDYRKSPIVHVPMSLII 60
CIB2 murin  MGNKQTIFTEEQLDNYQDCTFFNKKDILKLHARFYELAPNLVPMDYRKSPIVHVPMSLII 60
            ******************************:***************************

CIB2 human  QMPELRENPFKERIVAAFSEDGEGNLTFNDFVDMFSVLCESAPRELKANYAFKIYDFNTD 120
CIB2 murin  QMPELRENPFKERIVEAFSEDGEGNLTFNDFVDMFSVLCESAPRELKANYAFKIYDFNTD 120
            *************** ******************************************

CIB2 human  NFICKEDLELTLARLTKSELDEEEVVLVCDKVIEEADLDGDGKLGFADFEDMIAKAPDFL 180
CIB2 murin  NFICKEDLEMTLARLTKSELEEDEVVLVCDKVIEEADLDGDGKLGFADFEDMIAKAPDFL 180
            *********:**********:*:************************************

CIB2 human  STFHIRI                                                      187
CIB2 murin  STFHIRI                                                      187
            *******
```

Abb. 23: Vergleich der Aminosäuresequenz von humanem und murinen CIB2
Unter Verwendung des Programmes *Clustal Omega* wurden die Aminosäuresequenzen von humanem CIB2 (075838) und murinem CIB2 (Q9Z309) verglichen.
Stern: identische Position, Doppelpunkt: ähnliche Eigenschaften der Aminosäuren

Die Deletionsvarianten (s. Abb. 24) mIL-23RΔ415 (D1), mIL-23RY416FΔ446 (D2), mIL-23RΔ503 (D3), mIL-23RY416FΔ503 (D4), mIL-23RY416F-Y504FΔ540 (D5) und mIL-23R-Y416F-Y504F-Y542FΔ571 (D9) stammen aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe und unterscheiden sich in der Länge der intrazellulären Rezeptordomäne sowie Mutationen der intrazellulären Tyrosinreste des Rezeptors (26).

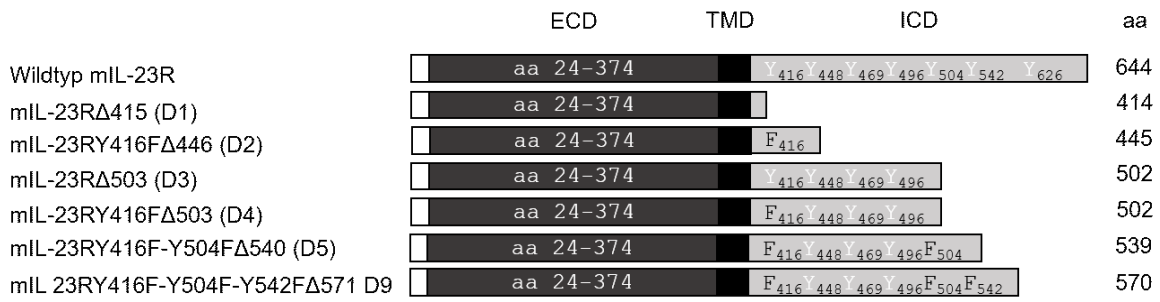


Abb. 24: Schematische Darstellung der Deletionsvarianten des murinen IL-23R
Der Wildtyprezeptor mIL-23R weißt eine Länge von 644 Aminosäuren auf (inklusive Signalpeptid). Die Deletionsvarianten unterscheiden sich in der Länge der intrazellulären Domäne und Mutationen verschiedener Tyrosinreste. D1 ist vor der Aminosäure 415 abgeschnitten, D2 vor 446 und der Tyrosinrest an Stelle 416 wurde zu Phenylalanin mutiert. D3 ist vor der Aminosäure 503 abgeschnitten, D5 vor 540 und die Tyrosinreste an den Stellen 416 und 504 sind zu Phenylalanin mutiert. D9 wurde vor der Aminosäure 571 abgeschnitten und die Tyrosinreste an den Stellen 416, 504 und 542 sind zu Phenylalanin mutiert. aa: Aminosäure

Lässt sich nach Immunpräzipitation kein Signal für den murinen IL-23R detektieren, ist davon auszugehen, dass die Bindestelle von CIB2 im deletierten Bereich des Rezeptors liegt oder dass eine mutierte Aminosäure zur Bindung nötig ist. Die angenommene Bindung von humanem CIB2 an den murinen IL-23R wurde zunächst in einer Immunpräzipitationen unter Verwendung der GFP-*nanobody* Sepharose bestätigt. Abb. 25 zeigt den Western Blot.

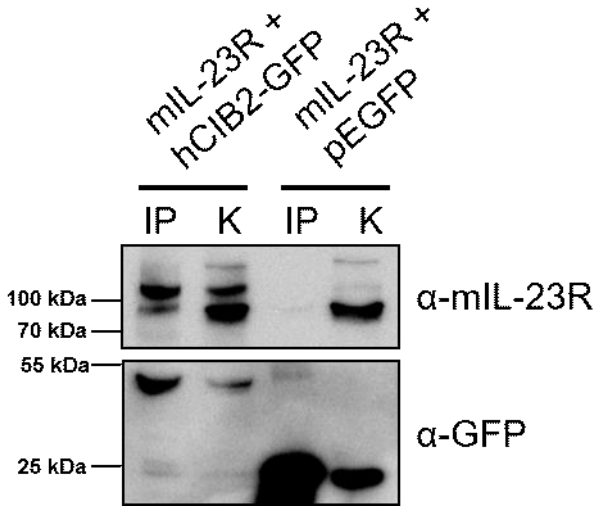


Abb. 25: Ko-Immunpräzipitation hCIB2-GFP und mIL-23 Rezeptor in transient transfizierten COS-7 Zellen
Es wurden Zellen mit dem murinen IL-23R und dem Fusionsprotein hCIB2-GFP transfiziert (links). Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die mit dem murinen IL-23R und pEGFP transfiziert wurden (rechts). Nach der Zelllyse wurde ein Teil des Lysats zur Immunpräzipitation mit den GFP-*nanobody* tragenden Sepharose *beads* versehen. Das restliche Lysat diente als *input* Kontrolle und wurde keiner Immunpräzipitation unterzogen. Die verwendeten Primärantikörper richteten sich gegen den mIL-23R und gegen GFP. Die Molekulargewichte der Proteine betragen 29,6 kDa für GFP, 47,6 kDa für das Fusionsprotein hCIB2-GFP und 73,5 kDa für den mIL-23R. Als Molekulargewichtsmarker wurde *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Ein repräsentatives Ergebnis von n=6 ist abgebildet. K: *input* Kontrolle, IP: Immunpräzipitation, kDa: Kilodalton

Primärantikörper zur Detektion des murinen IL-23 Rezeptors und GFP wurden verwendet. Als *input* Kontrolle (in der Abbildung mit „K“ beschriftet) diente ein Teil des Zelllysats, das vor Durchführung der Immunpräzipitation entnommen wurde. Die Probe nach Immunpräzipitation ist mit „IP“ in der Abbildung gekennzeichnet. Um auszuschließen, dass die Ergebnisse durch eine Bindung von GFP an den IL-23R und nicht durch eine Bindung von CIB2 an den Rezeptor verursacht werden, wurde zur Kontrolle eine Immunpräzipitationen nach Transfektion von COS-7 Zellen mit dem murinen IL-23R und pEGFP durchgeführt. Bei beiden Proben wurde in den *input* Kontrollen eine korrekte Expression des mIL-23R gezeigt. Nach Immunpräzipitation lässt sich ein Signal für den mIL-23R in Zellen, die mit dem Wildtyprezeptor und hCIB2-GFP transfiziert wurden, eindeutig zeigen. Dies bestätigt die Bindung von hCIB2-GFP an den mIL-23R.

Dieses Verfahren wurde anschließend für die in Abb. 24 beschriebenen Deletionsvarianten angewendet (s. Abb. 26).

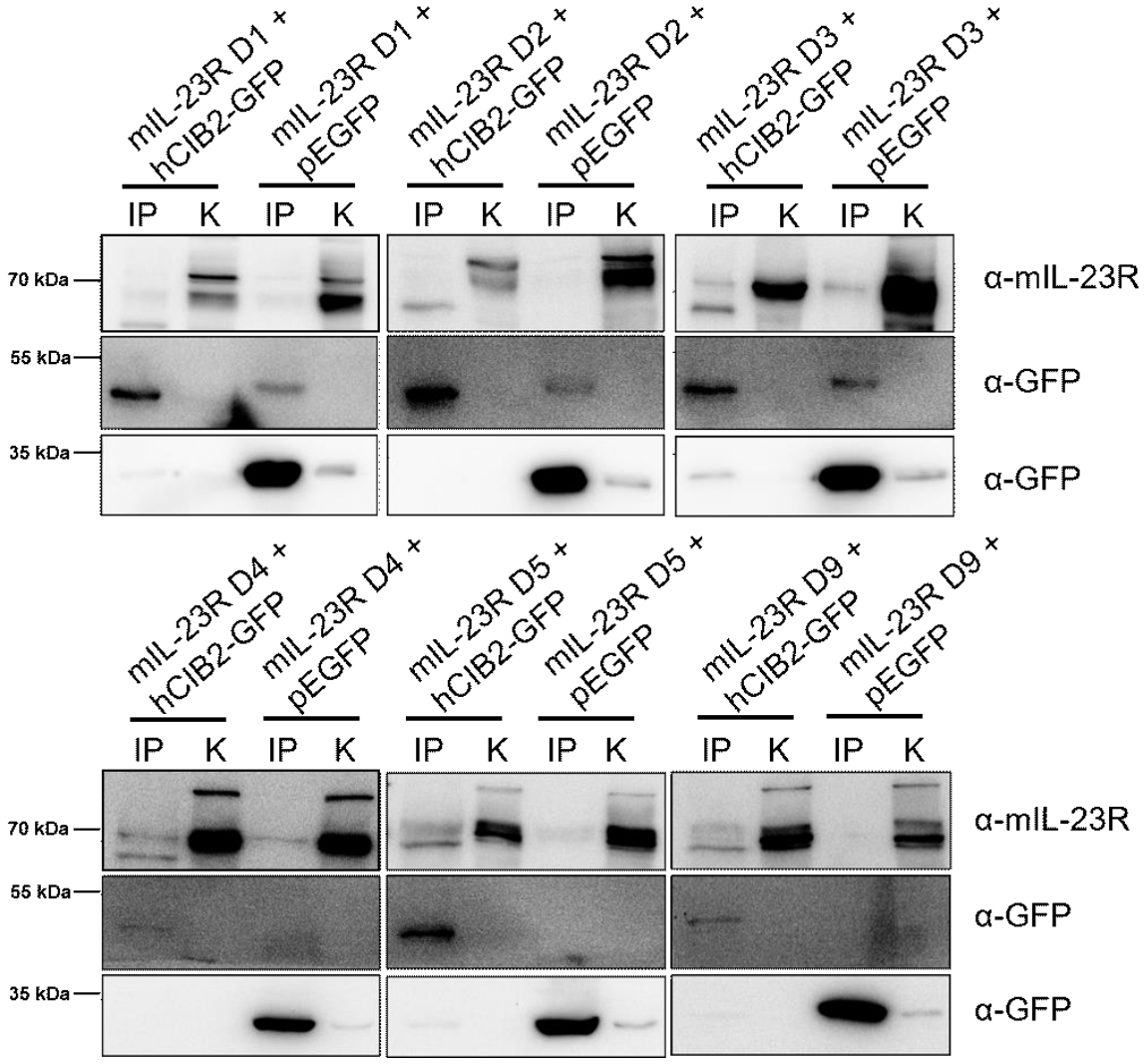


Abb. 26: Ko-Immunpräzipitation CIB2-GFP und mIL-23 Rezeptor Deletionsvarianten in COS-7 Zellen
Es wurden Zellen mit verschiedenen Deletionsvarianten des mIL-23R und dem Fusionsprotein hCIB2-GFP transfiziert (jeweils links). Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die mit der jeweiligen Deletionsvariante und pEGFP transfiziert wurden (jeweils rechts). Nach der Zelllyse wurde ein Teil des Lysats zur Immunpräzipitation mit den GFP-*nanobody* tragenden Sepharose *beads* versehen. Das restliche Lysat diente als *input* Kontrolle und wurde keiner Immunpräzipitation unterzogen. Die verwendeten Primärantikörper richteten sich gegen den mIL-23R und gegen GFP. Die Molekulargewichte der Proteine betragen 29,6 kDa für GFP, 47,6 kDa für das Fusionsprotein hCIB2-GFP und 73,5 kDa für den mIL-23R. Als Molekulargewichtsmarker wurde *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Ein repräsentatives Ergebnis von n=3 ist dargestellt.
K: *input* Kontrolle, IP: Immunpräzipitation, D1-D9: Deletionsvarianten des mIL-23 Rezeptors (s. Text), kDa: Kilodalton

Eine Ko-Präzipitation von hCIB2-GFP und Rezeptorvariante wurde für mIL-23RΔ503 (D3), mIL-23RY416FΔ503 (D4), mIL-23RY416F-Y504FΔ540 (D5) und mIL-23R-Y416F-Y504F-Y542FΔ571 (D9) nachgewiesen. Hierbei scheint die Bindung von hCIB2-GFP an den Rezeptor jedoch deutlich schwächer zu sein als beim Wildtyprezeptor.

Bei Ko-Transfektion mit pEGFP anstatt CIB2-GFP kann nach Immunpräzipitation bei keiner Probe ein Signal für den murinen IL-23 Rezeptor detektiert werden, sodass die

Ergebnisse auf eine Interaktion zwischen CIB2 und den Rezeptor hindeuten. Die Verwendung der Deletionsvarianten zeigt, dass für die Bindung von hCIB2 an den mIL-23R eine gewisse Länge der intrazellulären Rezeptordomäne benötigt. Für die Varianten mIL-23RΔ415 (D1) und mIL-23RY416FΔ446 (D2), deren intrazellulären Domänen kurz hinter der Transmembrandomäne deletiert sind, lässt sich keine Bindung von CIB2 an den Rezeptor zeigen. Für die Variante mIL-23RΔ503 (D3) lässt sich eine schwache Bindung nachweisen, ebenso für die Varianten mIL-23RY416FΔ503 (D4), mIL-23RY416F-Y504FΔ540 (D5) und mIL-23R-Y416F-Y504F-Y542FΔ571 (D9). Daraus lässt sich vermuten, dass die Bindestelle vor Position 503 liegt und dass der erste intrazellulär gelegene Tyrosinrest an Stelle 416 für die Bindung nicht notwendig ist. Anhand dieser Ergebnisse kann eine genauere Bestimmung der Bindestelle in anschließenden Arbeiten erfolgen.

3.7 CIB2 beeinflusst die IL-23 abhängige STAT3 Phosphporylierung

Der Einfluss von CIB2 auf die IL-23 Signaltransduktion wurde in einem Modell aus Ba/F3-gp130 Zellen untersucht. Das Generieren stabiler Ba/F3-gp130 Zellen, die beide Untereinheiten des humanen oder murinen IL-23 Rezeptors sowie CIB2-GFP exprimieren verlief analog zu dem in Punkt 3.2 beschriebenen Verfahren. Abb. 27 zeigt schematisch die Reihenfolge der retroviralen Transduktionen (s. 2.3.4) für Zellen mit den humanen Rezeptoren. Das Verfahren für Zellen mit murinen Rezeptoren verlief identisch.

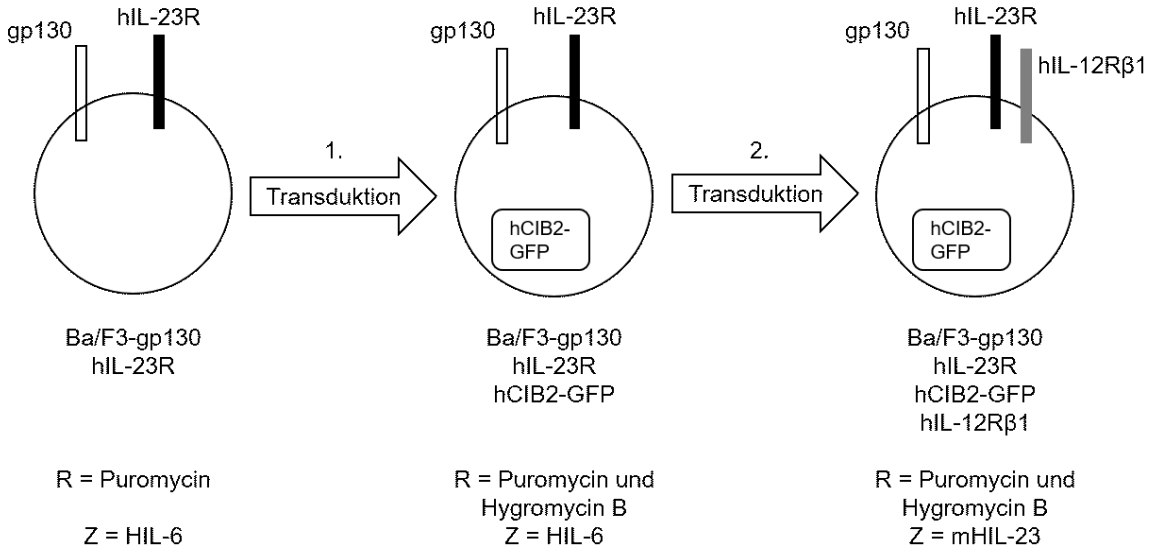


Abb. 27: Retrovirale Transduktionen zur Erzeugung von IL-23 responsiven Ba/F3-gp130 Zellem mit Expression von hCIB2-GFP
Ba/F3-gp130 Zellen wurden in Vorarbeit der Arbeitsgruppe mit pMOWS-puro-hIL-23R versehen und durch Zugabe von Puromycin selektiert (18). Anschließend wurde das generierte Plasmid pMOWS-hygro-hCIB2-GFP mittels retroviraler Transduktion eingebracht (1. Transduktion) und die Zellen mit einer Kombination aus Hygromycin B und Puromycin selektiert. Danach wurde das Plasmid pMOWS-hygro-hIL-12Rβ1 eingebracht (2. Transduktion). Nach dem letzten Schritt erfolgte die Selektion über Zugabe von mHIL-23 anstelle von HIL-6, da nun beide Untereinheiten des IL-23 Rezeptors exprimiert wurden. Die murinen Rezeptoren wurden in derselben Reihenfolge und mit denselben Resistenzgenen eingebracht. Weiß: gp130, Grau: hIL-12Rβ1, Schwarz: hIL-23R, R: Resistenz, Z: Zytokin

Die Oberflächenexpression der Rezeptoren und die Expression von GFP wurde mittels Durchflusszytometrie (s. 2.3.5) bestätigt. Abb. 28 zeigt das Ergebnis.

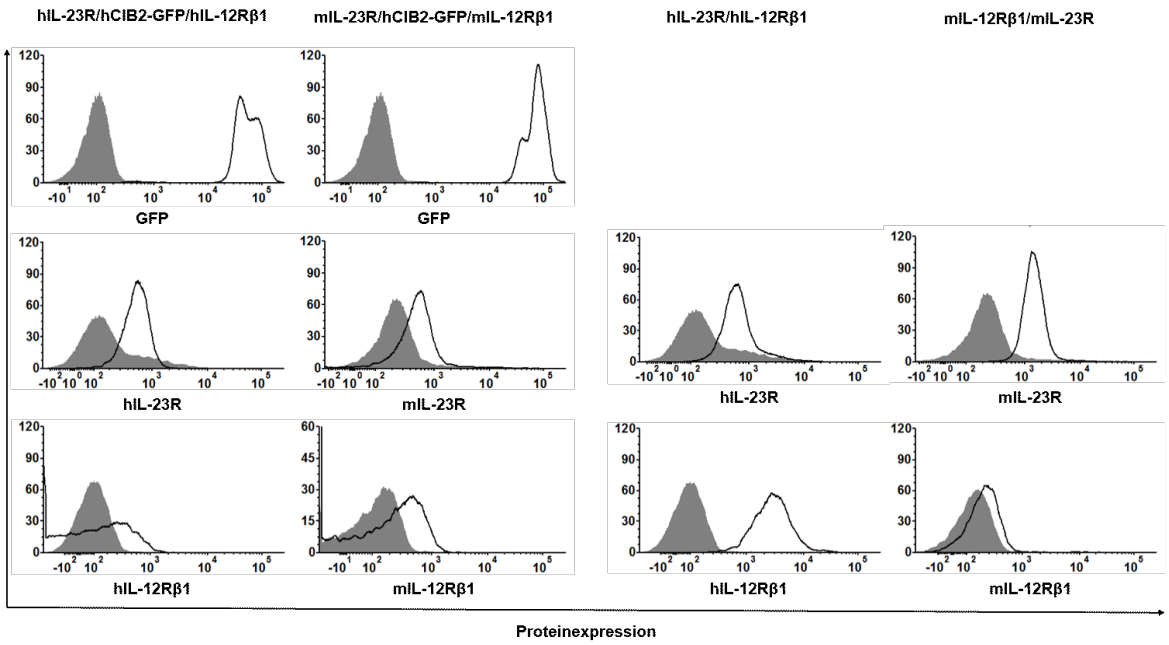


Abb. 28: Analyse der Oberflächenexpression von IL-23 Rezeptoren sowie von hCIB2-GFP bei retroviral transduzierten Ba/F3-gp130 Zelllinien
Auf der x-Achse ist die Fluoreszenzintensität abgebildet. Sie ist ein Maß für die Intensität der Rezeptorexpression an der Zelloberfläche. Die y-Achse repräsentiert die Anzahl gemessener Zellen. In grau dargestellt sind die Ergebnisse der Negativkontrolle (Ba/F3-gp130). Die weiß hinterlegten Histogramme stellen die Ergebnisse der generierten Zelllinien Ba/F3-gp130/hIL-23R/hCIB2-GFP/hIL-12Rβ1 und Ba/F3-gp130/mIL-23R/hCIB2-GFP/mIL-12Rβ1 bzw. der bereits vorhandenen Zelllinie Ba/F3-gp130/hIL-23R/hIL-12Rβ1 und Ba/F3-gp130/mIL-12Rβ1/ mIL-23R dar. Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit rezeptorspezifischen Antikörpern gefärbt und über Fluorophore analysiert.

Anschließend wurde die STAT3 Phosphorylierung in Abhängigkeit steigender IL-23 Konzentration in den generierten Zelllinien untersucht (s. 2.3.7) und mit der STAT3 Phosphorylierung in Zellen mit heterodimerem IL-23 Rezeptor (human oder murin) ohne hCIB2-GFP verglichen. Abb. 29 zeigt das Ergebnis des Western Blots (s.2.4.3).

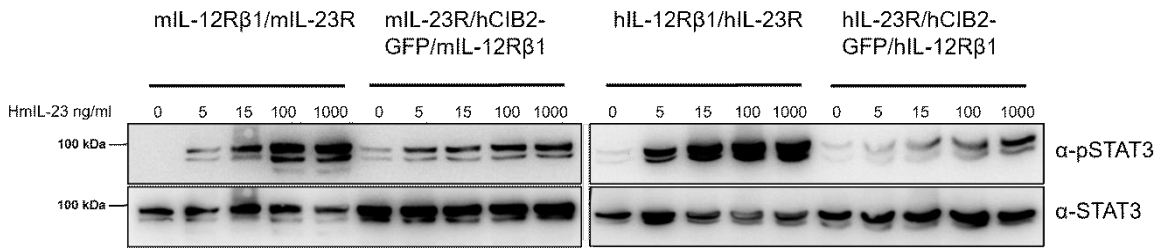


Abb. 29: Phosphorylierung von STAT3 in IL-23 responsiven Ba/F3-gp130 Zelllinien nach Zytokinstimulation
Ba/F3-gp130 Zelllinien wurden gewaschen, 4 h in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend mit steigenden Konzentrationen von mHIL-23 für 30 min stimuliert. Zelllysate wurden hergestellt und 50 µg Gesamtprotein pro Spur des SDS-Gels geladen. STAT3 und pSTAT3 wurden mittels Antikörper detektiert. Ein repräsentatives Ergebnis von n=3 ist abgebildet. Das Molekulargewicht von STAT3 beträgt 88 kDa. Als Molekulargewichtsmarker wurde *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. kDa: Kilodalton

mHIL-23 Konzentrationen von 0 bis 1000 ng/ml wurden zur Stimulation verwendet. Die Primärantikörper richteten sich gegen STAT3 und phosphoryliertes STAT3 (pSTAT3). Keine der vier Zelllinien zeigt eine Phosphorylierung von STAT3 ohne Zytokinzugabe. In Zellen, die nur den heterodimeren IL-23 Rezeptor exprimieren (mIL-12Rβ1/mIL-23R und hIL-12Rβ1/hIL-23R), lässt sich bei allen Konzentrationen ein stärkeres Signal für pSTAT3 detektieren, als in den Zelllinien mit hCIB2-GFP. Die Intensität der STAT3 Phosphorylierung nimmt mit steigender Zytokinkonzentration zu. Somit kann eine hemmende Wirkung von hCIB2-GFP auf die IL-23 abhängige STAT3 Phosphorylierung im Ba/F3-gp130 Zellmodell gezeigt werden. Alle untersuchten Zelllinien zeigen eine vergleichbare STAT3 Expression, sodass Unterschiede in der Phosphorylierung von STAT3 nicht von einer verminderten Expression des Proteins verursacht werden.

3.8 CIB2 beeinflusst die IL-23 abhängige Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen

Das IL-6 und IL-23 abhängige Proliferationsverhalten der Ba/F3-gp130 Zellen mit humanen oder murinen heterodimeren IL-23 Rezeptoren wurde mit dem Proliferationsverhalten von Zellen, die zusätzlich CIB2-GFP exprimieren verglichen. Zunächst wurde bestätigt, dass die Zellen regelrecht in Abhängigkeit von IL-23 proliferieren. Hierfür wurden Proliferationsassays (s. 2.3.6) in den Ba/F3-gp130 Zelllinien mIL-12Rβ1/mIL-23R, hIL-12Rβ1/hIL-23R, hIL-23R/hCIB2-GFP/hIL-12Rβ1 und mIL-23R/hCIB2-GFP/mIL-12Rβ1 ohne Zytokinzuatz, unter Zugabe von 7,8 ng/ml HIL-6 und unter Zugabe von 7,8 ng/ml mHIL-23 durchgeführt und miteinander verglichen. Abb. ***30*** zeigt das Ergebnis.

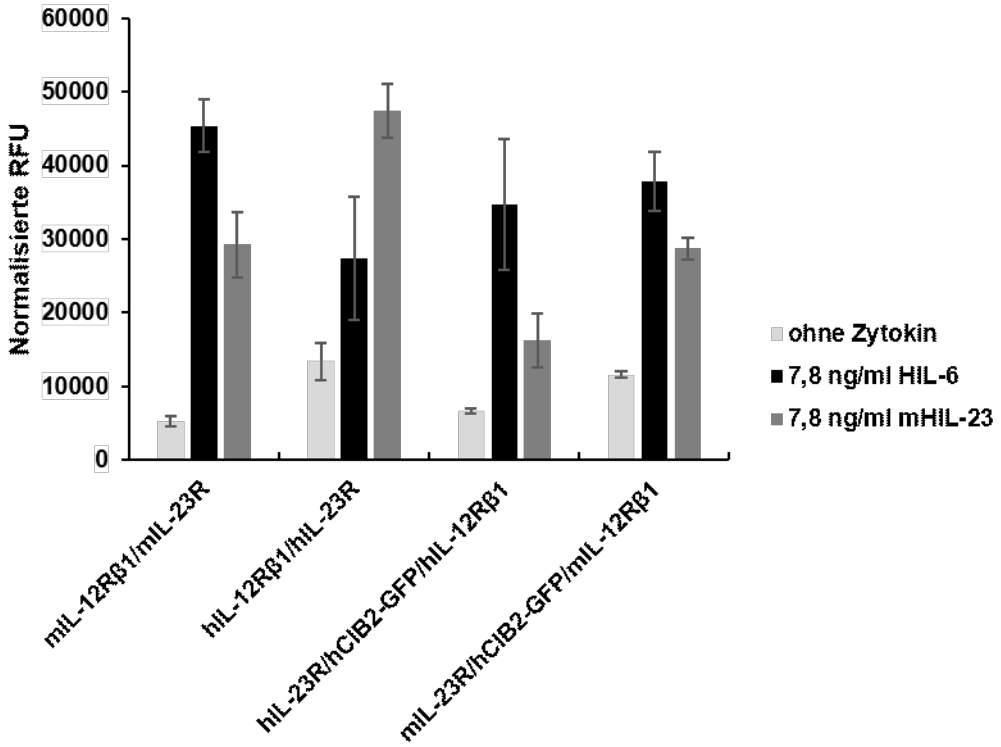


Abb. 30: Ba/F3-gp130 Zellen, die hCIB2-GFP zusätzlich zum murinen oder humanen IL-23 Rezeptor exprimieren, proliferieren IL-23 abhängig
Die Proliferation verschiedener Ba/F3-gp130 Zelllinien (x-Achse) wurde ohne Zytokin, in Abhängigkeit von IL-6 und in Abhängigkeit von IL-23 untersucht.
RFU: *relative fluorescence unit*

Auf der y-Achse ist die Intensität der Proliferation in RFU (*relative fluorescencet units*) angegeben und auf der x-Achse die untersuchten Zelllinien. Ohne Zytokinzusatz (hellgrau) zeigt keine Zelllinie eine Proliferation. Unter Zugabe von HIL-6 oder mHIL-23 zeigen alle Zelllinien eine vergleichbar starke Proliferation, wobei die IL-23 abhängige Proliferation von Ba/F3-gp130/hIL-23R/hCIB2-GFP/hIL-12Rβ1 etwas schwächer ausfällt. Die Ergebnisse zeigen, dass durch das Einbringen des Fusionsproteins CIB2-GFP in Ba/F3-gp130 Zellen mit heterodimerem humanem bzw. murinem IL-23 Rezeptor keine konstitutiv aktive IL-23 Signaltransduktion ausgelöst wird und dass die regelrechte zytokinabhängige Proliferation nicht unterbunden wird.

Anschließend wurde das Proliferationsverhalten in Abhängigkeit von steigenden Zytokinkonzentrationen in den oben genannten Zelllinien untersucht (s. 2.3.6). Abb. 31 zeigt das Ergebnis nach Stimulation mit steigenden Konzentrationen von HIL-6.

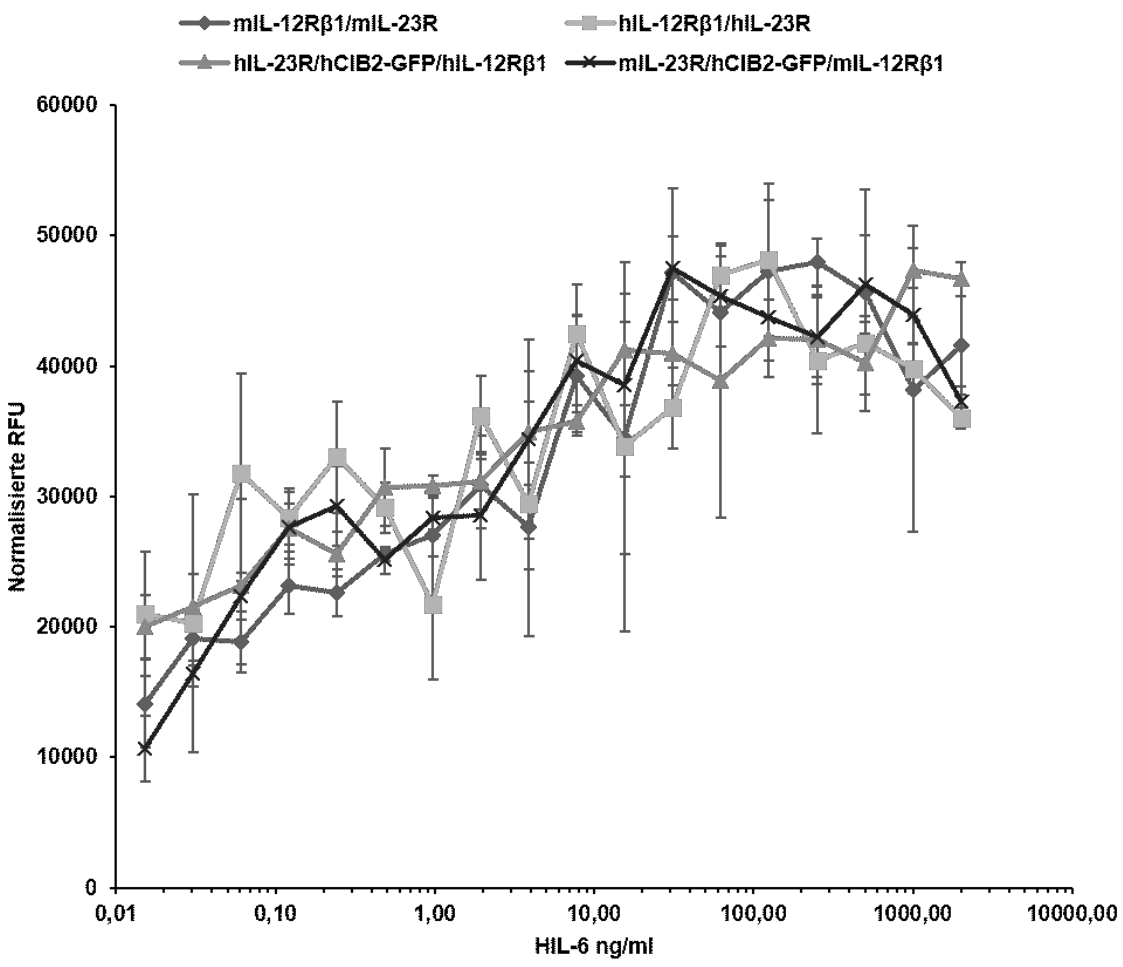


Abb. 31: CIB2-GFP führt zu keiner Veränderung der HIL-6 abhängigen Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen, mit humanen oder murinen IL-23 Rezeptoren
Ba/F3-gp130 Zelllinien wurden mit steigenden Konzentrationen (0 – 2000 ng/ml) HIL-6 kultiviert. Nach Zugabe des *Cell Titer Blue*® Reagenzes erfolgte die Fluoreszenzmessung, die ein Maß für die Proliferation der Zelllinie ist. Ein repräsentatives Ergebnis von n=3 ist abgebildet.
RFU: *relative fluorescence unit*

Im Proliferationsverhalten bei steigenden Konzentrationen von HIL-6 wurde kein Unterschied nachgewiesen. Wie erwartet, zeigt sich eine Zunahme der Zellproliferation bei steigenden Zytokinkonzentrationen. Dies lässt vermuten, dass die IL-6 Signaltransduktion durch das Fusionsprotein CIB2-GFP nicht beeinflusst wird.

Derselbe Versuch wurde mit mHIL-23 durchgeführt. Abb. 32 zeigt das Ergebnis für Zellen mit den humanen Rezeptoren.

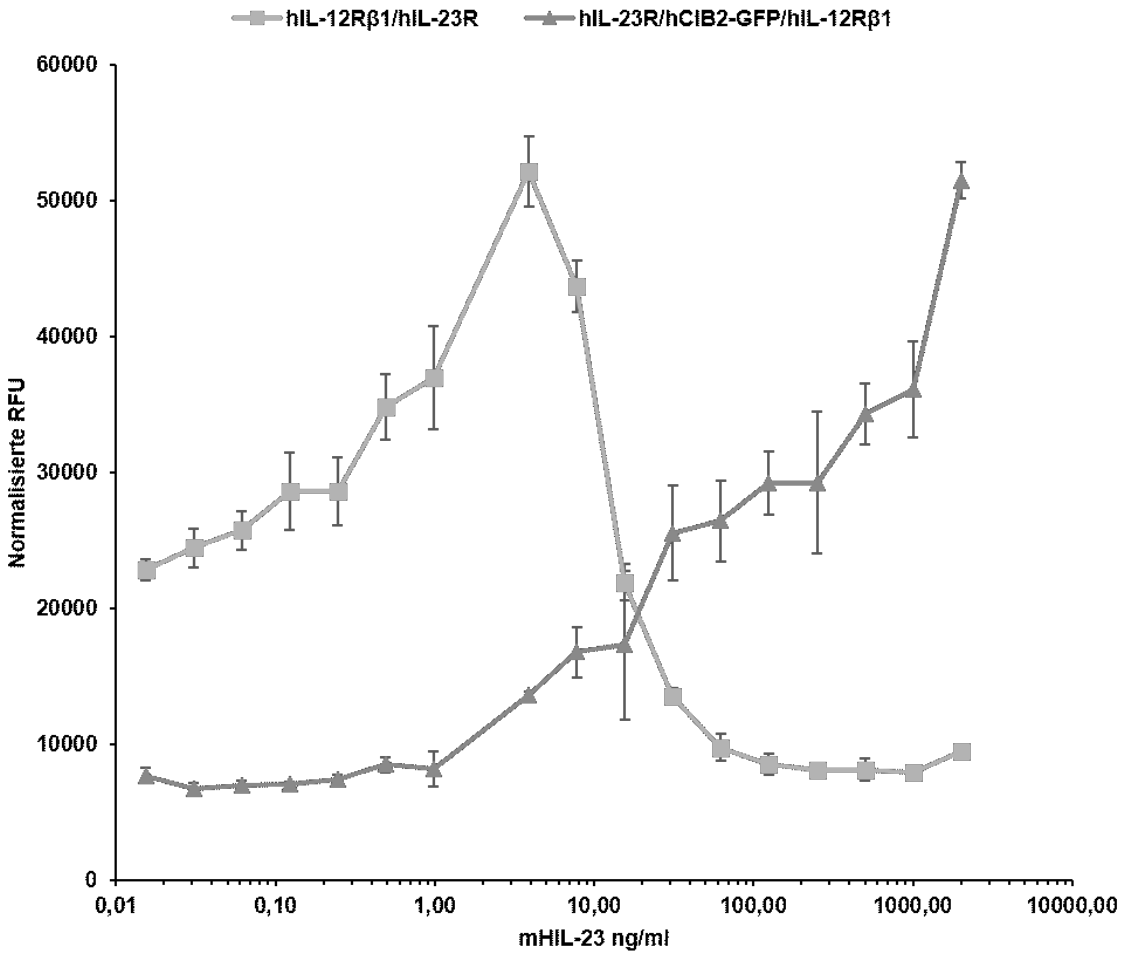


Abb. 32: CIB2-GFP führt zu einer Veränderung der IL-23 abhängigen Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen mit humanem heterodimerem IL-23 Rezeptor
Ba/F3-gp130 Zelllinien wurden mit steigenden Konzentrationen (0 – 2000 ng/ml) mHIL-23 kultiviert. Nach Zugabe des *Cell Titer Blue*® Reagenzes erfolgte die Fluoreszenzmessung, die ein Maß für die Proliferation der Zelllinie ist. Ein repräsentatives Ergebnis von n=4 ist abgebildet.
RFU: *relative fluorescence unit*

Auf der y-Achse ist die Fluoreszenz in RFU angegeben und auf der x-Achse die steigenden mHIL-23 Konzentrationen. Bei steigenden Konzentrationen von mHIL-23 lässt sich der bereits in Punkt 3.4 beschriebene Effekt beobachten; Zellen mit dem humanen IL-23 Rezeptor zeigen einen Abbruch der Proliferation unter hohen Konzentrationen von IL-23 (> 10 ng/ml). Durch zusätzliche Expression von CIB2-GFP in Zellen mit humanen Rezeptoren werden jedoch höhere IL-23 Konzentrationen benötigt, um das Niveau der Proliferation von Zellen ohne CIB2-GFP zu erreichen. Unter den gemessenen Konzentrationen lässt sich kein Abbruch der Proliferation von Ba/F3-gp130/hIL-23R/hCIB2-GFP/hIL-12Rβ1 erkennen.

In Abb. 33 ist das Ergebnis desselben Versuchs in Zellen mit murinen Rezeptoren abgebildet.

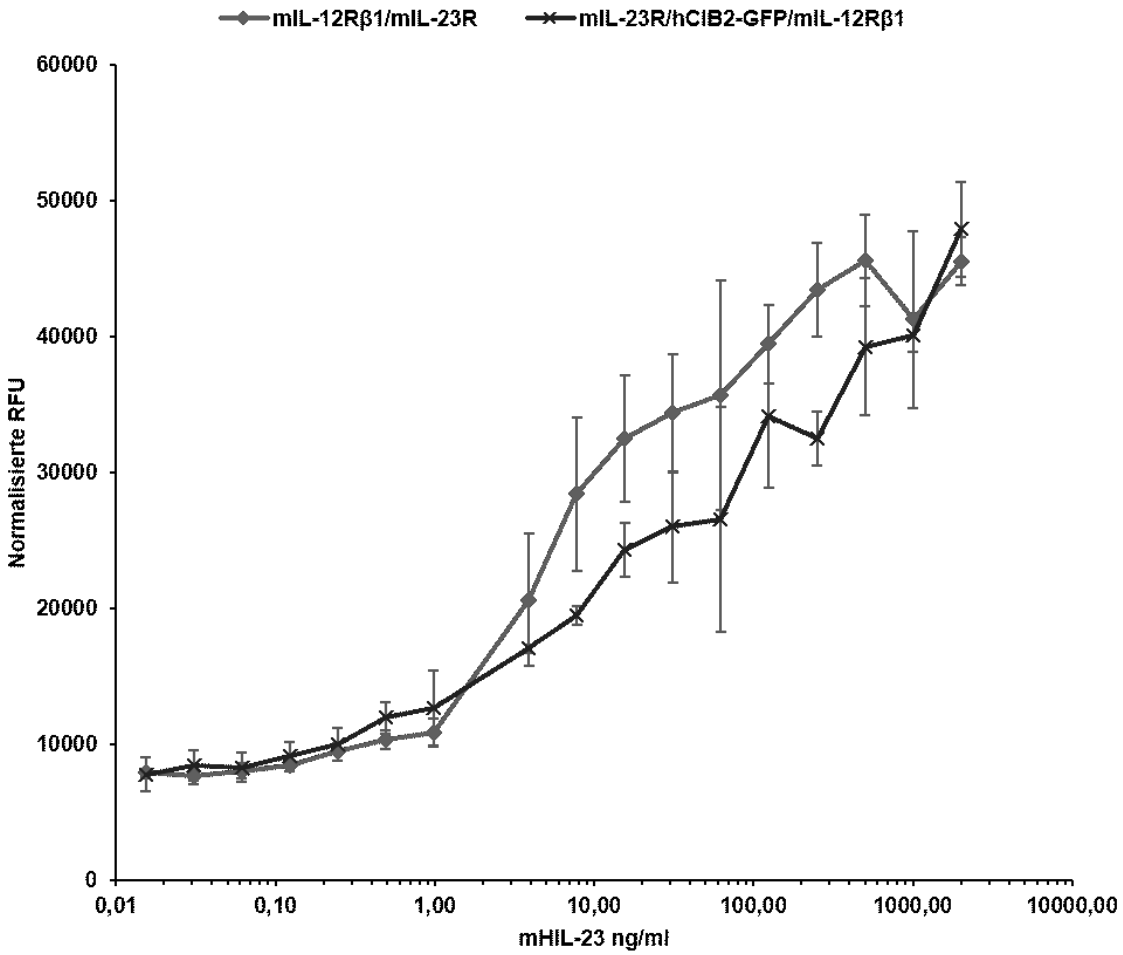


Abb. 33: CIB2-GFP führt zu einer Veränderung der IL-23 abhängigen Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen mit murinem heterodimerem IL-23 Rezeptor
Ba/F3-gp130 Zelllinien wurden mit steigenden Konzentrationen (0 – 2000 ng/ml) mHIL-23 kultiviert. Nach Zugabe des *Cell Titer Blue®* Reagenzes erfolgte die Fluoreszenzmessung, die ein Maß für die Proliferation der Zelllinie ist. Ein repräsentatives Ergebnis von n=4 ist abgebildet.
RFU: *relative fluorescence unit*

Die Expression von CIB2-GFP in Zellen mit murinen Rezeptoren führt ebenfalls zu einer Änderung der IL-23 abhängigen Proliferation. In den Zellen, die CIB2-GFP exprimieren, fällt eine zunächst reduzierte Proliferation auf, die sich unter den höchsten gemessenen Konzentrationen wieder angleicht. Für Zellen, die das Fusionsprotein nicht exprimieren, liegt die EC50 bei 7,1 ng/ml, wohingegen sie mit 100,8 ng/ml bei Zellen, die zusätzlich CIB2-GFP exprimieren, deutlich höher liegt. Die EC50 wurde mithilfe des EC50*calculator* von AAT Bioquest (www.aatbio.com) berechnet.

3.9 Klonierung des Expressionsvektors p409-hIL-23R-mCherry zur Anwendung in der Fluoreszenzmikroskopie

Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Interaktion von CIB2 und dem IL-23R wurden beide Proteine mit verschiedenen Fluoreszenzproteinen fusioniert. In pcDNA3.1-hCIB2-GFP ist CIB2 bereits mit GFP fusioniert. Der IL-23R wurde mit dem rot fluoreszierenden Protein mCherry verbunden. Abb. 34 zeigt schematisch den Ablauf der Klonierung für den Expressionsvektor pCR-Script-mCherry-w/o-M. Das Methionin wurde durch eine PCR entfernt.

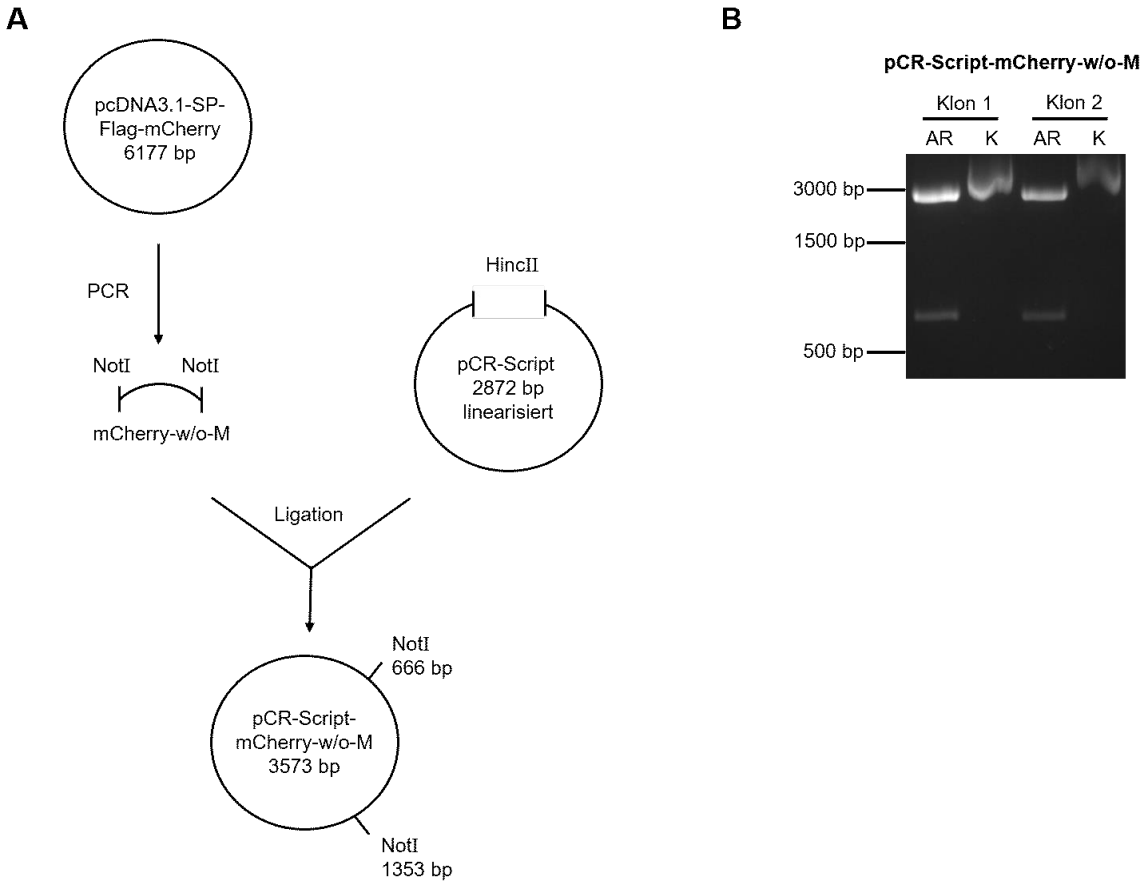


Abb. 34: Schematische Übersicht zur Klonierung des Expressionsvektors pCR-Script-mCherry-w/o-M
A: Klonierungsschema
Als Ausgangsplasmid diente pcDNA3.1-SP-Flag-mCherry. Unter Verwendung der *primer* DF473 und DF468 wurde das für mCherry kodierende DNA-Fragment amplifiziert und anschließend in den mit HincII linearisierten und dephosphorylierten Vektor pCR-Script ligiert.
B: Agarosegelelektrophorese der Restriktionsprodukte pCR-Script-mCherry-w/o-M
Nach Isolation der Plasmid-DNA mittels Midi-Präparation, wurde eine Restriktionsanalyse mit NotI durchgeführt und mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Die erwarteten Fragmente sollten eine Größe von 687 bp und 2886 bp aufweisen. Als Kontrolle diente nicht geschnittene Plasmid-DNA. AR: analytische Restriktionsspaltung, K: Kontrolle (ungeschnittenes Plasmid) bp: Basenpaare, Marker (*Express DNA Ladder 100-5000 bp*, Thermo Scientific)

Zunächst wurde in einer PCR (s. 2.2.2) das DNA-Fragment, das für mCherry kodiert, amplifiziert. Als *template* diente pcDNA3.1-SP-Flag-mCherry und es wurden die *primer*

DF473 und DF468 verwendet. Das PCR-Produkt wurde phosphoryliert (s. 2.2.7) und nach elektrophoretischer Trennung im Agarosegel mittels Gelextraktion (s. 2.2.4) isoliert. Anschließend wurde es in den mit HincII linearisierten Vektor pCR-Script ligiert (s. 2.2.9). Das Ligationsprodukt pCR-Script-mCherry-w/o-M wurde in chemisch kompetente *E.coli XL-1 Blue* Zellen transformiert (s. 2.2.1) und Bakterienklone unter Verwendung der *primer* DF38 und DF39 in einer *colony*-PCR (s. 2.2.2) analysiert. Putativ positive Klone wurden für eine Mini-Präparation (s. 2.2.10) verwendet und im Anschluss einer analytischen Restriktionsspaltung mit NotI unterzogen. Proben, die in der Gelektrophorese (s. 2.2.3) nach Restriktionsspaltung Signale bei 2886 bp und 687 bp zeigten, wurden für eine Midi-Präparation (s. 2.2.10) weiterverwendet. Die abschließende Restriktionsanalyse erfolgte ebenfalls mit NotI (s. Abb. 34B).

Im nächsten Schritt (s. Abb. 35) wurde das DNA-Fragment, das für mCherry kodiert, aus dem Plasmid pCR-Script-mCherry-w/o-M in den Vektor p409-hIL-23R integriert, sodass das neue Plasmid p409-hIL-23R-mCherry für ein Fusionsprotein aus hIL-23R und mCherry kodiert. Hierfür wurde zunächst das *insert* durch eine präparative Restriktionsspaltung (s. 2.2.5) mit NotI aus pCR-Script-mCherry-w/o-M geschnitten. Das 687 bp große Fragment wurde mittels Gelextraktion isoliert. Der Vektor p409-hIL-23R-P310 wurde durch Restriktionsspaltung mit NotI linearisiert, dephosphoryliert (s. 2.2.8) und mittels Gelextraktion isoliert. Nach erfolgter Ligation und Transformation erfolgte zur Selektion positiver Bakterienklone eine *colony* PCR. Positive Klone wurden für eine Midi-Präparation verwendet und abschließend zur Kontrolle mit EcoRV restriktionsanalysiert. Das Ergebnis nach Gelektrophorese (s. 2.2.3) zeigt Abb. 35B.

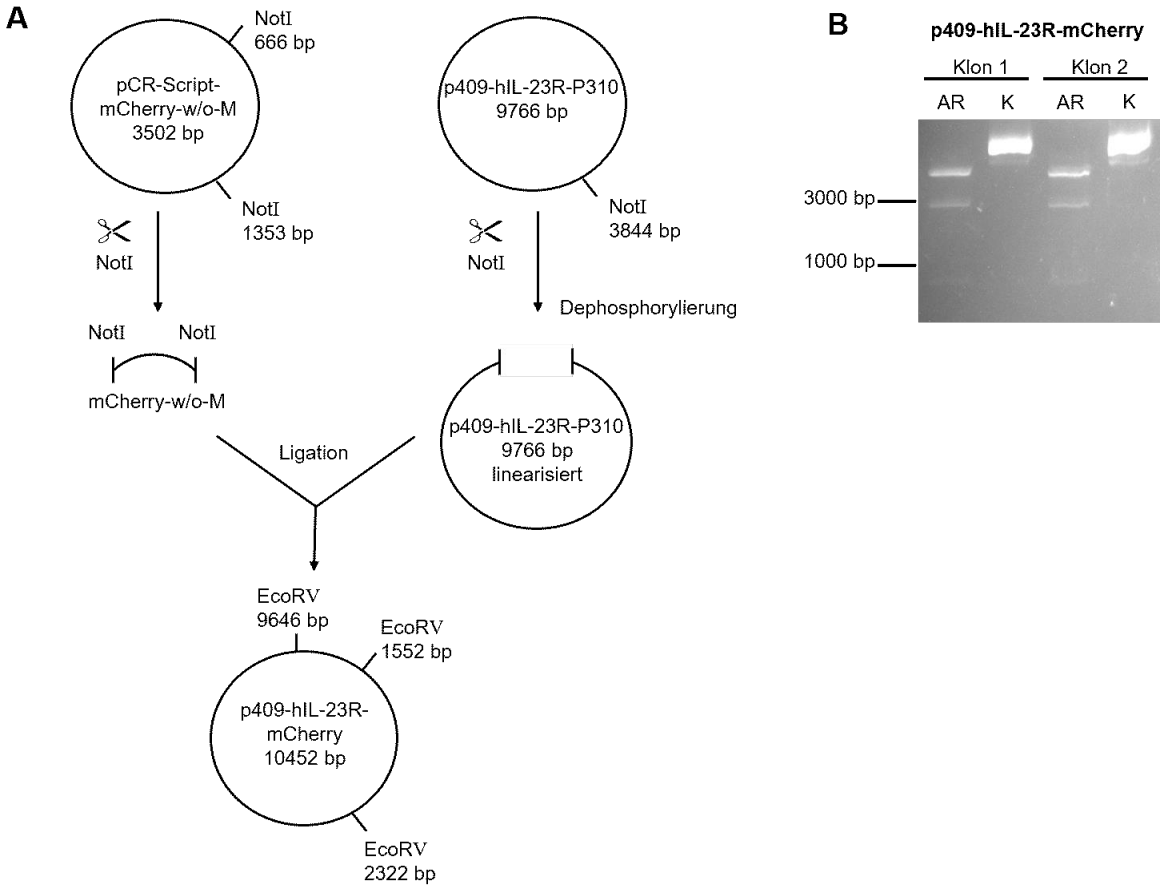


Abb. 35: Schematische Übersicht zur Klonierung des Expressionsvektors p409-hIL-23R-mCherry
A: Klonierungsschema
In einer Restriktionsspaltung mit NotI wurde das für mCherry kodierende Fragment aus dem Plasmid pCR-Script-mCherry-w/o-M geschnitten. Das Plasmid p409-hIL-23R-P310 wurde mit NotI linearisiert, dephosphoryliert und diente als Vektor für die Ligation.
B: Agarosegelelektrophorese der Midi-Präparation Produkte p409-hIL-23R-mCherry
Nach Isolation der Plasmid-DNA mittels Midi-Präparation, wurde eine Restriktionsanalyse mit EcoRV durchgeführt und mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Die erwarteten Fragmente sollten eine Größe von 770 bp, 2358 bp und 7324 bp aufweisen. Als Kontrolle diente nicht geschnittene Plasmid-DNA. AR: analytische Restriktionsspaltung, K: Kontrolle (ungeschnittenes Plasmid), bp: Basenpaare, Marker (*Express DNA Ladder 100-5000 bp*, Thermo Scientific)

Als Kontrolle (mit „K“ markiert) wurde ungeschnittene Plasmid-DNA verwendet. Beide Klone zeigen das erwartete Restriktionsmuster mit Signalen bei 631 bp (schwach), 2358 bp und 7508 bp.

3.10 hCIB2 beeinflusst den intrazellulären Transport des hIL-23R

In transient transfizierten HeLa Zellen wurde die Interaktion von hCIB2 und hIL-23R unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Methode ist unter Punkt 2.3.8 beschrieben. Zellen, die nur mit p409-hIL-23R-mCherry transfiziert (s. 2.3.3) wurden, wurden mit Zellen verglichen, die zusätzlich mit pcDNA3.1-hCIB2-GFP transfiziert wurden. Durch kontrollierte Färbung von α-Tubulin wurde das Zytoskelett dargestellt. Durch die Fluoreszenzproteine GFP (grün) und mCherry (rot) konnten hCIB2-GFP und hIL-23R-mCherry visualisiert werden.

Zunächst wurden die Signale für das Zytoskelett, GFP (hCIB2) und mCherry (hIL-23R) einzeln aufgenommen und anschließend die Signale für GFP und mCherry übereinander gelegt (*merge*) (s. Abb. 36).

Abb. 36: Ko-Lokalisation des humanen IL-23 Rezeptors und CIB2 in transient transfizierten HeLa Zellen
HeLa Zellen wurden mit p409-hIL-23R-mCherry und pcDNA3.1-hCIB2-GFP transient transfiziert und wurden vier Tage nach der Transfektion analysiert. Der Nachweis des IL-23R erfolgte durch mCherry, wohingegen hCIB2 mit GFP markiert war. Als Negativkontrolle wurden HeLa Zellen, die nur mit einem der beiden Plasmide transfiziert wurden verwendet.

Dadurch gelingt eine Darstellung der Verteilung des hIL-23R und hCIB2 in der Zelle. Die Ergebnisse zeigen, dass Zellen, die nur mit der cDNA für den hIL-23R transfiziert wurden, diesen entlang der Zelloberfläche exprimieren (Abb. 36, rechte Seite). Wird zusätzlich hCIB2-GFP in die Zellen eingebracht, lässt sich dieses im Inneren der Zelle finden. Der hIL-23R findet sich in diesen Zellen zusammen mit hCIB2 im Zellinneren und nicht verteilt an der Zelloberfläche. Dies zeigt, dass hCIB2-GFP die Oberflächenexpression des

hIL-23-mCherry Rezeptors in HeLa Zellen vermindert. Die Ursache dafür kann in diesen Versuchen nicht dargestellt werden.

4 Diskussion

4.1 SOCS3 inhibiert nicht die IL-23 abhängige STAT3 Phosphorylierung

Klasse I/II Zytokine nutzen den JAK/STAT Signalweg in ihrer Signaltransduktion (103). Proteine der SOCS Familie werden über diesen Signalweg induziert und wurden als wichtiger Inhibitor der JAK/STAT Signalkaskade identifiziert (72). Innerheralb dieser Proteinfamilie wurde SOCS3 als starker Inhibitor der IL-6 Signaltransduktion identifiziert (78). Die IL-23 Signaltransduktion läuft maßgeblich über den JAK/STAT Signalweg, der zu einer Phosphoylierung von STAT3, STAT1, STAT4 und STAT5 führt, wobei STAT3 der Hauptsignalgeber ist (6, 12, 23, 104). Eine Inhibition der IL-23 abhängigen STAT3 Phosphorylierung ließ sich in zwei unabhängigen Studien nicht nachweisen, während sie durch Chen *et al*. beschrieben wurde (26, 29, 96). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von SOCS3 auf die IL-23 abhängige STAT3 Phosphorylierung erneut untersucht. IL-23 induziert die Expression von SOCS3, jedoch führt dies nicht zu einer Inhibition der IL-23 abhängigen STAT3 Phosphorylierung (s. Abb. 14). Der Inhibitionsmechanismus von SOCS3 beruht unter anderem auf einem spezifischen Bindemotiv im Rezeptor, das im IL-23R bisher nicht beschrieben ist (32). In dieser Arbeit wurde das SOCS3 Bindemotiv aus gp130 erfolgreich um das Tyrosin 476 (Y476) im humanen IL-23R kloniert. Das Bindemotiv „VE(pY)STVVH“ aus gp130 wurde hierfür gewählt, da hier eine besonders starke Affinität zu SOCS3 nachgewiesen wurde (28, 79). Unter Verwendung der erzeugten Rezeptorvariante wurde ebenfalls keine Inhbition der IL-23 abhängigen STAT3 Phosphorylierung beobachtet (s. Abb. 15). Somit ist das Einfügen des SOCS3 Bindemotivs an beschriebener Stelle im IL-23R für eine SOCS3 vermittelte Inhibition der JAK/STAT Signalkaskade nach Stimulation mit IL-23 nicht ausreichend.

Die IL-23 abhängige STAT3 Phosphorylierung verläuft kanonisch über Phosphotyrosine der intrazellulären Rezeptordomäne im IL-23R (26). Zusätzlich wurden im IL-23R Sequenzen identifiziert, die eine nicht kanonische STAT3 Phosphorylierung, die nicht abhängig von Phosphotyrosinen ist, ermöglichen (26). Hier wurde bereits von Floss *et al.* die Frage aufgeworfen, ob diese nicht kanonische STAT3 Aktivierung dazu beiträgt, dass die IL-23 Signaltransduktion keinem negativen *feedback* durch SOCS3 unterliegt (26).

Der Inhibitionsmechanismus von SOCS3 basiert auf der Formierung eines ternären Komplexes aus Rezeptor, SOCS3 und JAK2 (32). SOCS3 bindet dabei gleichzeitig an den

Rezeptor und JAK2 (105). Die Bindung an den Rezeptor erfolgt über die SH2-Domäne an die spezifische Bindesequenz (32). Diese liegt im murinen gp130 um das phosphorylierte Tyrosin 757 (human pY759) (32). Die Bindung an JAK2 verläuft anhand einer angrenzenden Oberfläche an das GQM Motif (Gly1071, Gln1072 and Met1073) von JAK2 (32, 105). JAK2 bindet über seine FERM und SH2-Domäne das Box 1 (I^{651}WPNVPDP human) und Box 2 (V^{691}SVVEIEANDKKP) Motiv von gp130, wobei das Box 2 Motiv für die Bindung nicht notwendig ist (s. Abb. 37) (106–108).

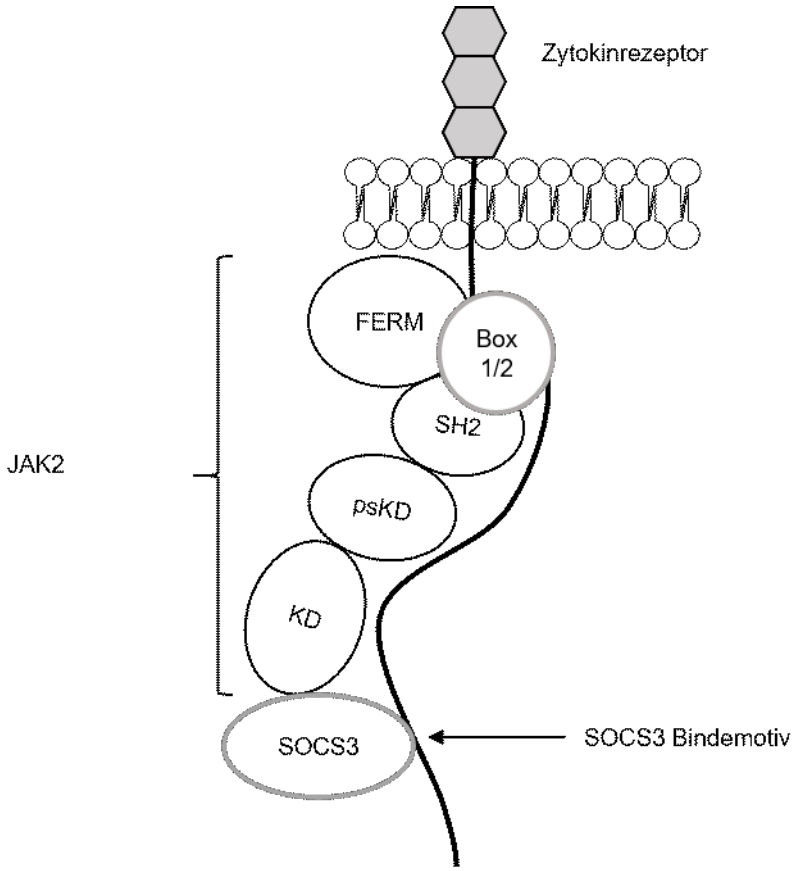


Abb. 37: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen JAK2, Zytokinrezeptor und SOCS3
JAK2 besteht aus vier Domänen (105, 108). Die Rezeptorassoziation erfolgt durch Interaktion zwischen der FERM Domäne und dem Box 1 Motiv sowie einer Interaktion zwischen SH2-Domäne und Box 2 Motiv (108). Die Pseudokinasedomäne (psKD) spielt eine Rolle in der Regulation der Kinasedomäne (KD) (109). Über die Kinasedomäne interagiert JAK2 mit SOCS3 (105).
SH2: SH2-Domäne, psKD: Pseudokinasedomäne, KD: Kinasedomäne
Abbildung modifiziert nach Kershaw *et al.* 2013 und Ferrao *et al.* 2018 (105, 110)

Box 1 und Box 2 Motive wurden im IL-23R bisher nicht identifiziert (24). JAK2 interagiert mit dem IL-23R über E455 bis E479 mit dem murinen IL-23R (24). Allerdings ist eine alleinige Bindung an den Rezeptor nicht ausreichend für eine Aktivierung von JAK2 (24). Hier ergibt sich die Frage, welche Auswirkung eine Bindung von JAK2, die nicht über die Box Motive verläuft, auf die Konformation von JAK2 hat und ob JAK2 den IL-23R ebenfalls

über die FERM und SH2-Domäne bindet. Eine Rezeptorassoziation über eine andere Domäne von JAK2 oder eine andere Konformität nach Rezeptorassoziation könnte erklären, warum die IL-23 vermittelte STAT3 Phosphorylierung keinem negativen *feedback* durch SOCS3 unterliegt. Im Gegensatz zum IL-23R finden sich Box 1 und Box 2 Motive im IL-12Rβ1 (24). Die Versuche sollten nach Einbringen des SOCS3 Bindemotivs in den IL-12Rβ1 wiederholt werden. Möglicherweise ist eine SOCS3 Bindestelle in beiden Rezeptoruntereinheiten notwendig. Die negative Rückkopplung durch SOCS3 scheint der primäre Inhibitionsmechanismus von IL-6 zu sein, dessen Signaltransduktion durch dimerisierte gp130 Moleküle vermittelt wird (28, 111). Dementsprechend könnte die Bindesequenz wie erwähnt in den IL-12Rβ1 eingebracht werden oder ein Homodimer aus IL-23R mit eingebrachtem SOCS3 Bindemotiv verwendet werden.

Die postulierte JAK2 Bindesequenz im humanen IL-23R liegt zwischen I384 bis E398 (102). Zwischen der postulierten Bindesequenz für JAK2 (I384 – E398) und dem im Rahmen dieser Arbeit eingebrachten SOCS3 Bindemotiv (V474 – H481) liegen 76 Aminosäuren. Im humanen gp130 liegen zwischen dem für die Bindung von JAK2 essentiellem Box 1 Motiv (I651 – P658) und dem SOCS3 Bindemotiv (V757 - H764) 99 Aminosäuren (32). Abb. 38 zeigt das *alignment* der Transmembrandomäne und der intrazellulären Domäne von gp130 und dem in dieser Arbeit generierten hIL-23R mit dem SOCS3 Bindemotiv aus gp130.

```
hIL-23R-VQ476STVVH   LLLGMIVFAVMLSIISLIGIFNRSFRTGIKRRILLLIPKWLYEDIPNMKNSNVVKMLQEN   415
gp130                AIVVPVCLAFLLTTLLGVLFCFNKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSK   680

hIL-23R-VQ476STVVH   SELMNNNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTGPLETRDYPQNSLFDNTTVQ   475
gp130                DQMYSDGNFTDVSVVEIEANDKKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRP   740

hIL-23R-VQ476STVVH   YSTVVHTGYKPQISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPPVDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVS   535
Gp130                SISSSDENESSQNTSSTVQYSTVVHSGYRHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLV   800

hIL-23R-VQ476STVVH   SVNSLSNTIFLGELSLILNQGECSSPDIQNSVEEETTMLLENDSPSETIPEQTLLPDEFV   595
gp130                DHVDGGDGILPRQQYFKQNCSQHESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQS   860

hIL-23R-VQ476STVVH   SCLGIVNEELPSINTYFPQNILESHFNRISLLEK                            629
gp130                CGSGQMKMFQEVSAADAFGPGTEGQVERFETVGMEAATDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQ   918
```

Abb. 38: Alignment des hIL-23R mit SOCS3 Bindemotiv und gp130
gelbe Markierung: Transmembrandomäne, grüne Markierung: postulierte JAK2 Bindesequenz, blaue Markierung: Box 1 Motiv, rote Markierung: SOCS3 Bindemotiv, Zahlen am rechten Bildrand geben die Anzahl/Position der Aminosäuren an (32, 102)
Das *alignment* wurde mit Clustal Omega erstellt.

Der Abstand der SOCS3 Bindesequenz und dem Box 1 variiert in anderen Zytokinrezeptoren, die am stärksten durch SOCS3 inhibiert werden, ebenfalls (32). In Abb. ***39*** sind die Intrazellulärdomänen dieser Rezeptoren mit den jeweiligen Box 1 Motiven und SOCS3 Bindestellen dargestellt. Zum Vergleich ist die generierte Rezeptorvariante

hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH ebenfalls abgebildet. Um die Abstände zwischen den jeweiligen Domänen zu visualiseren, wurde für jede Aminosäure zwischen den Motiven eine konstante Längeneinheit verwendet.

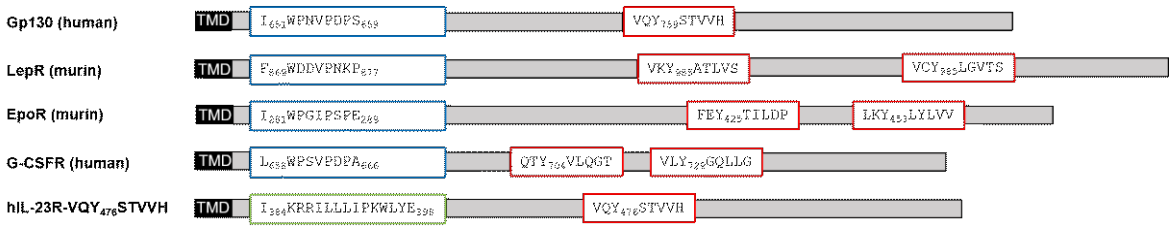


Abb. 39: Schematische Darstellung der Box 1 Motive und SOCS3 Bindestellen in den Zytokinrezeptoren, die am stärksten durch SOCS3 inhibiert werden
Zur Visualisierung der Abstände zwischen dem Box 1 Motiv und den jeweiligen SOCS3 Bindestellen wurde eine konstante Längeneinheit pro Aminosäure verwendet. Die im Rahmen dieser Arbeit generierte Variante des hIL-23R wurde vergleichend gegenübergestellt. Anstelle eines Box 1 Motivs wurde im hIL-23R die postulierte JAK2 Bindestelle hervorgehoben.
TMD: Transmembrandomäne, Blau: Box 1 Motiv, rot: SOCS3 Bindestelle, grün: postulierte JAK2 Bindestelle

Es finden sich im murinen Leptin Rezeptor (LepR) zwei Bindesequenzen für SOCS3, die 106 bzw. 198 Aminosäuren vom Box 1 Motiv entfernt liegen (32). Im murinen Erythropoetin Rezeptor (EpoR) gibt es ebenfalls zwei SOCS3 Bindesequenzen, die 134 bzw. 162 Aminosäuren vom Box 1 Motiv entfernt liegen (32). Im humanen *granulocyte-colony stimulating factor* Rezeptor (G-CSFR) liegen 36 bzw. 61 Aminosäuren zwischen dem Box 1 Motiv und den beiden SOCS3 Bindemotiven (32). Somit ist der Abstand zwischen der postulierten JAK2 Bindestelle im humanen IL-23R und der SOCS3 Bindeseuqenz im erschaffenen Rezeptor hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH in einem Bereich, der eine gleichzeitige Bindung von SOCS3 an JAK2 und den Rezeptor nicht verhindern sollte. Hierbei ist anzumerken, dass die JAK2 Bindestelle im humanen IL-23R bisher nicht bestätitgt wurde und möglicherweise näher oder weiter entfernt vom eingebrachten SOCS3 Bindemotiv liegt, sodass die Formierung des ternären Komplexes ggf. aus diesem Grund nicht möglich ist (24, 102).

4.2 Hohe IL-23 Konzentrationen inhibieren die Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen mit humanem IL-23 Rezeptor

Nach erfolgreicher retroviraler Transduktion (s. 2.3.4) von Ba/F3-gp130 Zellen mit dem humanen oder murinen, heterodimeren IL-23 Rezeptor, fiel in konzentrationsabhängigen Proliferationsassays unter Verwendung von mHIL-23 auf, dass das Niveau der Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen, die die humanen Rezeptoren exprimieren, ab einer Zytokinkonzentration von 10 ng/ml unter das Ausgangsniveau fällt (s. Abb. 17). Dieser

Effekt ließ sich in den Zellen mit murinen Rezeptoren nicht beobachten (s. Abb. 32). Durch Einfügen der SOCS3 Bindesequenz um Y476 des humanen IL-23R kam es überraschenderweise unter den gemessenen Konzentrationen zu keinem Abfall des Proliferationsniveaus (s. Abb. 17). Anhand von Mutationsvarianten des hIL-23R konnte gezeigt werden, dass eine Mutation um Y397 ebenfalls zu einer Veränderung der IL-23 abhängigen Proliferation führt (s. Abb. 19). Interessanterweise kam es in Ba/F3-gp130 Zellen, die zusätzlich zu den humanen IL-23 Rezeptoren ein hCIB2-GFP-Fusionsprotein exprimieren, nicht zu einem Abfall der Proliferation, während die Expression von hCIB2-GFP in Zellen mit den murinen Rezeptoren die Proliferation bei niedrigen Zytokinkonzentrationen verringert (Erhöhung der EC50) (s. Abb. 33). Auf die Interaktion zwischen hCIB2-GFP und dem IL-23R wird später genauer eingegangen.

Der genannte Effekt wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals beschrieben und im Rahmen einer nachfolgenden Masterarbeit von Sofie Beier näher untersucht. In ihren Versuchen wurde eine Zusammenlagerung der Ba/F3-gp130 mit humanen Rezeptoren nach 12 h unter Stimulation mit 1 µg/ml mHIL-23 beobachtet (112). Eine Zellproliferation war nicht mehr nachweisbar, wohingegen die Zellen mit murinen IL-23 Rezeptoren einzeln vorlagen und proliferierten (112). Mittels Microarray wurde die Genexpression nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von mHIL-23 untersucht. Hierbei kam es zu einer deutlich gesteigerten Genexpression bei 1 µg/ml mHIL-23, wobei insbesondere Gene des JAK/STAT Signalwegs vermehrt exprimiert wurden (112). Erwartungsgemäß kam es auch zu einer vermehrten Expression von SOCS3 und Genen, die mit der Signalkaskade einiger Krankheitsbilder assoziiert sind, in denen IL-23 als proinflammatorisches Zytokin eine Rolle spielt (112). Interessanterweise wurden auch Gene, die mit der Apoptose assoziiert sind, unter hohen mHIL-23 Konzentrationen vermehrt exprimiert (112). Nach weiterer Untersuchung des Zelltods von Ba/F3-gp130 Zellen mit IL-23 Rezeptoren, konnte S. Beier zeigen, dass nach 12 h unter Stimulation mit 1 µg/ml mHIL-23 die Hälfte der gemessenen Zellen abgestorben waren (112). Hierbei ergab sich die Vermutung, dass IL-23 keinen schnellen Zelltod auslöst, sondern eher eine Seneszenz und keine Apoptose bewirkt, da nur die Hälfte der Zellen starb (112),.

Weiterhin bleibt ungeklärt, wieso das beschrieben Phänomen nur in Ba/F3-gp130 Zellen auftritt, die die humanen Rezeptoren exprimieren und nicht in Zellen mit dem murinen Rezeptor. Durch Mutationen im humanen IL-23R lässt sich der Abbruch der Proliferation vermeiden. Hier wäre interessant, ob Ba/F3 Zellen, die den hIL-23R mit dem eingebrachten

SOCS3 oder anderen Mutationen exprimieren, ebenfalls verklumpen oder ob eine Mutation der intrazellulären Domäne diese Zelladhäsion verhindert. Da die Proliferation bei gleichzeitiger Expression des Fusionsproteins hCIB2-GFP nicht abbricht, wäre auch hier interessant, ob es zu einer Zusammenlagerung der Zellen kommt, insbesondere da CIB2 ein mögliches Bindeglied zwischen Integrinen und dem Rezeptor darstellt, worauf im weiteren Verlauf der Diskussion noch eingegangen wird.

Fluoreszenzmikroskopisch scheint CIB2 die Oberflächenexpression des IL-23R zu vermindern, was den Bedarf für eine höhere Konzentration an IL-23 für eine dem Wildtyp entsprechende Proliferation erklären könnte. Die Proliferationsassays mit IL-23R Varianten, in denen Aminosäurereste um Y397, das zur Zellproliferation notwendig scheint, zeigen einen ähnlichen Effekt (26). Scheinbar führt die starke IL-23 Signaltransduktion, wie von S. Beier gezeigt, zur vermehrten Expression von Genen, die zur Apoptose oder Seneszenz führen. Durch hemmende Einflüsse auf die IL-23 Signaltransduktion, wie Mutationen um Y397 und die Expression von CIB2, werden diese Gene vermutlich auch geringer exprimiert und so ein Abbruch der Proliferation verhindert bzw. in den Bereich höherer Zytokinkonzentrationen verschoben.

Ein ähnliches Phänomen wurde in einem *in vitro* Modell für Lungenkrebs in A549 Zellen beschrieben (113). Geringe IL-23 Konzentrationen führen zu einer gesteigerten Proliferation von A549 Zellen, die IL-23 Rezeptoren exprimieren, indem IL-23 an den IL-23R bindet. Hohe Konzentrationen von IL-23 inhibieren die Proliferation durch gleichzeitige Bindung an den IL-23R und IL-12Rβ1 (113).

Zhu et al. haben die IL-23 Konzentration im Serum von pädiatrischen Patienten mit Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn mit der Serumkonzentration einer nicht betroffenen Kontrollgruppe verglichen (53). Hierbei lag die gemessene Serumkonzentration der Kontrollgruppe bei etwa 2 pg/ml, während die Konzentration der erkrankten Gruppen zwischen 5 und 8 pg/ml lag (53). Diese Werte liegen deutlich unter dem Wert, der in dieser Arbeit zu einem Abbruch der Prolifeation von Ba/F3-gp130 Zellen mit humanem IL-23 Rezeptor führt (>10 ng/ml). Eine vermehrte Expression von *IL-23* kann in der Darmmukosa von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und in Hautläsionen von Psoriasispatienten nachgewiesen werden (53, 55). In einem *in vitro* Zellmodell des menschlichen Darms im gesunden bzw. entzündeten Zustand, wurden nach Simulation einer Entzündung, durch Stimulation mit LPS (Lipopolysaccharide) und IFN-γ (Interferon-gamma), eine IL-8 Konzentration von 10 ng/ml gemessen (114). Unstimuliert

lag die IL-8 Konzentration etwas über 0,5 ng/ml (114). Im Serum einer Kontrollgruppe in einer Studie zu Asthma, wurde im Mittel eine IL-8 Konzentration von 10,9 pg/ml gemessen. (115). Ist die gemessene IL-8 Konzentration im *in vitro* Modell repräsentativ für Entzündungsreaktionen *in vivo*, lässt sich vermuten, dass es lokalisiert auch zu einem deratigen Anstieg der IL-23 Konzentration kommen kann. Ist dies der Fall, ließe sich der Abbruch der Zellproliferation beispielsweise als Schutzmaßnahme gegen eine überschießende Immunantwort interpretieren.

4.3 CIB2-GFP bindet an den humanen und murinen IL-23R und verändert die intrazelluläre Verteilung von hIL-23R-mCherry

Nachdem wir in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Saftig (Kiel, Deutschland) das Protein CIB2 mittels Massenspektrometrie als möglichen Interaktionspartner des murinen und humanen IL-23R identifiziert haben, konnte die Bindung von CIB2 an den humanen und murinen IL-23R im Rahmen dieser Arbeit mittels Ko-Immunpräzipitation (s. 2.4.4) bestätigt werden (s. Abb. 22 und Abb. 25). Die Verwendung von Deletionsvarianten des mIL-23R lässt darauf schließen, dass die zur Bindung notwendige Sequenz im proximalen Teil der intrazellulären Domäne des mIL-23R liegt (s. Abb. 26). In den dargestellten Aufnahmen der Western Blots fehlt in den *input* Kontrollen nach Ko-Transfektion mit hCIB2-GFP und der jeweiligen Deletionsvariante des mIL-23R das erwartete Signal für GFP. Wurden die Proben aus denselben Zellen mit den Sepharose *beads* versehen, ließ sich zumindest ein schwaches Signal für GFP detektieren. Ursächlich könnte eine geringe Expression hCIB2-GFP-Fusionsproteins im Rahmen der Ko-Transfektion sein.

Die Interaktion zwischen dem Fusionsprotein hCIB2-GFP und dem hIL-23R wurde mittels Fluoreszenmikroskopie näher untersucht. Hierzu wurde das rot fluoreszierende Protein mCherry an den C-Terminus des hIL-23R fusioniert. Nach Transfektion adhärenter Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden konnte die intrazelluläre Verteilung von hCIB2-GFP und hIL-23R-mCherry analysiert werden. Eine Färbung des Zytoskeletts ermöglicht hierbei eine Aussage zur Lokalisation beider Proteine. IL-23R ist ein Typ I-Transmembranprotein, sodass der N-Terminus außerhalb der Zelle liegt (12). CIB2 ist ein zytosolisches Protein, sodass das Fusionsprotein hCIB2-GFP ubiquitär in der Zelle verteilt liegt, insbesondere aber im Zentrum der Zelle (uniprot O75838). In Neuronen von Ratten konnte eine Ko-Lokalisation mit dem Golgi-Apparat nachgewiesen werden (116). Zellen, die mit beiden Plasmiden transfiziert wurden, zeigen Unterschiede zu den Zellen, die

nur mit einer cDNA transfiziert wurden. Beide Proteine befinden sich nun im Zentrum der Zelle und hIL-23R-mCherry lässt sich nicht mehr am Rande der Zelle detektieren. Möglicherweise interagiert CIB2 mit dem IL-23R während posttranslationaler Modifikationen im Golgi-Apparat (51). Aus diesen Ergebnissen lässt sich die Vermutung äußern, dass hCIB2 einen Einfluss auf den intrazellulären Transport des IL-23R hat. Eine Funktion auf den Transport von Proteinen ist bereits für das Enzym Sphingosinkinase 1 (SPK1) beschrieben (95). Die onkogene Signaltransduktion über dieses Enzym, im Rahmen der Entstehung eines Ovarialkarzinoms, basiert auf einer Translokation des Enzyms an die Zellmembran, die durch CIB1 vermittelt wird (95). Für CIB2 hingegen wurde der gegenteilige Effekt beschrieben (95). CIB2 bindet das Enzym an der gleichen Stelle wie CIB1, führt jedoch zu einer Blockierung der Translokation an die Zellmembran und inhibiert somit die onkogene Signaltransduktion (95). CIB1 fungiert in der Interaktion mit SPK1 als Calcium-Myristoyl *switch* und ermöglicht so die Translokation, während CIB2 diese Funktion fehlt (95, 117). CIB2 erscheint somit als potentieller Tumorsuppressor (95). Als Bindestelle wurde die Calmodulin (CaM) Bindestelle von SPK1 identifiziert (117). Im humanen Enzym liegt die CaM Bindestelle zwischen den Aminosäurerestem 196 – 206, wobei F^{197} und L^{198} eine kritische Rolle zukommen und Mutationen an dieser Stelle keine Bindung von CaM, CIB1 oder CIB2 zulassen (95, 117, 118). Bisher ist keine Interaktion zwischen Calmodulin und dem IL-23R beschrieben oder eine entsprechende Bindestelle bekannt, aus der Interaktion zwischen CIB2 und SPK1 ist eine CaM Bindestelle im IL-23R jedoch anzunehmen. Durch die Immunpräzipitationsversuche mit CIB2 und den Deletionsvarianten des mIL-23R wurde die Bindestelle bereits grob eingegrenzt und scheint im Bereich von Aminosäurerest 415 - 503 zu liegen. Da keine Bindung von CIB2 an den mIL-23R nach Deletion der Intrazellulärdomäne ab Aminosäure 446 in der Immunpräzipitation nachweisbar ist, scheint CIB2 nicht unmittelbar hinter der Transmembrandomäne an den Rezeptor zu binden. Mit dem *Calmodulation database and Meta-analysis predictor* (https://cam.umassmed.edu/) lassen sich kanonische CaM Bindemotive in Aminosäuresequenzen finden (119). Die Genauigkeit ist hierbei am Besten bei Sequenzen mit einer Länge bis 100 Aminosäuren (119, 120). Abb. 40 zeigt die Sequenzen mit kanonischen Bindemotiven im entsprechenden Bereich des mIL-23R nach Verwendung des *Calmodulation database and Meta-analysis predictor*.

Aminosäure (aus mIL-23R)	Sequenz
436-447	VFENDNASEQAL
436-449	VFENDNASEQALYV
437-452	FENDNASEQALYVDPV
447-462	LYVDPVLTEISEISPL
447-456	LYVDPVLTEI
449-462	VDPVLTEISEISPL
449-462	VDPVLTEISEISPL
449-462	VDPVLTEISEISPL
453-462	LTEISEISPL
459-474	ISPLEHKPTDYKEERL
462-477	LEHKPTDYKEERLTGL
474-485	LTGLLETRDCPL
477-488	LLETRDCPLGML
485-500	LGMLSTSSSVVYIPDL
485-494	LGMLSTSSSV
488-497	LSTSSSVVYI

Abb. 40: Kanonische Calmodulin Bindemotive im mIL-23R im Bereich der Aminosäuren 436-500 Die kanonischen CaM Bindemotive in der Aminosäuresequenz des mIL-23R wurden mithilfe des *Calmodulation database and Meta-analysis predictor* (https://cam.umassmed.edu/) gesucht. Entsprechend der Eingrenzung der CIB2 Bindestelle an den mIL-23R im Rahmen dieser Arbeit wurde nur der entsprechende Bereich der Interazellulärdomäne untersucht.

Die verschiedenen Bindemotive bestehen aus hydrophoben Resten, die durch unterschiedlich viele Aminosäuren voneinander getrennt sind (119). Es wurde gezeigt, dass CaM häufig an Stellen bindet, die viele kanonische Bindemotive aufweisen (119). Bei den aufgezeigten Bindemotiven handelt es sich um calciumabhängige CaM Bindemotive (119). Im gesamten Rezeptor lässt sich kein calciumunabhängiges Bindemotiv finden (119). Untersucht man die gesamte Sequenz des mIL-23R mit dem *Calmodulation database and Meta-analysis predictor*, werden zwei Sequenzen zwischen den Amniosäuren 396-426 als wahrscheinlichste Bindestellen für Calmodulin identifiziert. Dies deckt sich jedoch nicht mit den Immunpräzipitationsversuchen aus dieser Arbeit. Für weitere Arbeiten bietet sich an, hydrophobe Reste am Beginn der dargestellten Sequenzen analog zu Sutherland et al. zu Alanin zu mutieren und die Immunpräzipitation mit CIB2-GFP zu wiederholen (118).

Zur genauen Detektion der Bindestelle von CIB2 am IL-23R müssen weitere Deletionsvarianten des Rezeptors kloniert werden und anschließend erneute Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt werden. Hierbei könnte versucht werden, über höhere Plasmidmengen in der Transfektion (s. 2.3.3) eine stärkere Expression von hCIB2-GFP zu bewirken. Zusätzlich könnten die Zellen vor der Lyse (s. 2.4.1) unter dem

Fluoreszenzmikroskop analysiert werden, um eine ausreichende Expression von GFP sicherzustellen. Alternativ ließe sich ein anderes System verwenden. CIB2 könnte mit *Flag* versehen werden und für die Ko-Immunpräzipitation anti-*Flag* Sepharose *beads* verwendet werden. Die Verwendung anderer adhärenter Zellen, die eine effizientere Transfektion ermöglichen, wäre ein weiterer Lösungsansatz.

4.4 Mögliche Bedeutung der Interaktion zwischen CIB2 und IL-23R

Über die physiologischen Funktionen von CIB2 ist wenig bekannt. Eine dieser Funktionen ist die Interaktion mit Integrinen (86). Integrine sind Transmembranrezeptoren für die Zelladhäsion an die Extrazellulärmatrix und für Zell-Zell-Adhäsionen (121). Darüberhinaus sind sie mit dem Zytoskelett verbunden und beeinflussen diverse Signalkaskaden (121). Unter anderem sind sie in der Signaltransduktion über Zytokinrezeptoren beteiligt, über die zu Grunde liegenden Mechanismen ist allerdings bisher wenig bekannt (122). Beispielsweise steht die IL-3 Signaltransduktion in engem Zusammenhang mit Integrin β1 (123). Das Integrin bindet an den Zytokinrezeptor und durch Adhäsion von Fibronectin wird JAK2 an den Komplex aus Integrin und IL-3R rekrutiert, wodurch eine Assoziation von STAT5A ermöglicht wird (123). Dies geschieht unabhängig von IL-3, jedoch kommt es durch IL-3 zu einer verstärkten JAK2 Aktivierung sowie STAT5A Phosphorylierung (123). Aktivierung dieses Signalwegs über das Integrin alleine ist für die Zellproliferation nicht ausreichend, sondern erst nach zusätzlicher Stimulation mit IL-3 (123). Interessanterweise kann IL-3 JAK2 und STAT5A nur in adhärenten Zellen und nicht in Suspensionszellen aktivieren (123).

Durch die Interaktion mit Zytokinrezeptoren, können Integrine die Antwort der Zelle auf Zytokinstimulation, entsprechend der Einbindung in verschieden Zellverbände und Anhand der Extrazellulärmatrix, modulieren (122). CIB2 könnte in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen. Bisher wurde nachgewiesen, dass CIB2 mit Integrin α7β1 und αIIb interagiert (86). Eine weitere Funktion ist die Bindung von Mg^{+} und Ca^{2+} (86). In Abwesenheit dieser Katione nimmt CIB2 eine *molten globule* Proteinstruktur ohne Tertiärstruktur ein (124). Durch Bindung eines dieser Kationen kommt es zur Konformationsänderung mit Ausbildung einer Tertiärstruktur (124). Diese ist nach Bindung von Mg^{+} und Ca^{2+} sehr ähnlich, wobei CIB2 eine deutlich höhere Affinität zu Mg^{+} auffweist (124). Eine Rolle als Calciumsensor ist aufgrund der niedrigen Affinität zu Ca^{2+} unter physiologischen Bedingungen unwahrscheinlich (124). Dennoch lässt sich vermuten, dass über CIB2 eine

Veränderung der Kationenkonzentration im Zytosol, insbesondere der Konzentration von Mg^{+}, ein Effekt auf den IL-23R ausgeübt wird und damit auf die IL-23 Signaltransduktion. Interessanterweise bindet CIB2, im Gegensatz zu CIB1, viele Proteine unabhängig von Ca^{2+} (95). Im Fall der SPK1 scheint Ca^{2+} die Bindung sogar zu schwächen (95). Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass SPK1 bei geringen Calciumkonzentrationen eher eine Bindung mit CIB2 eingeht und nach Stimulation der Zelle mit Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration eine Bindung mit CIB1 favorisiert, wodurch eine Translokation an die Zellmembran mit folgender Signaltransduktion ermöglicht wird (95). Ein entsprechender Regulationsmechanismus für andere Proteine ist vorstellbar.

In der Retina von *knockout* Mäusen, die kein CIB2 exprimieren, konnte CIB2 als Suppressor von *mechanistic target of rapamycin complex 1* (mTORC1) identifiziert werden (125). mTORC1 wirkt einen hemmenden Effekt auf die Autophagozytose aus, sodass bei Ausfall von CIB2 die Autophagozytose eingeschränkt wird, aufgrund einer Überaktivität von mTORC1 (125). Zusätzlich wurden in Mäusen ohne CIB2 Ablagerungen im retinalen Pigmentepithel (RPE) gefunden, die denen von Patienten mit altersbedingter Makuladegeneration (AMD) entsprechen (125). In Gewebeproben von Patienten mit AMD konnte im RPE eine verminderte CIB2 Expression, eine aberrante Autophagozytose sowie eine Überaktivität von mTORC1 nachgewiesen werden (125). Eine eingeschränkte Autophagozytose und eine Überaktivität von mTORC1 spielen eine Rolle im Alterungsprozess und vielen Erkrankungen wie Alzheimer, Krebs, Herzerkrankungen und Adipositas (125, 126).

Die IL-23 vermittelte Expression proninflammatorischer Zytokine läuft in T_H17-Zellen, die an der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen maßgeblich beteiligt sind, über mTORC1 (47, 48). Hier ist ebenfalls eine verminderte Hemmung von mTORC1 durch eine Minderexpression oder Fehlfunktion von CIB2 denkbar, was zu einer übermäßigen Produktion proinflammatorischer Zytokine beitragen könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CIB2 direkt mit dem IL-23R interagiert und scheinbar die Verteilung des Rezeptors in der Zelle beeinflusst. Es lässt sich vermuten, dass CIB2 zu einer verminderten Translokation des Rezeptors an die Zellmembran führt, ähnlich wie bei der SPK1, wodurch die IL-23 Signaltransduktion eingeschränkt würde (95). Als Mechanismus einer indirekten Interaktion kommt der hemmende Einfluss auf mTORC1 in Frage, wodurch CIB2 in einigen Zellen Effektorproteine der IL-23 Signalkaskade regulieren könnte.

4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bestätigt, dass die IL-23 Signaltransduktion keiner Inhibition durch SOCS3 unterliegt. Bisher stehen Antikörper gegen p40 und p19 zur Verfügung, um Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder Psoriasis zu behandeln. Weitere Arbeiten sind nötig, um weitere Details über die intrazelluläre Signaltransduktion und -inhibition von IL-23 zu erlangen. Von besonderem Interesse sind Veränderungen im Rezeptor, der Signaltransduktion oder der IL-23 Produktion, die möglicherweise zu einer Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion führen. Durch besseres Verständnis ließen sich gegebenenfalls neue Ansätze für gerichtete Therapien identifizieren, die deutlich weniger Nebenwirkungen aufweisen, als die systemische Blockade der IL-23 Signaltransduktion durch Antikörper.

Der erstmals beobachtete Effekt des Abbruchs der Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen mit humanem IL-23 Rezeptor wurde in anschließenden Arbeiten bereits weiter untersucht. Warum dieser Effekt bei Ba/F3 Zellen mit murinen Rezeptoren nicht auftritt bleibt weiterhin ungewiss. Außerdem ist nicht klar, ob es sich bei diesem Phänomen um einen physiologischen Effekt handelt, der auch *in vivo* auftritt. Optimal wäre eine Untersuchug von Zellen, die natürlicherweise den IL-23R exprimieren. Ein *in vitro* Modell lässt anhand der Steigerung der IL-8 Konzentration vermuten, dass es lokalisiert zu ausreichend hohen Interleukinkonzentrationen kommen kann, um den beobachteten Effekt auszulösen. Um zu klären, ob es auch zu einer deartigen Steigerung der IL-23 Konzentration kommt, könnte das *in vitro* Modell modifiziert werden. Würden Zellen verwendet die IL-23 produzieren, ließe sich aus dem Zellkulturüberstand die IL-23 Konzentration ermitteln.

Des Weiteren konnte CIB2 im Rahmen dieser Arbeit als Bindungspartner des IL-23R bestätigt werden. Da über die Funktionen von CIB2 bisher wenig bekannt ist, lässt sich über die Auswirkung dieser Interaktion nur spekulieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine verminderte Oberflächenexpression des Rezeptors durch CIB2 nahe. Ein weiterer Inhibitionsmechanismus von CIB2 über eine Hemmung von mTORC1 ist ebenfalls denkbar. In einem Modell mit CIB2 *knockout* Mäusen, könnte ein Einfluss auf die Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untersucht werden. In Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder Psoriasis könnte nach Mutationen von CIB2 gesucht werden, bzw. in Kollektiven aus anderen Arbeiten zu nicht syndromlaer Taubheit auf dem

Boden von CIB2 Mutationen, könnte nach gehäuftem Auftreten dieser Erkrankungen gesucht werden.

Um einen unerwünschten Einfluss auf die Interaktion von IL-23R und CIB2 durch die Fusion mit GFP auszuschließen, könnten die Versuche mit einem Fusionsprotein aus CIB2 und *Flag-Tag* wiederholt werden, da dieses *Tag*-Protein nur ein Molekulargewicht von 1012,97 Da hat. Über die Qualität der Bindung lässt sich mit den Experimenten aus dieser Arbeit keine Aussage treffen. Die Bindestelle wurde eingegrenzt und soll in anschließenden Arbeiten durch Verwendung weiterer Deletionsvarianten identifiziert werden. Zusätzlich könnten in den kanonischen CaM Bindemotiven im eingegrenzten Bereich des Rezeptors die wichtigen hydrophoben Aminosäuren zu hydrophilen Aminosäuren mutiert werden und die Immunpräzipitationsversuche wiederholt werden.

Als wichtiger Faktor in verschiedenen Erkrankungen, ist CIB2 von großem Interesse. Zukünftig soll mehr über die Funktionen des Proteins in Erfahrung gebracht werden, sodass die Auswirkung der Interaktion mit dem IL-23R verständlicher wird.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Floss DM, Schröder J, Franke M, Scheller J. Insights into IL-23 biology: From structure to function. Cytokine Growth Factor Rev 2015; 26: 569–578.
2. Akdis M, Burgler S, Crameri R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-γ: receptors, functions, and roles in diseases. J Allergy Clin Immunol 2011; 127: 701-21.e1-70.
3. Catalan-Dibene J, McIntyre LL, Zlotnik A. Interleukin 30 to Interleukin 40. J Interferon Cytokine Res 2018; 38: 423–439.
4. Leonard WJ, Lin JX. Cytokine receptor signaling pathways. J Allergy Clin Immunol 2000; 105: 877–888.
5. Jones LL, Vignali DAA. Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. Immunol Res 2011; 51: 5–14.
6. Tait Wojno ED, Hunter CA, Stumhofer JS. The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery. Immunity 2019; 50: 851–870.
7. Hecht O, Dingley AJ, Schwanter A, Ozbek S, Rose-John S, Grötzinger J. The solution structure of the membrane-proximal cytokine receptor domain of the human interleukin-6 receptor. Biol Chem 2006; 387: 1255–1259.
8. Vignali DAA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. Nat Immunol 2012; 13: 722–728.
9. Wang X, Wei Y, Xiao H, Liu X, Zhang Y, Han G, et al. A novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in Lupus-like mice. Eur J Immunol 2016; 46: 1343–1350.
10. Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, et al. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. J Immunol 2004; 172: 2225–2231.
11. Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu C-Y, et al. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two β-type cytokine receptor subunits. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93: 14002–14007.
12. Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, et al. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. J Immunol 2002; 168: 5699–5708.
13. Collison LW, Delgoffe GM, Guy CS, Vignali KM, Chaturvedi V, Fairweather D, et al. The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. Nat Immunol 2012; 13: 290–299.
14. Floss DM, Schönberg M, Franke M, Horstmeier FC, Engelowski E, Schneider A, et al. IL-6/IL-12 Cytokine Receptor Shuffling of Extra- and Intracellular Domains Reveals Canonical STAT Activation via Synthetic IL-35 and IL-39 Signaling. Sci Rep 2017; 7: 15172.
15. Rose-John S, Scheller J, Schaper F. "Family reunion"--A structured view on the composition of the receptor complexes of interleukin-6-type and interleukin-12-type cytokines. Cytokine Growth Factor Rev 2015; 26: 471–474.
16. Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, Müller-Newen G, Grötzinger J, Rose-John S, et al. Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. Cytokine Growth Factor Rev 2012; 23: 85–97.
17. Garbers C, Jänner N, Chalaris A, Moss ML, Floss DM, Meyer D, et al. Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. J Biol Chem 2011; 286: 14804–14811.

18. Hummel TM, Ackfeld T, Schönberg M, Ciupka G, Schulz F, Oberdoerster A, et al. Synthetic Deletion of the Interleukin 23 Receptor (IL-23R) Stalk Region Led to Autonomous IL-23R Homodimerization and Activation. Mol Cell Biol 2017; 37.
19. Siupka P, Hamming OT, Kang L, Gad HH, Hartmann R. A conserved sugar bridge connected to the WSXWS motif has an important role for transport of IL-21R to the plasma membrane. Genes Immun 2015; 16: 405–413.
20. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. Immunity 2000; 13: 715–725.
21. Schröder J, Moll JM, Baran P, Grötzinger J, Scheller J, Floss DM. Non-canonical interleukin 23 receptor complex assembly: p40 protein recruits interleukin 12 receptor β1 via site II and induces p19/interleukin 23 receptor interaction via site III. J Biol Chem 2015; 290: 359–370.
22. Bloch Y, Bouchareychas L, Merceron R, Składanowska K, van den Bossche L, Detry S, et al. Structural Activation of Pro-inflammatory Human Cytokine IL-23 by Cognate IL-23 Receptor Enables Recruitment of the Shared Receptor IL-12Rβ1. Immunity 2018; 48: 45-58.e6.
23. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. J Cell Sci 2004; 117: 1281–1283.
24. Floss DM, Klöcker T, Schröder J, Lamertz L, Mrotzek S, Strobl B, et al. Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor β1 and interleukin 23 receptor to Janus kinases. Mol Biol Cell 2016; 27: 2301–2316.
25. Usacheva A, Sandoval R, Domanski P, Kotenko SV, Nelms K, Goldsmith MA, et al. Contribution of the Box 1 and Box 2 motifs of cytokine receptors to Jak1 association and activation. J Biol Chem 2002; 277: 48220–48226.
26. Floss DM, Mrotzek S, Klöcker T, Schröder J, Grötzinger J, Rose-John S, et al. Identification of canonical tyrosine-dependent and non-canonical tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor. J Biol Chem 2013; 288: 19386–19400.
27. Cho M-L, Kang J-W, Moon Y-M, Nam H-J, Jhun J-Y, Heo S-B, et al. STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. J Immunol 2006; 176: 5652–5661.
28. Babon JJ, Varghese LN, Nicola NA. Inhibition of IL-6 family cytokines by SOCS3. Semin Immunol 2014; 26: 13–19.
29. Engelowski E, Schneider A, Franke M, Xu H, Clemen R, Lang A, et al. Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands. Nat Commun 2018; 9: 2034.
30. Zhao J, Liu Y-H, Reichert P, Pflanz S, Pramanik B. Glycosylation analysis of interleukin-23 receptor: elucidation of glycosylation sites and characterization of attached glycan structures. J Mass Spectrom 2010; 45: 1416–1425.
31. Chua AO, Chizzonite R, Desai BB, Truitt TP, Nunes P, Minetti LJ, et al. Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. J Immunol 1994; 153: 128–136.
32. Babon JJ, Nicola NA. The biology and mechanism of action of suppressor of cytokine signaling 3. Growth Factors 2012; 30: 207–219.
33. Calcinotto A, Spataro C, Zagato E, Di Mitri D, Gil V, Crespo M, et al. IL-23 secreted by myeloid cells drives castration-resistant prostate cancer. Nature 2018; 559: 363–369.
34. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol 2005; 6: 1123–1132.

35. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. Cell 2006; 126: 1121–1133.
36. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. Nature 2007; 448: 484–487.
37. Hillmer EJ, Zhang H, Li HS, Watowich SS. STAT3 signaling in immunity. Cytokine Growth Factor Rev 2016; 31: 1–15.
38. Zhang S. The role of transforming growth factor β in T helper 17 differentiation. Immunology 2018; 155: 24–35.
39. Stritesky GL, Yeh N, Kaplan MH. IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. J Immunol 2008; 181: 5948–5955.
40. Yang J, Sundrud MS, Skepner J, Yamagata T. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. Trends Pharmacol Sci 2014; 35: 493–500.
41. Hernández-Santos N, Gaffen SL. Th17 cells in immunity to Candida albicans. Cell Host Microbe 2012; 11: 425–435.
42. Knochelmann HM, Dwyer CJ, Bailey SR, Amaya SM, Elston DM, Mazza-McCrann JM, et al. When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. Cell Mol Immunol 2018; 15: 458–469.
43. Yu Y, Wang D, Liu C, Kaosaard K, Semple K, Anasetti C, et al. Prevention of GVHD while sparing GVL effect by targeting Th1 and Th17 transcription factor T-bet and RORγt in mice. Blood 2011; 118: 5011–5020.
44. Hawkes JE, Chan TC, Krueger JG. Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies. J Allergy Clin Immunol 2017; 140: 645–653.
45. Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. Nat Immunol 2012; 13: 991–999.
46. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. Nat Immunol 2007; 8: 1390–1397.
47. Pastor-Fernández G, Mariblanca IR, Navarro MN. Decoding IL-23 Signaling Cascade for New Therapeutic Opportunities. Cells 2020; 9.
48. Chang J, Burkett PR, Borges CM, Kuchroo VK, Turka LA, Chang C-H. MyD88 is essential to sustain mTOR activation necessary to promote T helper 17 cell proliferation by linking IL-1 and IL-23 signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 2013; 110: 2270–2275.
49. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. Science 2006; 314: 1461–1463.
50. Kim SW, Kim ES, Moon CM, Park JJ, Kim TI, Kim WH, et al. Genetic polymorphisms of IL-23R and IL-17A and novel insights into their associations with inflammatory bowel disease. Gut 2011; 60: 1527–1536.
51. Sivanesan D, Beauchamp C, Quinou C, Lee J, Lesage S, Chemtob S, et al. IL23R (Interleukin 23 Receptor) Variants Protective against Inflammatory Bowel Diseases (IBD) Display Loss of Function due to Impaired Protein Stability and Intracellular Trafficking*. J Biol Chem 2016; 291: 8673–8685.
52. Seidah NG, Sadr MS, Chrétien M, Mbikay M. The Multifaceted Proprotein Convertases: Their Unique, Redundant, Complementary, and Opposite Functions*. J Biol Chem 2013; 288: 21473–21481.
53. Zhu X-M, Shi Y-Z, Cheng M, Wang D-F, Fan J-F. Serum IL-6, IL-23 profile and Treg/Th17 peripheral cell populations in pediatric patients with inflammatory bowel disease. Pharmazie 2017; 72: 283–287.

54. Chhabra S, Narang T, Joshi N, Goel S, Sawatkar G, Saikia B, et al. Circulating T-helper 17 cells and associated cytokines in psoriasis. Clin Exp Dermatol 2016; 41: 806–810.
55. Tonel G, Conrad C, Laggner U, Di Meglio P, Grys K, McClanahan TK, et al. Cutting edge: A critical functional role for IL-23 in psoriasis. J Immunol 2010; 185: 5688–5691.
56. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature 2003; 421: 744–748.
57. Yan J, Smyth MJ, Teng MWL. Interleukin (IL)-12 and IL-23 and Their Conflicting Roles in Cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol 2018; 10.
58. Liao C, Yu Z-B, Meng G, Wang L, Liu Q-Y, Chen L-T, et al. Association between Th17-related cytokines and risk of non-small cell lung cancer among patients with or without chronic obstructive pulmonary disease. Cancer 2015; 121 Suppl 17: 3122–3129.
59. Li J, Lau G, Chen L, Yuan Y-F, Huang J, Luk JM, et al. Interleukin 23 Promotes Hepatocellular Carcinoma Metastasis via NF-Kappa B Induced Matrix Metalloproteinase 9 Expression. PLoS ONE 2012; 7.
60. Gangemi S, Minciullo P, Adamo B, Franchina T, Ricciardi GRR, Ferraro M, et al. Clinical significance of circulating interleukin-23 as a prognostic factor in breast cancer patients. J Cell Biochem 2012; 113: 2122–2125.
61. Sheng S, Zhang J, Ai J, Hao X, Luan R. Aberrant expression of IL-23/IL-23R in patients with breast cancer and its clinical significance. Mol Med Rep 2018; 17: 4639–4644.
62. Wolf AM, Rumpold H, Reimer D, Marth C, Zeimet AG, Wolf D. High IL-12 p35 and IL-23 p19 mRNA expression is associated with superior outcome in ovarian cancer. Gynecol Oncol 2010; 118: 244–250.
63. Hawkes JE, Yan BY, Chan TC, Krueger JG. Discovery of the IL-23/IL-17 Signaling Pathway and the Treatment of Psoriasis. J Immunol 2018; 201: 1605–1613.
64. Leonardi CL, Kimball AB, Papp KA, Yeilding N, Guzzo C, Wang Y, et al. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1). The Lancet 2008; 371: 1665–1674.
65. Feagan BG, Sandborn WJ, Gasink C, Jacobstein D, Lang Y, Friedman JR, et al. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. N Engl J Med 2016; 375: 1946–1960.
66. Sands BE, Sandborn WJ, Panaccione R, O'Brien CD, Zhang H, Johanns J, et al. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. N Engl J Med 2019; 381: 1201–1214.
67. Neurath MF. IL-23 in inflammatory bowel diseases and colon cancer. Cytokine Growth Factor Rev 2019; 45: 1–8.
68. Reich K, Papp KA, Blauvelt A, Tyring SK, Sinclair R, Thaçi D, et al. Tildrakizumab versus placebo or etanercept for chronic plaque psoriasis (reSURFACE 1 and reSURFACE 2): results from two randomised controlled, phase 3 trials. Lancet 2017; 390: 276–288.
69. Langley RG, Tsai T-F, Flavin S, Song M, Randazzo B, Wasfi Y, et al. Efficacy and safety of guselkumab in patients with psoriasis who have an inadequate response to ustekinumab: results of the randomized, double-blind, phase III NAVIGATE trial. Br J Dermatol 2018; 178: 114–123.
70. Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. Nature 1997; 387: 917–921.
71. Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Sprigg NS, et al. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 114–119.

72. Yoshimura A, Ito M, Chikuma S, Akanuma T, Nakatsukasa H. Negative Regulation of Cytokine Signaling in Immunity. Cold Spring Harb Perspect Biol 2018; 10.
73. Palmer DC, Restifo NP. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. Trends Immunol 2009; 30: 592–602.
74. Durham GA, Williams JJL, Nasim MT, Palmer TM. Targeting SOCS Proteins to Control JAK-STAT Signalling in Disease. Trends Pharmacol Sci 2019; 40: 298–308.
75. Chikuma S, Kanamori M, Mise-Omata S, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling: Potential immune checkpoint molecules for cancer immunotherapy. Cancer Sci 2017; 108: 574–580.
76. Kamura T, Maenaka K, Kotoshiba S, Matsumoto M, Kohda D, Conaway RC, et al. VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. Genes Dev 2004; 18: 3055–3065.
77. Mahrour N, Redwine WB, Florens L, Swanson SK, Martin-Brown S, Bradford WD, et al. Characterization of Cullin-box sequences that direct recruitment of Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules to Elongin BC-based ubiquitin ligases. J Biol Chem 2008; 283: 8005–8013.
78. Croker BA, Krebs DL, Zhang J-G, Wormald S, Willson TA, Stanley EG, et al. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. Nat Immunol 2003; 4: 540–545.
79. Nicholson SE, Souza D de, Fabri LJ, Corbin J, Willson TA, Zhang JG, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 6493–6498.
80. Taga T. Gp130, a shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuropoietic cytokines. J Neurochem 1996; 67: 1–10.
81. Souza D de, Fabri LJ, Nash A, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M. SH2 domains from suppressor of cytokine signaling-3 and protein tyrosine phosphatase SHP-2 have similar binding specificities. Biochemistry 2002; 41: 9229–9236.
82. Sasaki A, Yasukawa H, Suzuki A, Kamizono S, Syoda T, Kinjyo I, et al. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. Genes Cells 1999; 4: 339–351.
83. Babon JJ, Kershaw NJ, Murphy JM, Varghese LN, Laktyushin A, Young SN, et al. Suppression of Cytokine Signalling by SOCS3: Characterisation of the mode of inhibition and the basis of its specificity. Immunity 2012; 36: 239–250.
84. Mahony R, Ahmed S, Diskin C, Stevenson NJ. SOCS3 revisited: a broad regulator of disease, now ready for therapeutic use? Cell Mol Life Sci 2016; 73: 3323–3336.
85. Jäger S, Gulbahce N, Cimermancic P, Kane J, He N, Chou S, et al. Purification and characterization of HIV-human protein complexes. Methods 2011; 53: 13–19.
86. Huang H, Bogstie JN, Vogel HJ. Biophysical and structural studies of the human calcium- and integrin-binding protein family: understanding their functional similarities and differences. Biochem Cell Biol 2012; 90: 646–656.
87. Jacoszek A, Pollak A, Płoski R, Ołdak M. Advances in genetic hearing loss: CIB2 gene. Eur Arch Otorhinolaryngol 2017; 274: 1791–1795.
88. Dal Cortivo G, Marino V, Iacobucci C, Vallone R, Arlt C, Rehkamp A, et al. Oligomeric state, hydrodynamic properties and target recognition of human Calcium and Integrin Binding protein 2 (CIB2). Sci Rep 2019; 9: 15058.
89. Häger M, Bigotti MG, Meszaros R, Carmignac V, Holmberg J, Allamand V, et al. Cib2 binds integrin alpha7Bbeta1D and is reduced in laminin alpha2 chain-deficient muscular dystrophy. J Biol Chem 2008; 283: 24760–24769.
90. Giese APJ, Tang Y-Q, Sinha GP, Bowl MR, Goldring AC, Parker A, et al. CIB2 interacts with TMC1 and TMC2 and is essential for mechanotransduction in auditory hair cells. Nat Commun 2017; 8: 43.

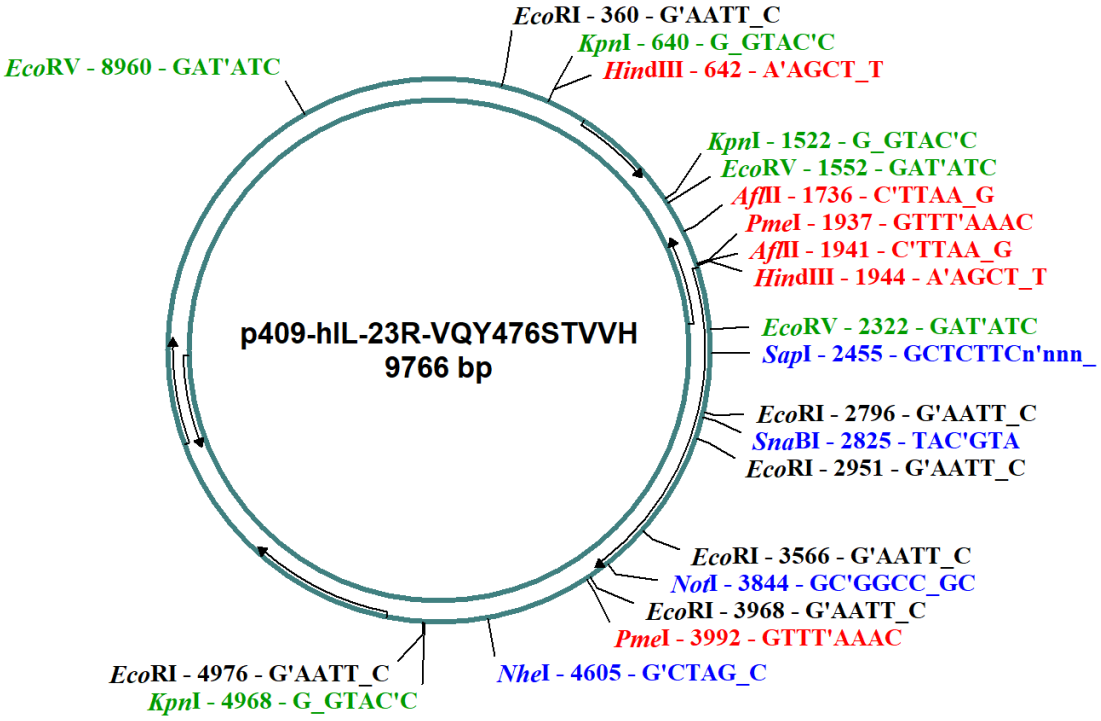
91. Riazuddin S, Belyantseva IA, Giese APJ, Lee K, Indzhykulian AA, Nandamuri SP, et al. Alterations of the CIB2 calcium- and integrin-binding protein cause Usher syndrome type 1J and nonsyndromic deafness DFNB48. Nat Genet 2012; 44: 1265–1271.
92. Wang Y, Li J, Yao X, Li W, Du H, Tang M, et al. Loss of CIB2 Causes Profound Hearing Loss and Abolishes Mechanoelectrical Transduction in Mice. Front Mol Neurosci 2017; 10: 401.
93. Booth KT, Kahrizi K, Babanejad M, Daghagh H, Bademci G, Arzhangi S, et al. Variants in CIB2 cause DFNB48 and not USH1J. Clin Genet 2018; 93: 812–821.
94. Godinho-Santos A, Hance AJ, Gonçalves J, Mammano F. CIB1 and CIB2 are HIV-1 helper factors involved in viral entry. Sci Rep 2016; 6: 30927.
95. Zhu W, Jarman KE, Lokman NA, Neubauer HA, Davies LT, Gliddon BL, et al. CIB2 Negatively Regulates Oncogenic Signaling in Ovarian Cancer via Sphingosine Kinase 1. Cancer Res 2017; 77: 4823–4834.
96. Chen Z, Laurence A, Kanno Y, Pacher-Zavisin M, Zhu B-M, Tato C, et al. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 8137–8142.
97. Ketteler R, Glaser S, Sandra O, Martens UM, Klingmüller U. Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. Gene Ther 2002; 9: 477–487.
98. Suthaus J, Tillmann A, Lorenzen I, Bulanova E, Rose-John S, Scheller J. Forced homo- and heterodimerization of all gp130-type receptor complexes leads to constitutive ligand-independent signaling and cytokine-independent growth. Mol Biol Cell 2010; 21: 2797–2807.
99. Franke M, Schröder J, Monhasery N, Ackfeld T, Hummel TM, Rabe B, et al. Human and Murine Interleukin 23 Receptors Are Novel Substrates for A Disintegrin and Metalloproteases ADAM10 and ADAM17. J Biol Chem 2016; 291: 10551–10561.
100. Rothbauer U, Zolghadr K, Tillib S, Nowak D, Schermelleh L, Gahl A, et al. Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. Nat Methods 2006; 3: 887–889.
101. Rothbauer U, Zolghadr K, Muyldermans S, Schepers A, Cardoso MC, Leonhardt H. A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. Mol Cell Proteomics 2008; 7: 282–289.
102. Pidasheva S, Trifari S, Phillips A, Hackney JA, Ma Y, Smith A, et al. Functional studies on the IBD susceptibility gene IL23R implicate reduced receptor function in the protective genetic variant R381Q. PLoS ONE 2011; 6: e25038.
103. Schwartz DM, Bonelli M, Gadina M, O'Shea JJ. Type I/II cytokines, JAKs, and new strategies for treating autoimmune diseases. Nat Rev Rheumatol 2016; 12: 25–36.
104. Floss DM, Moll JM, Scheller J. IL-12 and IL-23-Close Relatives with Structural Homologies but Distinct Immunological Functions. Cells 2020; 9.
105. Kershaw NJ, Murphy JM, Liau NPD, Varghese LN, Laktyushin A, Whitlock EL, et al. SOCS3 binds specific receptor-JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition. Nat Struct Mol Biol 2013; 20: 469–476.
106. Haan C, Heinrich PC, Behrmann I. Structural requirements of the interleukin-6 signal transducer gp130 for its interaction with Janus kinase 1: the receptor is crucial for kinase activation. Biochem J 2002; 361: 105–111.
107. Tanner JW, Chen W, Young RL, Longmore GD, Shaw AS. The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. J Biol Chem 1995; 270: 6523–6530.
108. Ferrao R, Lupardus PJ. The Janus Kinase (JAK) FERM and SH2 Domains: Bringing Specificity to JAK–Receptor Interactions. Front Endocrinol (Lausanne) 2017; 8.

109. Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. Mol Cell Biol 2000; 20: 3387–3395.
110. Ferrao RD, Wallweber HJ, Lupardus PJ. Receptor-mediated dimerization of JAK2 FERM domains is required for JAK2 activation. Elife 2018; 7.
111. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. Biochim Biophys Acta 2011; 1813: 878–888.
112. Sofie Beier. Konzentrationsabhängige Effekte der Interleukin-23 Signaltransduktion in Ba/F3 Zellen. Masterarbeit 2017.
113. Li J, Le Zhang, Zhang J, Wei Y, Li K, Huang L, et al. Interleukin 23 regulates proliferation of lung cancer cells in a concentration-dependent way in association with the interleukin-23 receptor. Carcinogenesis 2013; 34: 658–666.
114. Kämpfer AAM, Urbán P, Gioria S, Kanase N, Stone V, Kinsner-Ovaskainen A. Development of an in vitro co-culture model to mimic the human intestine in healthy and diseased state. Toxicol In Vitro 2017; 45: 31–43.
115. Zhang J, Bai C. Elevated Serum Interleukin-8 Level as a Preferable Biomarker for Identifying Uncontrolled Asthma and Glucocorticosteroid Responsiveness. Tanaffos 2017; 16: 260–269.
116. Blazejczyk M, Sobczak A, Debowska K, Wisniewska MB, Kirilenko A, Pikula S, et al. Biochemical characterization and expression analysis of a novel EF-hand Ca2+ binding protein calmyrin2 (Cib2) in brain indicates its function in NMDA receptor mediated Ca2+ signaling. Arch Biochem Biophys 2009; 487: 66–78.
117. Jarman KE, Moretti PAB, Zebol JR, Pitson SM. Translocation of sphingosine kinase 1 to the plasma membrane is mediated by calcium- and integrin-binding protein 1. J Biol Chem 2010; 285: 483–492.
118. Sutherland CM, Moretti PAB, Hewitt NM, Bagley CJ, Vadas MA, Pitson SM. The calmodulin-binding site of sphingosine kinase and its role in agonist-dependent translocation of sphingosine kinase 1 to the plasma membrane. J Biol Chem 2006; 281: 11693–11701.
119. Mruk K, Farley BM, Ritacco AW, Kobertz WR. Calmodulation meta-analysis: predicting calmodulin binding via canonical motif clustering. J Gen Physiol 2014; 144: 105–114.
120. Andrews C, Xu Y, Kirberger M, Yang JJ. Structural Aspects and Prediction of Calmodulin-Binding Proteins. Int J Mol Sci 2020; 22.
121. Hynes RO. Integrins. Cell 2002; 110: 673–687.
122. Streuli CH, Akhtar N. Signal co-operation between integrins and other receptor systems. Biochem J 2009; 418: 491–506.
123. Defilippi P, Rosso A, Dentelli P, Calvi C, Garbarino G, Tarone G, et al. {beta}1 Integrin and IL-3R coordinately regulate STAT5 activation and anchorage-dependent proliferation. J Cell Biol 2005; 168: 1099–1108.
124. Vallone R, Dal Cortivo G, D'Onofrio M, Dell'Orco D. Preferential Binding of Mg2+ Over Ca2+ to CIB2 Triggers an Allosteric Switch Impaired in Usher Syndrome Type 1J. Front Mol Neurosci 2018; 11: 274.
125. Sethna S, Scott PA, Giese APJ, Duncan T, Jian X, Riazuddin S, et al. CIB2 regulates mTORC1 signaling and is essential for autophagy and visual function. Nat Commun 2021; 12: 3906.
126. Schneider JL, Cuervo AM. Autophagy and human disease: emerging themes. Curr Opin Genet Dev 2014; 26: 16–23.

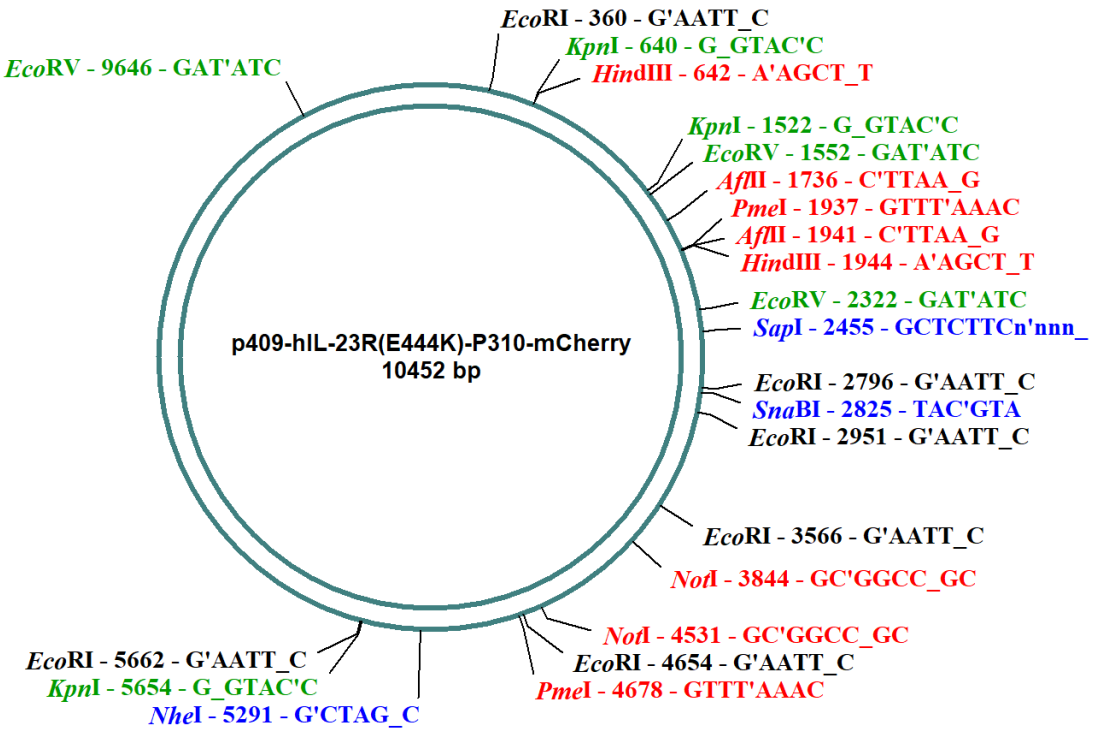
6 Anhang

6.1 Vektorkarten

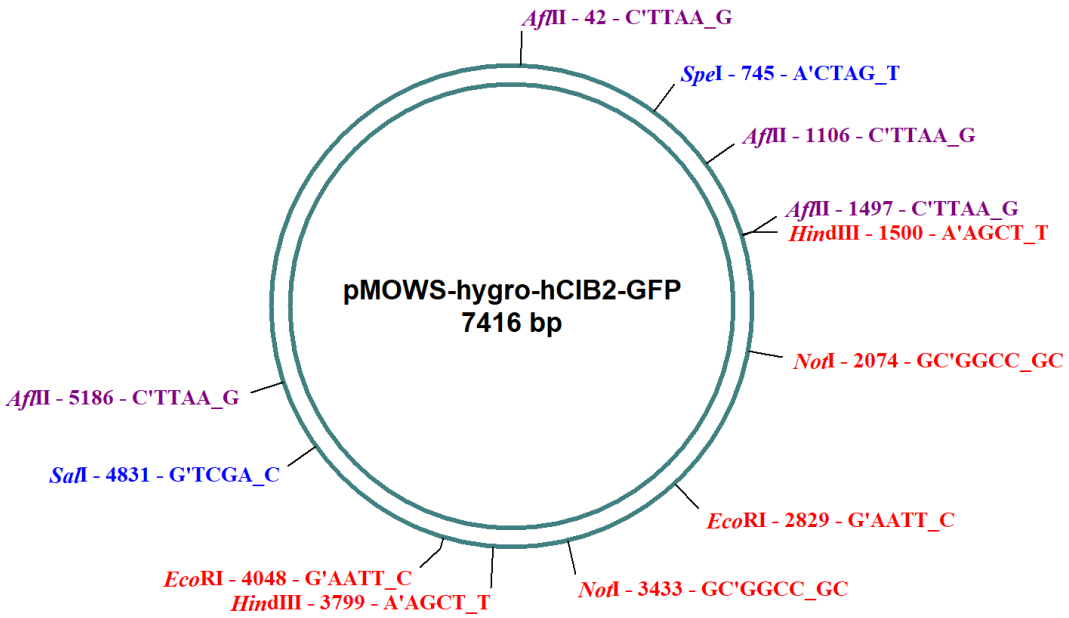
Folgend sind die Vektorkarten, die für diese Arbeit verwendet wurden, abgebildet. Die Karten wurden mittels *pDRAW32 DNA analysis software* (AcaClone software) erstellt. Wichtige Restriktionsstellen sind eingezeichnet und farblich markiert.



Ergänzende Abb. 1: Vektorkarte von p409-hIL-23R-VQY$_{476}$STVVH (s. 3.1)



Ergänzende Abb. 2: Vektorkarte von p409-hIL-23R(E444K)-P310-mCherry (s. 0)



Ergänzende Abb. 3: Vektorkarte von pMOWS-hygro-hCIB2-GFP (s. 3.5)

Danksagung

Mein Dank gebührt in erster Linie meinem Doktorvater Prof. Jürgen Scheller, der dieses Projekt ermöglicht hat. Seine geduldige und freundliche Unterstützung bis zum Schluss hat mir ungemein geholfen und er war es, der mein initiales Interesse an der Grundlagenforschung weckte.

Ganz besonders möchte ich PD. Dr. Doreen Manuela Floss danken. Sie hatte immer Zeit zuzuhören, zu helfen und die Betreuung übertraf jegliche Ansprüche. Ohne sie wäre mir diese Arbeit sehr schwer gefallen und hätte mir weitaus weniger Freude bereitet.

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II danken, die die Zeit im Labor unvergesslich gemacht haben und stets hilfsbereit waren.

Zuletzt ist es mir wichtig meiner Frau zu danken, die mir immer den Rücken freigehalten hat und mich über die gesamte Zeit hin motiviert hat.