

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

Analyse putativer Interleukin-23 Rezeptor interagierender Proteine

Dissertation

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

vorgelegt von
Felix Thives-Kurenbach

2022

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. Jürgen Scheller

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Björn Stork

Jede Zeit hat ihre Aufgabe, und durch die Lösung derselben rückt die Menschheit weiter.

Heinrich Heine

Zusammenfassung

Zytokine sind kleine Peptide, die der interzellulären Kommunikation im Rahmen der Immunabwehr dienen. Das Zytokin Interleukin-23 (IL-23) besteht aus den Untereinheiten p19 und p40 und ist über die Aktivierung und Stabilisierung des pathologischen T-Helfer Subtypen 17 (TH17) mit zahlreichen Autoimmunerkrankungen assoziiert, darunter die Multiple Sklerose, die *Colitis Ulcerosa* und die *Psoriasis vulgaris*. Der IL-23 Rezeptorkomplex, bestehend aus dem Interleukin-23 Rezeptor (IL-23R) und dem Interleukin-12 Rezeptor β 1 (IL-12R β 1), aktiviert nach IL-23-Bindung intrazelluläre Signalwege, insbesondere den JAK/STAT-Weg. Dabei phosphorylieren transaktivierte Janus-Kinasen (JAKs) intrazelluläre Tyrosinreste des IL-23R, welche als Interaktionsstellen für *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-Proteine dienen. Aktivierte STATs dimerisieren, translozieren in den Zellkern und induzieren dort die Produktion IL-23-responsiver Proteine, darunter das *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3). SOCS3 bindet den signaltransduzierenden IL-6 Rezeptor Glykoprotein 130 (gp130) und fungiert so als STAT-suppressives *feedback* Molekül. Auch IL-23 induziert einen SOCS3-Anstieg, jedoch wurden weder eine SOCS3-Bindestelle, noch direkte STAT-suppressive Eigenschaften am IL-23R beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden Fusionsproteine aus dem IL-23R und gp130 erstellt und dadurch ein funktionaler SOCS3-Schalter am IL-23R in stabil-transfizierten Ba/F3-gp130-Zellen etabliert. Außerdem wurde gezeigt, dass die C-terminale Addition des rot-fluoreszierenden Moleküls mCherry keinen Einfluss auf die IL-23-Wirkung hat und ein so *live cell imaging* des Rezeptors ermöglicht. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Deletionsvariante des humanen IL-23R ohne STAT3-Bindemotive wider Erwarten keine STAT3-unabhängige Proliferation vermittelt. Im letzten Teil dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen dem *human calcium and integrin binding protein 2* (hCIB2) sowie dem IL-23R nachgewiesen und darüber hinaus die Interaktionsstelle näher charakterisiert. Die vorliegende Arbeit gibt dadurch neue Einblicke in die Funktionsweise IL-23R abhängiger Signalwege.

Summary

Cytokines are small-sized peptides that serve the intercellular communication as part of immune defense. Interleukin-23 (IL-23) consists of the subunits p19 and p40 and is due to its role in activation and stabilization of the pathologic T helper cell type 17 (TH17) associated with numerous autoimmune diseases, including Multiple sclerosis, Ulcerative colitis and Psoriasis vulgaris. Upon IL-23 binding, the IL-23 receptor complex, consisting of the Interleukin-23 receptor (IL-23R) and the Interleukin-12 receptor β 1 (IL-12R β 1), activates intracellular signaling pathways, notably the JAK/STAT pathway. Therefore transactivated Janus kinases (JAKs) phosphorylate intracellular tyrosine residues, that serve as docking site for *signal transducer and activator of transcription* (STAT) proteins. Activated STATs dimerize, translocate into the nucleus and there induce production of IL-23 responsive proteins, including the *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3). SOCS3, known to bind the signal transducing IL-6 receptor glykoprotein-130 (gp130), acts as a STAT suppressive feedback molecule. IL-23 likewise induces a SOCS3 increase, however no SOCS3 binding site nor direct STAT suppressive properties of IL-23R has been described. Within the present work, fusion proteins of the IL-23R and gp130 were constructed and thereby a functional SOCS3 switch in stable transduced Ba/F3-gp130 cells established. Furthermore it was shown, that a C-terminal addition of the red fluorescent molecule mCherry has no influence on the IL-23 effect, thereby enabling live cell imaging of the receptor. Furthermore it was shown, that a deletion variant of the human IL-23R without STAT3 binding motifs does not mediate STAT3 independent proliferation. Within the last part of this work the interaction of the human calcium and integrin binding protein 2 (hCIB2) and the IL-23R was presented and further characterized. Thereby the present work gives new insights into the functionality of IL-23 dependent signaling pathways.

Abkürzungsverzeichnis

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APC-Streptavidin	Allophycocyanin-gekoppeltes Streptavidin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BCSF2	<i>human B-cell differentiation factor 2</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	Ethanol
$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$	β -Mercaptoethanol
Ca^{2+}	zweiwertiges Kalziumkation
CaCl_2	Kalziumchlorid
CaMK2	<i>calmodulin-dependent protein kinase type 2</i>
cDNA	komplementäre DNA
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$	Kaliumacetat
CH_3COOH	Essigsäure
CH_3OH	Methanol
CLC	Cardiotrophin-ähnliches Zytokin
CNTF	Ciliärer neurotropher Faktor
CNTFR	Ciliärer neurotropher Faktor Rezeptor
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CT-1	Cardiotrophin-1
CT-1R	Cardiotrophin-1 Rezeptor
CTL	Zytotoxische T-Zelle
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	dendritische Zelle
div.	diverse
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT1	DNA-Methyltransferase 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphate
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBI3	<i>Ebstein-Barr virus-induced protein 3</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	Bovines Fötenserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfersystem
G	Gravitationskonstante
GAPDH	Glutamat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	Granulozyten-/Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor
gp130	Glykoprotein-130
h	Stunde
H_2O	Wasser
$\text{H}_2\text{O}_{\text{DD}}$	doppelt destilliertes Wasser

H₂SO₄	Schwefelsäure
hCIB2	<i>human calcium and integrin binding protein 2</i>
HIL-6/23	Hyper-Interleukin 6/23
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IFN-α/β/γ	Interferon- α / β / γ
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
h-/mIL-12Rβ1/2	humaner/muriner Interleukin-12 Rezeptor β 1/2
h-/mIL-23R	humaner/muriner Interleukin-23 Rezeptor
IL-1α/1β/6/4/6/10/11/12/17/23/27/31/35/39	Interleukin-1 α /1 β /6/4/10/11/12/17/23/27/31/35/39
IL-6/11R	Interleukin-6/11 Rezeptor
IZD	intrazelluläre Domäne
JAK	Janus-Kinase
JAK1/2/3	Janus-Kinase 1/2/3
K	Kontrolle
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KIR	<i>kinase inhibitory region</i>
L	Lysat
LB	<i>lysogeny broth</i>
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
LIFR	Leukämie-inhibierender Faktor Rezeptor
m-/hIL-12Rβ1	muriner/humaner Interleukin-12 Rezeptor β 1
m-/hIL-23R	muriner/humaner Interleukin-23 Rezeptor
M	DNA-Marker
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mg²⁺	zweiwertiges Magnesiumkation
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MK2	<i>MAPK-activated protein kinase 2</i>
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
Na₂CO₃	Natriumcarbonat
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NB	<i>nonbound</i>
ng	Nanogramm
NKC	natürliche Killerzelle
NP-40	Nonoxinol 40
OSM	Oncostatin M
OSMR	Oncostatin M Rezeptor
p-	Phospho
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PEG4000	Polyethylenglykol 4000
POD	Peroxidase
PEST-Sequenz	Prolin-, Glutamin-, Serin-, Threonin-reiche Sequenz
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PNK	Polynukleotidkinase

PTP	<i>phosphotyrosine phosphatase</i>
SHP2	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase 2</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
RAB-11	<i>ras-related in brain 11</i>
RBX2	<i>really interesting new gene finger protein 2</i>
s-	<i>soluble</i> (löslich)
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	<i>Src-homology 2</i>
SK1	Spingosin-Kinase 1
SMAD 1/5/9	<i>sma mothers against decapentaplegic 1/5/9</i>
SOCS1/2/3/4/5/6/7	<i>suppressor of cytokine signalling 1/2/3/4/5/6/7</i>
SOE-PCR	<i>splicing by overlapping extension-PCR</i>
STAT1/2/3/4/5a/5b/6	<i>signal transducer and activator of transcription 1/2/3/4/5a/5b/6</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFβ	<i>transforming growth factor β</i>
TH1/2/17	T-Helfer Subtyp 1/2/17
TMC1/2	<i>transmembrane channel like proteins 1/2</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
Treg	regulatorischer T-Helfer Subtyp
Tween	Polysorbat 20
TYK2	Tyrosinkinase 2
Ub	Ubiquitin
vgl.	vergleiche
YAP	<i>yes-associated protein</i>

Einbuchstaben-Aminosäurecode

A	Alanin
G	Glycin
I	Isoleucin
L	Leucin
F	Phenylalanin
P	Prolin
W	Tryptophan
V	Valin
N	Asparagin
C	Cystein
Q	Glutamin
M	Methionin
S	Serin
T	Threonin
Y	Tyrosin
R	Arginin
H	Histidin
K	Lysin
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zytokine als Grundlage interzellulärer Kommunikation	1
1.2	Die IL-6-Familie	3
1.2.1	Einführung in die IL-6-Familie	3
1.2.2	Signaltransduktion gp130 abhängiger Signalwege am Beispiel des IL-6	5
1.2.3	Die molekulare Struktur des gp130	6
1.3	SOCS3, ein Modulator gp130 abhängiger Signalwege	8
1.4	IL-23 als Mitglied der IL-12-Familie	11
1.4.1	Einführung in die IL-12-Familie	11
1.4.2	Die Signaltransduktion des IL-23	13
1.4.3	Die Rolle von IL-23 in der T-Zell-Differenzierung	15
1.4.4	Die Pathophysiologie des IL-23	16
1.5	Ziele der Arbeit	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Chemische Agenzien und Lösungen	21
2.1.2	DNA-Moleküle	25
2.1.3	Bakterienstämme und Zelllinien	27
2.1.4	Bioaktive Peptide und Proteine	28
2.1.5	Sonstige Verbrauchsmaterialien	31
2.1.6	Geräte	32
2.2	Molekularbiologische Methoden	34
2.2.1	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	34
2.2.2	Isolation von Plasmid-DNA	34
2.2.3	Agarosegelelektrophorese zur größenspezifischen Trennung von DNA-Fragmenten	35
2.2.4	DNA-Reinigung nach Agarosegelelektrophorese	36
2.2.5	Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA	36
2.2.6	Nukleinsäurequantifizierung	36
2.2.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
2.2.8	Phosphorylierung von DNA-Fragmenten	40

2.2.9	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	40
2.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten.....	40
2.2.11	DNA-Sequenzierung	41
2.3	Zellbiologische Methoden	42
2.3.1	Zellkultur	42
2.3.2	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen	42
2.3.3	Stabile retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen	42
2.3.4	Durchflusszytometrie.....	43
2.3.5	Zellviabilitätsmessung mithilfe des Proliferationsassays	44
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	45
2.4.1	Stimulationsassay zwecks Nachweis der Signaltransduktion nach Zytokinstimulation	45
2.4.2	Herstellung von Zelllysaten.....	45
2.4.3	Proteinquantifizierung	47
2.4.4	Western Blot	47
2.4.5	Immunokopräzipitationsassays.....	49
2.4.6	Konfokalmikroskopie	50
3	Ergebnisse	51
3.1	IL-23R-gp130-Chimären induzieren eine pSTAT3-Suppression nach hIL-23-Stimulation	51
3.1.1	Hintergrund und Fragestellung.....	51
3.1.2	Klonierung der Rezeptorchimäre hIL-23R-gp130	53
3.1.3	Die Chimäre hIL-23R-gp130 wird aktiv in Ba/F3-gp130-Zellen exprimiert.....	59
3.1.4	hIL-23R-gp130 und mIL-23R-gp130 induzieren eine IL-23 abhängige Zellproliferation mit pSTAT3-Suppression	60
3.1.5	Klonierung der Rezeptorvariante hIL-23R-gp130_N642-S765	63
3.1.6	Die Chimäre hIL-23R-gp130_N642-S765 wird stabil in Ba/F3-gp130-Zellen exprimiert	68
3.1.7	hIL-23R-gp130_N642-S765 induziert eine IL-23 abhängige Zellproliferation mit partieller pSTAT3-Suppression.....	69
3.2	Visualisierung des IL-23R mittels mCherry	72
3.2.1	Verhält sich die Variante IL-23R-mCherry wie der Rezeptorwildtyp?	72
3.2.2	hIL-23R-mCherry wird stabil in Ba/F3-gp130-Zellen exprimiert	72

3.2.3	Die Rezeptorvariante hIL-23R-mCherry ist funktionell mit dem Wildtyp Rezeptor vergleichbar.....	73
3.2.4	mIL-23R-mCherry kann mittels Konfokalmikroskopie visualisiert werden.....	76
3.3	Analyse der Deletionsvariante hIL-23R Δ 476.....	79
3.3.1	Wie wirkt sich die Deletion 476-629 auf die Aktivität des hIL-23R aus?	79
3.3.2	Klonierung der Deletionsvariante hIL-23R Δ 476	79
3.3.3	hIL-23R Δ 476 wird stabil in Ba/F3-gp130-Zellen exprimiert	83
3.3.4	Die Deletion der intrazellulären Aminosäuren 476-629 des IL-23R resultiert in einer inaktiven Rezeptorvariante.....	83
3.4	hCIB2 spielt eine Rolle im IL-23-Signalweg	85
3.4.1	Wo bindet hCIB2 an den IL-23R?.....	85
3.4.2	hCIB2 interagiert mit dem hIL-23R	85
3.4.3	Die Transkriptanalyse von hCIB2 in verschiedenen Zelllinien ist nicht möglich... ..	87
4	Diskussion	89
4.1	In IL-23R-gp130-Chimären erfolgt eine Suppression der STAT3-Aktivierung	89
4.2	hIL-23R-mCherry ist funktionell aktiv.....	97
4.3	Die Deletionsvariante hIL-23R Δ 476 ist funktionell inaktiv	98
4.4	hCIB2 interagiert mit dem IL-23R	101
4.5	Schlussfolgerungen	105

1 Einleitung

1.1 Zytokine als Grundlage interzellulärer Kommunikation

In biochemischen Lehrbüchern wird der Begriff Zytokin wie folgt definiert: „[Zytokine] sind regulatorisch wirkende, hormonähnliche Signalstoffe, die von [...] Leukozyten, aber auch von anderen Zellen gebildet werden, um die Aktivität des humoralen und zellulären Immunsystems zu steuern. [Zytokine] sind ausschließlich Peptide und wirken über spezifische Membranrezeptoren“ (2). Basierend auf struktureller Ähnlichkeit, gemeinsamen Korezeptoren und funktionellen Eigenschaften werden Zytokine in Familien eingeteilt (3). Zytokine lassen sich grob in die Gruppen der Interleukine (IL), Interferone (IFN), Wachstumsfaktoren (GF) und Chemokine einteilen (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Systematik der Zytokine

Substanzklasse	Beispiele	Biologische Funktionen
Interleukin (IL)	IL-1 α , IL-1 β , Tumornekrosefaktor α (TNF- α), IL-6	Induktion von pro- und antiinflammatorischen Proteinen, Differenzierung und Proliferation von hämatogenen Vorläuferzellen
Interferon (IFN)	IFN- α , IFN- β , IFN- γ	Induktion proapoptotischer Proteine nach Virusbefall oder neoplastischer Entartung, Induktion zellulärer und humoraler Abwehrmechanismen gegenüber Viren
Chemokin	CXC-Ligand-9, CXC- Ligand-10	Chemotaxis im Rahmen der Immunantwort
Wachstumsfaktor (GF)	<i>platelet-derived growth factor</i> (PDGF)	Induktion von Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen

Modifiziert nach(3–5).

Während Interleukine der Koordination inflammatorischer Prozesse, beispielsweise im Rahmen bakterieller Infektionen, dienen, unterstützen Interferone den Schutz vor Viren und Tumoren (3). Wachstumsfaktoren haben überwiegend mitogene Eigenschaften (4, 6). Chemokine hingegen sind in der Lage, Leukozyten gezielt mithilfe von Konzentrationsgradienten in inflammatorische Kompartimente zu rekrutieren (5). Diese Einteilung ist jedoch ambig, da Zytokine *pleiotrop* sind. Es liegt nahe, dass eine fehlregulierte Zytokin-vermittelte Wirkung mit pathologischen Bedingungen assoziiert ist, darunter Autoimmunerkrankungen und Neoplasien (7, 8).

Zytokine wirken primär *para-* und *auto-*, seltener auch *endokrin* (9). Das Zytokin bindet an die zytokinbindende Domäne seines spezifischen Rezeptormoleküls und induziert eine Homo- oder Heterodimerisation des Rezeptors mit etwaigen Korezeptoren; der Signaltransduktionskomplex bildet sich (3, 10). Die intrazelluläre Signaltransduktion wird bei den Zytokinen vom Typ 1 und 2 durch die Transaktivierung Rezeptor-assoziiierter Tyrosin-Kinasen, sogenannter Janus-Kinasen (JAKs), initiiert (11). Im menschlichen Organismus sind bisher vier verschiedene JAKs, namentlich JAK1, JAK2, JAK3 und Tyrosinkinase 2 (TYK2) bekannt (12). Diese können über die Phosphorylierung von Tyrosinresten des Rezeptors Bindestellen für intrazelluläre Signalmoleküle, insbesondere der Gruppe der *signal transducer and activator of transcription* (STAT), schaffen (12). Nach aktuellem Stand sind sieben verschiedene STAT-Moleküle beschrieben, namentlich STAT1-4, STAT5a/b und STAT6 (13). Nach Rezeptorbindung werden die STAT-Moleküle aktiviert, es kommt zu einer Phospho(p)-STAT-Dimerisierung sowie konsekutiver Translokation in den Zellkern, wo gezielt Gene herauf- oder herabreguliert werden (12–15). Neben dem JAK/STAT-Signalweg werden nach Zytokinbindung weitere Signalkaskaden aktiviert (16–18). Wichtige Signalwege sind der Mitogen-aktivierte Kinase (MEK)/ *extracellular-signal regulated kinase* (ERK)-Signalweg und der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K)/AKT-Signalweg (16–18).

1.2 Die IL-6-Familie

1.2.1 Einführung in die IL-6-Familie

Das circa 22 Kilodalton (kDa) große Zytokin Interleukin-6 (IL-6) reguliert neben Proliferation und Differenzierung von Immunzellen ebenfalls die Produktion von pro- oder antiinflammatorischen Substanzen seiner Zielzellen (19)(s. Tabelle 2). Auch außerhalb des Immunsystems vermittelt IL-6 physiologische Prozesse, wie beispielsweise die Aufrechterhaltung der Darmbarriere gegenüber pathologischen Erregern oder die Knochenhomoöstase (20, 21).

Das 184-Aminosäuren-große, glykosylierte Peptid wurde 1986 erstmals von Hirano *et al.* als *human B-cell differentiation factor 2* (BSF-2) beschrieben (22). Das Peptid besteht aus vier langen α -Helices (A, B, C, D), welche durch Schleifen linear verknüpft und in einer *up-up-down-down*-Topologie angeordnet sind (23). IL-6 besitzt drei Bindestellen, wobei die erste Bindestelle für die Bindung des α -Rezeptors IL-6R und die zweite sowie dritte Bindestelle für die Bindung des β -Rezeptors Glykoprotein-130 (gp130) verantwortlich ist (24–26). IL-6 fungiert als Namensgeber der strukturhomologen IL-6-Zytokinfamilie, welche mit Ausnahme von IL-31 gp130 als β -Rezeptor nutzt (1). Wesentliche funktionelle Aspekte der gp130 abhängigen Zytokine sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Systematische Darstellung der gp130-Zytokinfamilie

<u>Bezeichnung</u>	<u>Ursprungszellen (Beispiele)</u>	<u>Zielzellen (Beispiele)</u>	<u>Effekte (Beispiele)</u>
Interleukin (IL)-6	Endothelzellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Keratinozyten, Chondrozyten, Osteoblasten, Gliazellen, Antigenpräsentierende Zellen (APCs), T-Zellen, Granulozyten, Mastzellen	Hepatozyten, hämatopoetische Stammzellen, div. Leukozyten	Beeinflussung von Knochen-, Knorpel- und Fettstoffwechsel, akute-Phase-Reaktion, Leukozytenproliferation und –differenzierung
IL-11	Osteoblasten, Synoviozyten, Epithelzellen, Endothelzellen, Knochenmarkszellen	Osteoklasten, Epithelzellen, Hepatozyten, Neurone, hämatogene Vorläuferzellen, Makrophagen	Knochenumbau, Neurogenese, Schutz von Epithel- und Bindegewebszellen, Proliferation hämatogener Vorläuferzellen, akute-Phase-Reaktion, Hemmung von Makrophagen
IL-27	dendritische Zellen (DCs), Epithelzellen	T-Zellen, natürliche Killerzellen (NKCs)	T-Helferzelldifferenzierung: Hemmung des T-Helfer Subtypen 17 (TH) 17 und Förderung des Subtypen TH1

Ciliärer neurotropher Faktor (CNTF)	Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten, Chondrozyten	Skelettmuskelzellen	Knochenstoffwechsel, Glucosestoffwechsel
Cardiotrophin-1 (CT-1)	Kardiomyozyten	Hepatozyten, Kardiomyozyten	Regulation von Apoptose, Schutz von Hepatozyten und Neuronen
Cardiotrophin-ähnliches Zytokin (CLC)	embryonale Vorläuferzellen, Immunzellen der Lymphknoten	B-Zellen, Neurone, Nierenzellen	Differenzierung von Neuronen, Proliferation B-Lymphozyten
Leukämie-inhibierender Faktor (LIF)	Endothelzellen, Monozyten, T-Zellen	Skelettmuskelzellen, Kardiomyozyten	Knochenstoffwechsel, Neurogenese
Oncostatin M (OSM)	APCs, Granulozyten, T-Zellen	Hepatozyten, Epithelzellen, Endothelzellen, Stromazellen, Fibroblasten	Hämatopoese, Knochenstoffwechsel, Fettstoffwechsel, Leberregeneration
IL-35	Epithelzellen, Endothelzellen, Monozyten, T-Lymphozyten	NKCs und T-Zellen	Hemmung der Bildung von pro- und Förderung der Bildung von antiinflammatorischer T-Zellen

Modifiziert nach (3, 27–29).

Die für die Signalinduktion der IL-6-ähnlichen Zytokine verantwortlichen Rezeptoren werden in zwei Gruppen eingeteilt: zum einen in die Gruppe der nicht-signaltransduzierenden α -Rezeptoren und zum anderen in die Gruppe der signaltransduzierenden β -Rezeptoren (30). Erstere Gruppe umfasst den IL-6 Rezeptor (IL-6R), den IL-11R, den Ciliärer Neutrophischer Faktor Rezeptor (CNTFR) und möglicherweise einen Cardiotrophin-1 Rezeptor (CT-1R). Letztere Gruppe umfasst gp130, den Leukämie inhibierender Faktor Rezeptor (LIFR), den Oncostatin M Rezeptor (OSMR), WSX-1 und den IL-12R β 2 (1). Während die genannten α -Rezeptoren für die Affinität des jeweiligen Zytokins verantwortlich sind, leiten die Rezeptoren der β -Klasse die intrazelluläre Signaltransduktion ein (1).

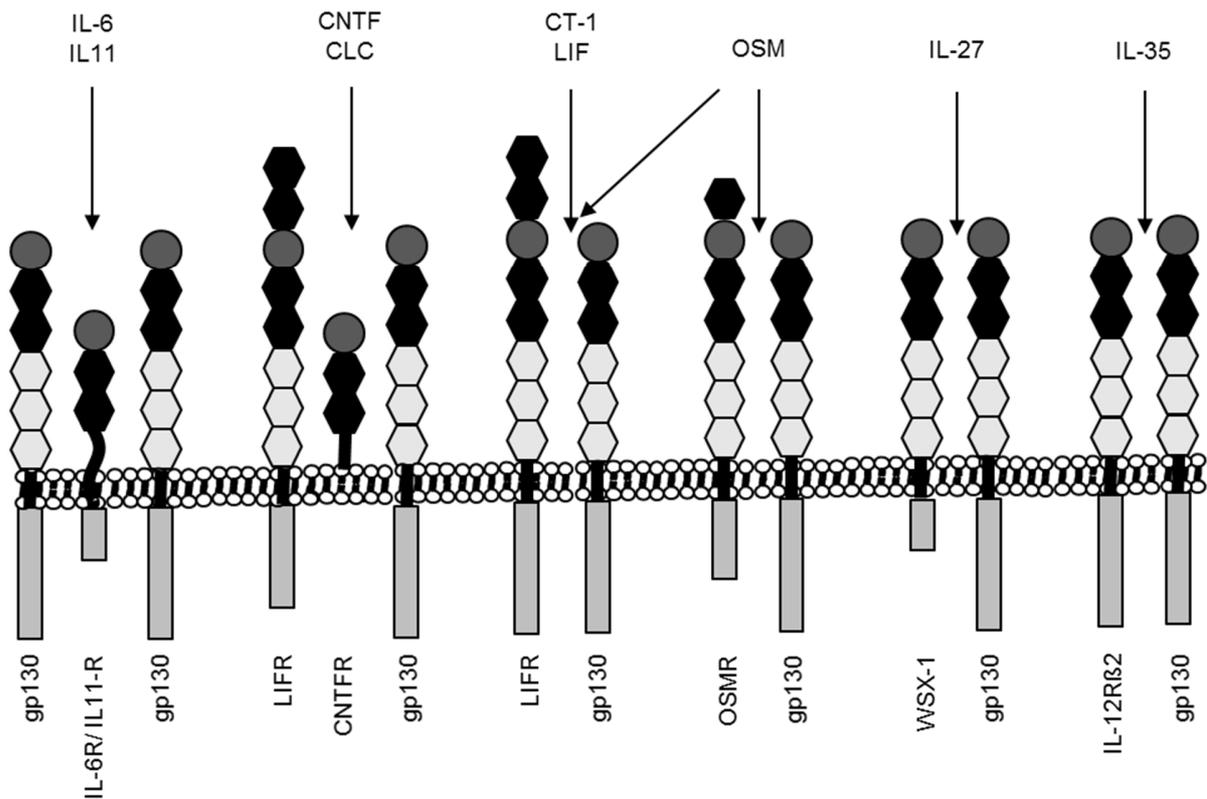


Abb. 1: Glykoprotein-130-abhängige Rezeptorinteraktionen der IL-6-Familie. Modifiziert nach der Übersichtsarbeit von Rose-John aus dem Jahr 2018 (1). Die Rezeptorinteraktionen von IL-6 und -11 sind insofern Sonderfälle, als dass IL-6 und IL-11 nach Bindung an den IL-6R bzw. den IL-11R, eine Homodimerisierung zweier gp130-Moleküle induzieren. Die übrigen Mitglieder der IL-6-Zytokinfamilie hingegen wirken über eine Heterodimerisierung zweier unterschiedlicher Rezeptoren. Während CLC und CNTF auf einen nicht-signaltransduzierenden (α -) Rezeptor, den CNTFR angewiesen sind, wirken LIF und OSM ausschließlich auf zwei signaltransduzierende (β -) Rezeptoren. CT-1 wirkt möglicherweise ähnlich wie CLC und CNTF unter Einbezug eines nicht charakterisierten α -Rezeptors. Der β -Rezeptorkomplex für CLC, CNTF, LIF, OSM und CT-1 besteht aus gp130 und dem LIFR. OSM bindet zudem an einen Komplex aus gp130 und dem OSMR. IL-27 und IL-35 sind heterodimere Komplexe, die gleichsam der IL-6 wie der IL-12-Familie angehören (s. Tabelle 2). IL-27 wirkt über einen heterodimeren Komplex aus WSX-1 und gp130, während IL-35 über einen Komplex aus dem IL-12R β 2 und gp130 wirkt. Dunkelgrau dargestellt sind Immunglobulin-ähnliche Domänen. Zytokinbindende Domänen sind schwarz dargestellt, wobei die typischen Cystein-Motive und WSXWX-Motive nicht hervorgehoben wurden. Hellgrau dargestellt sind Fibronectin-Typ-III-Domänen.

1.2.2 Signaltransduktion gp130 abhängiger Signalwege am Beispiel des IL-6

IL-6 wirkt über drei unterschiedliche Signaltransduktionswege, welche als *classic*-, *trans*- und *cluster*-Signalweg bekannt sind. Im *classic*-Signalweg bindet das Zytokin an den membrangebundenen IL-6R und induziert über eine Tetra- oder Hexamerisierung mit zwei ebenfalls membranständigen gp130-Molekülen die intrazelluläre Signaltransduktion (31–35). Der *classic*-Signalweg ist demnach zwingend auf die Expression von membrangebundenem IL-6R angewiesen und folglich vor allem auf Hepatozyten, neutrophile Granulozyten, Monozyten,

Makrophagen sowie Lymphozyten beschränkt (2). Der *trans*-Signalweg hingegen ist an nahezu allen Zelltypen möglich (31, 36). Durch alternatives Spleißen oder die proteolytische Abspaltung der extrazellulären Rezeptordomänen (*ektodomain shedding*) kommt es zur Entstehung und Sekretion eines löslichen (s)IL-6R's (37–39). Dieser entfaltet über die Bindung von IL-6 eine agonistische Wirkung auf Zellen, die lediglich gp130 auf ihrer Oberfläche exprimieren (36). Beim 2017 erstmalig beschriebenen *cluster*-Signalweg induziert der Komplex aus IL-6 und membrangebundenem IL-6R auf der Zelloberfläche von dendritischen Zellen (DCs) die Aktivierung von gp130-Molekülen auf benachbarten T-Zellen und induziert dadurch die Entwicklung von TH17-Zellen (40).

Eine gezielte Untersuchung des *trans*-Signalweges ermöglicht das Hyper-IL-6 (HIL-6): Dabei wurde mittels *Linkerpeptid* ein Fusionsprotein aus IL-6 und dem sIL-6R hergestellt (41). HIL-6 ist in der Lage, über den *trans*-Signalweg gezielt gp130-exprimierende Zellen zu stimulieren, ohne dabei den *classic*-Signalweg zu aktivieren (41). Außerdem ist dieser artifizielle Komplex verglichen mit dem physiologischen Signaltransduktionskomplex bereits bei deutlich niedrigeren Konzentrationen wirksam (41).

Nach *classic*-, *trans*- oder *cluster*-Aktivierung werden gp130-assoziierte JAKs per *Transphosphorylierung* aktiviert. Besonders wichtig für die IL-6-Wirkung ist JAK1 und in geringerem Maße JAK2 und TYK2 (42, 43). Folgend wird über STAT3 und STAT1 eine genregulatorische proinflammatorische Wirkung erzielt (44). Auch die übrigen Mitglieder der IL-6-Familie wirken primär über STAT1 und -3, wobei je nach Zytokin weitere STAT-Moleküle rekrutiert werden können (45). Ebenfalls von Relevanz ist der MEK/ERK-Signalweg und der PI3K/AKT-Signalweg (46, 47). Möglicherweise findet ebenfalls die Aktivierung des *yes-associated protein* (YAP)/NOTCH-Signalweges statt (48).

1.2.3 Die molekulare Struktur des gp130

Als zentraler, signaltransduzierender Typ-1-Rezeptor der IL-6-Familie ist das 130-150 kDa große gp130 bereits seit 1978 Ziel grundlagenwissenschaftlicher Forschung und seine enorme Wichtigkeit für Embryonalentwicklung, Blutzellbildung, Organfunktion sowie das Immunsystem wurde in zahlreichen murinen *in vivo* Studien belegt (49–53).

Der extrazelluläre Bereich von gp130 besteht aus 597 (human; murin 595) Aminosäuren, welche 6 Domänen bilden, die von membranfern bis membranah mit D1 bis D6 bezeichnet werden (31, 54, 55). Die N-terminale Immunglobulin(Ig)-ähnliche Domäne D1 sowie die angrenzenden

Domänen D2 und D3 sind wichtig für die Bindung des jeweiligen Zytokin-Rezeptorkomplexes (56). Die auf D2 und D3 befindlichen spezifischen Cysteinmotive und das ebenfalls dort ansässige WSXWS (Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin)-Motiv sind charakteristisch für die *cytokine-binding homology region* anderer Typ-1-Rezeptoren (53, 57). Die Funktion der an die 22-Aminosäuren-lange Transmembrandomäne angrenzenden extrazellulären Fibronectin-Typ-III-Domänen 4-6 hingegen ist noch nicht abschließend geklärt, sie scheinen jedoch über die räumliche Positionierung von gp130 für eine suffiziente Signaltransduktion notwendig zu sein (58).

Der intrazelluläre Abschnitt des gp130 umfasst 277 (human; murin 278) Aminosäuren (31, 55). Membrannah vermitteln zwei konservierte Motive die Aktivität von JAKs: Das Prolin-reiche, JAK1 bindende BOX1-Motiv (59–62) und das hydrophobe BOX2-Motiv (60). Darüber hinaus moduliert auch die Inter-BOX-Region die JAK1-Wirkung: Während der Ersatz von Tryptophan durch Alanin an der Stelle 666 des humanen Rezeptors zu einer deutlichen Verminderung der JAK1-Bindung führt, verhindert der Ersatz von Tryptophan durch Alanin an der Stelle 652 des humanen gp130 trotz erhaltener JAK1-Bindung die Signaltransduktion (61, 63). Zahlreiche Tyrosinmoleküle des intrazellulären Abschnitts dienen als Bindestelle für STAT-Moleküle. An den Stellen 767, 814, 905 und 915 (human; murin 765, 812, 904, 914) des Rezeptors liegen YXXQ (Tyrosin-X-X-Glutamin)-Motive, die für eine STAT3-Bindung verantwortlich sind (31, 55, 64). Die Motive um die Aminosäuren 905 und 915 (human; murin 904 und 914) sind ebenfalls für die STAT1-Bindung verantwortlich und folgen einem weniger-variablen YXPQ (Tyrosin-X-Prolin-Glutamin)-Motiv (31, 55, 65). Das Tyrosinmolekül an der Stelle 759 (human, murin 757) hingegen dient als Bindestelle für das Protein *suppressor of cytokine signalling 3* (s. Abschnitt 1.3) und über das Protein *Src homology region 2 domain-containing phosphatase 2* (SHP2) der Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges (66, 67). Weiterhin ist mit dem Serinrest an der Stelle 782 des humanen gp130 ein Schalter für eine *MAPK-activated protein kinase 2* (MK2)- oder *calmodulin-dependent protein kinase type 2* (CaMK2) vermittelte Degradation des Rezeptors beschrieben (68–70).

Neben der membrangebundenen Form von gp130 existiert zudem eine lösliche Form (sgp130), welche am ehesten als natürlicher Antagonist des IL-6-*trans*-Signalweges *in vivo* dient (71). Eine rekombinante Form von sgp130-Dimeren (sgp130Fc) wird aktuell unter dem Namen *Olamkicept* (*Ferring GmbH*, Kiel, BRD) in Phase 2 Studien als mögliches Therapeutikum chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen getestet (72).

1.3 SOCS3, ein Modulator gp130 abhängiger Signalwege

Um ein flexibles Gleichgewicht pro- und antientzündlicher Prozesse zu bewahren, unterliegt die JAK/STAT-Signaltransduktion einer strikten Kontrolle über verschiedenartige regulative Moleküle. Prominent sind die Gruppen der *phosphotyrosine phosphatases* (PTPs) und die im weiteren Verlauf diskutierte Gruppe der intrazellulären *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) (73, 74). Die Familie der SOCS-Proteine umfasst acht Mitglieder, namentlich SOCS1-7 und *cytokine-induced STAT inhibitor* (CIS) (75–80). Die Mitglieder der SOCS-Familie sind laut diversen murinen *knock out* Studien von wesentlicher Bedeutung für Immunantwort, Wachstum und pränatale Entwicklung (81–85).

Die SOCS-Familie folgt einem homologen Aufbau, bestehend aus einer Phosphotyrosin (pTyr) bindenden zentralen *Src-homology 2* (SH2)-Domäne, einer C-terminalen, 40-Aminosäuren umfassenden SOCS-Box und einer N-terminalen, unstrukturierten Region (79, 86, 87). Spezifisch für SOCS1 und SOCS3 ist außerdem eine zwischen N-Terminus und Zentrum liegende weitere Region, die sogenannte *kinase inhibitory region* (KIR) (88, 89). Mit der PEST-Sequenz, die reich an den Aminosäuren Prolin, Glutamin, Serin und Threonin ist, wurde auf der SH2-Domäne von SOCS3 ein Motiv beschrieben, das über die Induktion des proteasomalen Verdaus die Halbwertszeit von SOCS3 auf circa 15 Stunden reduziert (86).

Physiologisch binden die Mitglieder der SOCS-Familie über die SH2-Domäne an Tyrosinreste von Zytokinrezeptoren, JAKs oder STATs (73). Dabei wirken alle SOCS-Proteine in einem Proteinkomplex aus Elongin B und C, Cullin-5 sowie dem *really interesting new gene finger protein 2* (RBX2), welche gemeinsam eine Ubiquitinierung und den proteasomalen Verdau der Zielstruktur vermitteln (90).

Der Vertreter, welcher den gp130 abhängigen pSTAT3-Signalweg moduliert, wird als SOCS3 bezeichnet. SOCS3 wird zytokinabhängig exprimiert und hemmt konsekutiv die pSTAT3-Aktivität (77, 91). Nach IL-6 abhängiger Genexpression lagert sich SOCS3 mithilfe der SH2-Domäne an das pTyr-Molekül an der Stelle 759 des humanen, respektive 757 des murinen Rezeptors an (67, 92). Der Komplex aus SOCS-Box, Elongin B/C, RBX2 und Cullin-5 initiiert im Folgenden eine Ubiquitinierung und den Verdau des phosphorylierten Zytokinrezeptors (90). SOCS3 ist darüber hinaus in der Lage, JAKs direkt über eine zwölf-Aminosäuren-lange KIR-Region zu inhibieren (89). Dabei fungiert jene über die Bindung spezifischer GQM-Motive als sterischer Inhibitor des katalytischen Zentrums von JAK1, JAK2 und TYK2, nicht jedoch von JAK3 (93). Betrachtet man

die pSTAT3-Aktivität nach IL-6-Stimulation, so ist eine Herabregulation des pSTAT3-Signals nach circa 60 Minuten um das zwei- bis vierfache als Folge des SOCS3 *feedback* sichtbar (91).

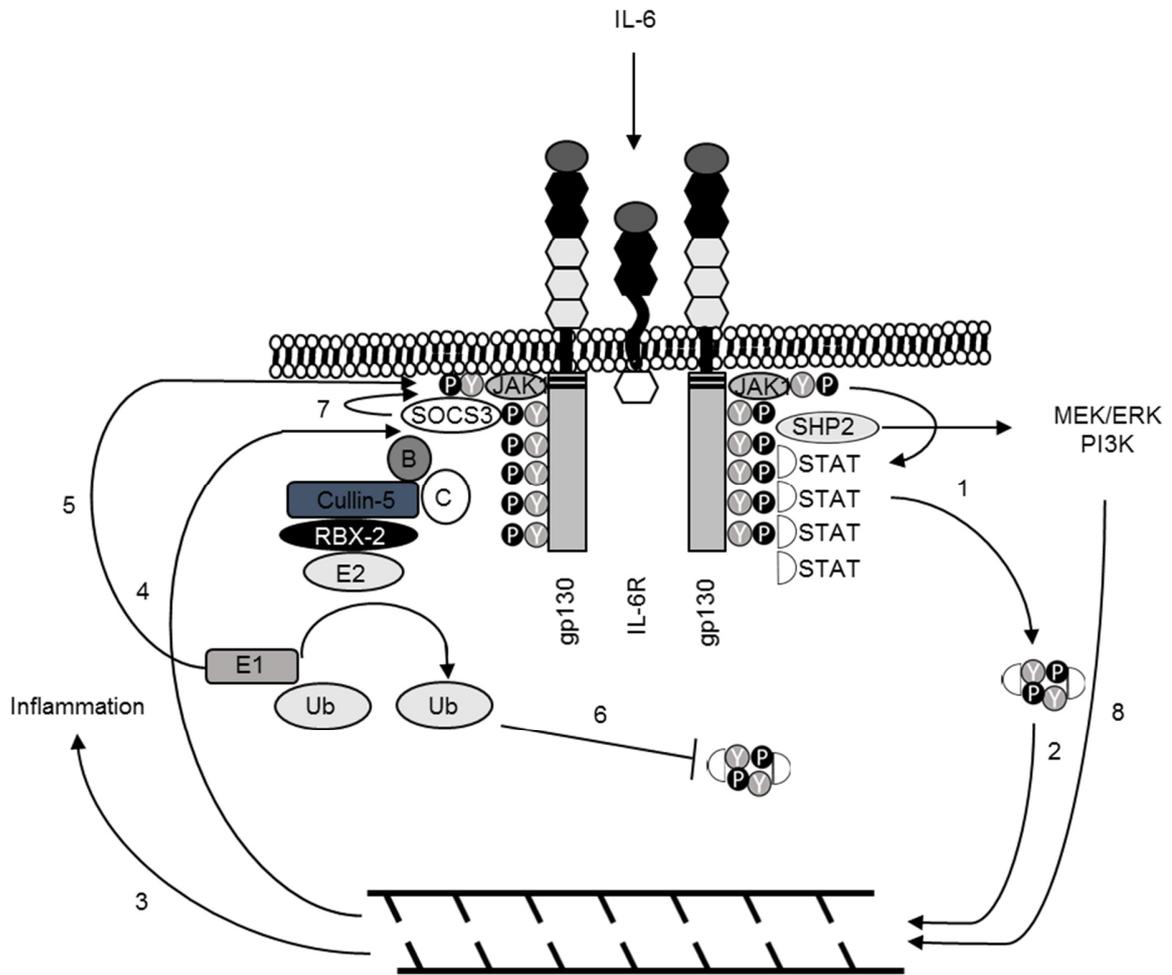


Abb. 2: Die IL-6-Signaltransduktion mit negativem Feedback durch SOCS3. Modifiziert nach Scheller *et al.* 2014, Carow *et al.* 2014 und White *et al.* 2013 (37, 94, 95). 1) IL-6-Bindung aktiviert JAKs, es kommt zur Transphosphorylierung von Rezeptor und STAT-Molekülen. 2) pSTATs dimerisieren und bewirken genregulatorisch einen 3) inflammatorischen Zellstatus. 4) Zu den gebildeten Proteinen zählt auch SOCS3, welches über die SH2-Domäne an gp130 bindet. Ein Proteinkomplex aus den Elonginen B und C, dem Cullin-5, Rbx-2 und der Ubiquitinligase E2 lagert sich ebenfalls an. E2 nimmt vorübergehend Ubiquitinreste von der Ubiquitinligase E1 auf, die 5) auf Zytokinrezeptoren und 6) pSTATs übertragen werden. 7) Durch die KIR-Domäne und die SH2-Domäne hemmt SOCS3 JAKs zudem direkt. 8) Alternative Signalwege wie MEK/ERK und PI3K/AKT werden ebenfalls aktiviert. Dunkelgrau dargestellt sind Immunglobulin-ähnliche Domänen. Zytokinbindende Domänen sind schwarz dargestellt, wobei die typischen Cystein-Motive und WSXWX-Motive nicht hervorgehoben wurden. Hellgrau dargestellt sind Fibronectin-Typ-III-Domänen. Die intrazellulären Motive BOX1 und BOX2 sind als schwarze Linien hervorgehoben.

Der Kern der SOCS3-Wirkung ist über eine partielle Inhibition von pSTAT1 sowie -3 eine spezifische Verformung von gp130 abhängigen Signalwegen. Da SOCS3 verschiedene JAK- und STAT-Moleküle mit unterschiedlicher Affinität hemmt, kommt es zu einem relativen *shift* der JAK/STAT-Signatransduktionswege hin zu denjenigen, welche weniger stark von SOCS3 inhibiert

werden (96). So konnten in SOCS3-defizienten Makrophagen nach IL-6-Stimulation vermehrt STAT1-vermittelte IFN-ähnliche und IL-10-ähnliche Effekte gezeigt werden (97, 98).

Das Fehlen der SOCS3-Wirkung führt zu massiven Entzündungsreaktionen sowie zu Krebs (73, 99). Auch In T-Zellen hat SOCS3 teils antiinflammatorische Effekte. So korreliert die SOCS3-Expression negativ mit der Bildung des proinflammatorischen T-Helfer Subtypen 17 (TH17) (100). In Makrophagen hingegen scheint eine verminderte SOCS3-Wirkung mit einer Verschiebung der IL-6-Wirkung von pro- hin zu antiinflammatorischen Effekten verbunden zu sein (97). Weiterhin korreliert die SOCS3-Expression mit dem Ausmaß von T-Helfer Subtyp 2 (TH2)-vermittelten allergischen Reaktionen (101). SOCS3 scheint zudem die durch DCs bewirkte Induktion des regulatorischen TH-Subtypen (Treg) zu hemmen (102, 103). Außerdem scheint ein Wirkungsverlust von SOCS3 die Produktion des antiinflammatorischen IL-10 zu induzieren (104).

Auch außerhalb des Immunsystems erfüllt SOCS3 wichtige physiologische Funktionen. So scheint es beispielsweise einen positiven Effekt auf die korrekte plazentare Entwicklung während der Schwangerschaft sowie negative Effekte auf die Axonreparatur nach Sehnervschädigung und die hypothalamische Leptinwirkung zu haben (84, 105, 106). Weiterhin ist SOCS3 wahrscheinlich in die hepatozytäre Insulin-vermittelte Signaltransduktion involviert (107).

1.4 IL-23 als Mitglied der IL-12-Familie

1.4.1 Einführung in die IL-12-Familie

1989/90 beschrieben zwei unterschiedliche Arbeitsgruppen die Entdeckung eines neuartigen, über Disulfid-Brücken verbundenen, 70 kDa großen heterodimeren Zytokins (108, 109). Im Verlauf etablierte sich die Bezeichnung IL-12, während die beiden Untereinheiten seither aufgrund ihrer jeweiligen Größe von 35 kDa und 40 kDa als p35 respektive p40 bezeichnet wurden (110, 111). Es konnten zahlreiche Effekte des IL-12 in adaptiver und angeborener Immunantwort nachgewiesen werden, primär über die Induktion von IFN- γ in natürlichen Killerzellen (NKCs) und dem TH1-Subtypen (112).

In den folgenden Jahren wurden mit IL-23, IL-27, IL-35 und IL-39 weitere dimere Zytokine entdeckt und in die neugeschaffene Klasse der IL-12-Familie eingruppiert (111). Da die Untereinheiten der IL-12-Familie über verschiedenartige dimere Komplexe wirken, entsteht ein enormes Interaktions- und Regulationspotential innerhalb dieser Zytokinklasse (s. Tab.3) (111).

Tabelle 3: Systematik der IL-12-Familie

<u>Name</u>	<u>α-Untereinheit</u>	<u>β-Untereinheit</u>	<u>Ursprungszellen (Beispiele)</u>	<u>Zielzellen (Beispiele)</u>	<u>Effekte (Beispiele)</u>
Interleukin-12 (IL-12)	p35	p40	Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Mikrogliazellen, dendritische Zellen (DCs), B-Zellen	Natürliche Killerzellen (NKCs), T-Helfer Subtyp 1 (TH1)	proinflammatorisch über Induktion der TH1-gesteuerten Interferon (IFN)- γ -Produktion, Aktivierung von DCs und Makrophagen
IL-23	p19	p40	DCs, Makrophagen	TH17-Zellen, NKCs, Granulozyten, Makrophagen, DCs, Epithelzellen	proinflammatorisch über Induktion der TH17-Entwicklung, Aktivierung von NKCs, Regulation der Antikörperproduktion
IL-27	p28	<i>Ebstein-Barr virus-induced protein 3 (EBI3)</i>	APCs, Epithelzellen	T-Zellen, NKCs	Proinflammatorisch über Induktion der TH1-Antwort, antiinflammatorisch über Hemmung der TH17-Antwort

IL-35	p35	EBI3	Tregs, Monozyten, Endothelzellen, Epithelzellen	NKCs, T-Zellen	antiinflammatorisch über Induktion der Treg- Proliferation und – Differenzierung sowie Hemmung der Proliferation inflammatorischer T-Zellen
IL-39	P19	EBI3	B-Zellen	unklar	Pro- und autoinflammatorische Wirkung, wahrscheinlich vermittelt über B-Zellen und neutrophile Granulozyten

Modifiziert nach (3, 111, 113, 114).

Aufgrund des IL-6-ähnlichen Aufbaus aus vier, in einer *up-up-down-down*-Topologie angeordneten Domänen, werden die Zytokinuntereinheiten p19, p28 und p35 der IL-12-Familie als α -Untereinheiten bezeichnet, während die aus drei β -Faltblättern bestehenden β -Untereinheiten p40 und *Ebstein-Barr virus-induced protein 3* (EBI3) strukturhomolog zum sIL-6R aufgebaut sind (111, 114). Daher wird die IL-6-Familie gemeinsam mit der IL-12-Familie zur IL-6/IL-12-Familie zusammengefasst (115).

Während p35 Bestandteil von IL-12 und IL-35 ist, ist das Vorkommen von p19 auf IL-23 sowie IL-39 beschränkt (s. Tabelle 3). Die Untereinheit p28 hingegen ist lediglich Bestandteil von IL-27 (s. Tabelle 3). Die β -Kette p40 ist sowohl Bestandteil von IL-12 als auch von IL-23, während EBI3 gemeinsamer Bestandteil von IL-27, IL-35 und IL-39 ist (s. Tabelle 3). Darüber hinaus sind einige Untereinheiten der IL-12-Zytokinfamilie in der Lage, funktionale Homodimere zu bilden oder als Monomer Wirkung zu entfalten. Exemplarisch kann auf diese Weise p28 gp130 abhängige Signalwege inhibieren, während für p40-Dimere IL-12- und IL-23-antagonistische, aber auch weitere, beispielsweise immunmodulierende Effekte sowie chemotaktische Wirkungen auf Makrophagen nachgewiesen werden konnten (116–120).

Als Rezeptoren der IL-12-Familie fungieren dimere Komplexe. IL-12 wirkt über den Rezeptorkomplex aus IL-12R β 1 und IL-12R β 2 (121). Der IL-12R β 1 bildet außerdem zusammen mit dem IL-23R den IL-23 Rezeptorkomplex (122). IL-27 wirkt über einen Rezeptorkomplex aus WSX-1 und gp130 und stellt so ein Bindeglied zwischen IL-6- und IL-12-Familie dar (123).

Analog dazu wirkt IL-35 über einen Komplex aus gp130 und IL-12R β 2, kann aber ebenfalls über Homodimere der beiden genannten Rezeptoren wirken (124). IL-35 zeigt darüber hinaus einen weiteren funktionellen Rezeptorkomplex aus IL-12R β 2 und WSX-1 (125).

Die IL-12-Familie nutzt ebenfalls den JAK/STAT-Weg. Während STAT4 die höchste Wichtigkeit der IL-12-vermittelten Signaltransduktion beigemessen wird, kommt es ebenfalls zur Phosphorylierung von STAT1, -3 und -5 (126–128). IL-23 bedient sich primär STAT3, wohingegen STAT4, -1 und -5 untergeordnete Rollen zufallen (114, 122). IL-27 hingegen nutzt STAT1 sowie -3 und IL-35 soll über einen heterodimeren Komplex aus phosphoryliertem STAT1 und -4 wirken (124, 129).

1.4.2 Die Signaltransduktion des IL-23

Der heterodimere Zytokinkomplex aus dem glykosylierten p40 und dem nicht-glykosylierten p19 wird über Disulfidbrücken stabilisiert und als IL-23 bezeichnet (130, 131). Die Bindung findet über Cysteinmoleküle an der Stelle 54 des humanen p19 sowie an der Stelle 177 des humanen p40 statt (132). Analog zum HIL-6 wurden von Oppmann *et al.* im Jahre 2000 erstmals ein Hyper-(H)IL-23 synthetisiert (130). In diesem rekombinanten Hyper-Zytokin liegen p19 und p40 über einen Peptid-Linker verbunden vor, was die Stabilität des Zytokins deutlich erhöht (130).

Der IL-23R gehört zu der Klasse der Typ-1-Zytokinrezeptoren und hat eine Größe von 71 kDa (53, 133). Er besteht aus einem 374 (human; murin 391) Aminosäuren umfassenden extrazellulären Abschnitt, einer 21 Aminosäuren umfassenden Transmembrandomäne sowie einer 252 (human; murin 247) Aminosäuren umfassenden intrazellulären Domäne (122). Die extrazellulären Domänen werden in eine membrandistale Domäne vom Ig-ähnlichen Typ und zwei membranproximale zytokinbindende Domänen unterteilt (122, 134). Zwischen zytokinbindenden Domänen und der Membran liegt eine unstrukturierte *stalk region*, die die Bildung von konstitutiv-aktiven IL-23R-Dimeren verhindert (135). An den intrazellulären Teil des Rezeptors bindet die Januskinase JAK2, welche nach Rezeptoraktivierung intrazelluläre Tyrosinreste phosphoryliert (136). Die JAK2-Bindung des IL-23R ist insofern untypisch, als dass sie nicht über membran nahe BOX1/2-Motive sondern über ein membranfernes Bindemotiv zwischen den Aminosäuren 455 und 479 vermittelt wird (136). Die beiden Tyrosinmoleküle an den Stellen 484 und 611 des humanen, respektive 504 und 626 des murinen IL-23R liegen in einem klassischen STAT bindenden-YXXQ-Motiv vor und binden STAT3 (47). Am murinen IL-23R sind zudem ein atypisches Tyrosin-haltiges pSTAT3-Bindemotiv an der Stelle 542 und ein tyrosinfreies Bindemotiv zwischen den

Aminosäuren 554 und 570 an der pSTAT3-Signaltransduktion beteiligt (47). Mit STAT1, -4 und -5 binden außerdem weitere STAT-Moleküle an den IL-23R (122). Das membrannahe YEDI (Tyrosin-Glutamat-Aspartat-Isoleucin)-Motiv an der Stelle 397 des humanen sowie 416 des murinen IL-23R ermöglicht eine Aktivierung des MEK/ERK- sowie des PI3K/AKT-Signalweges, wahrscheinlich indem es als Bindestelle für SHP2 dient (47, 122).

Der IL-12R β 1 gehört ebenfalls zu der Klasse der Typ-1-Membranrezeptoren und hat eine Größe von 70,5 (human; murin 81) kDa (53, 137, 138). Er besteht aus einem 516 (human; murin 561) Aminosäuren langen extrazellulären Abschnitt, einer 30 Aminosäuren langen Transmembrandomäne sowie einer 91 (human; murin 147) Aminosäuren umfassenden intrazellulären Domäne (137, 138). Der glykosilierte extrazelluläre Abschnitt des IL-12R β 1 umfasst drei membrannahe Fibronectin-Typ-III-Domänen und zwei membranferne zytokinbindende Rezeptordomänen (122, 138). Der intrazelluläre Teil des IL-12R β 1 verfügt über zwei membrannahe BOX-Motive (BOX1/2), wobei BOX1 essentiell für die Bindung von TYK2 und die IL-23-Signaltransduktion ist (136). Dennoch verfügt der humane IL-12R β 1 über kein intrazelluläres Tyrosinmolekül, während der murine Rezeptor über ein einziges Tyrosinmolekül jedoch ohne STAT bindende Eigenschaften an der Stelle 635 verfügt (114, 137, 138). In Abbildung 3 auf der folgenden Seite werden Aufbau und Funktion des IL-23-Signaltransduktionskomplexes dargestellt.

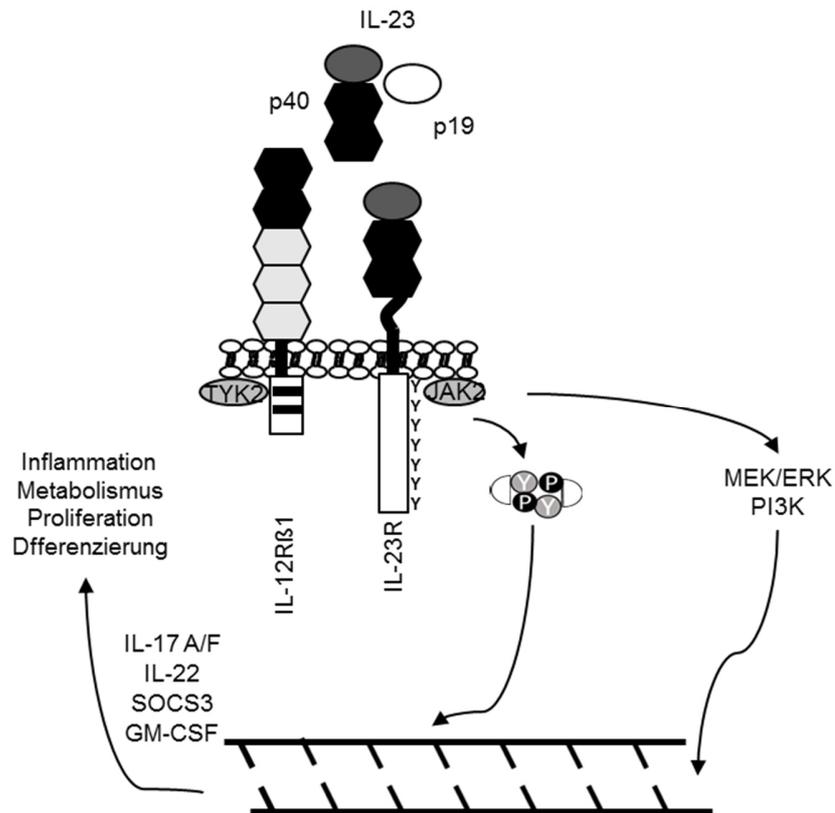


Abb. 3: Humaner IL-23 Signaltransduktionskomplex. Modifiziert nach Floss *et al.* 2020 und Pastor-Fernández *et al.* 2020 (114, 139). IL-23 setzt sich aus den Untereinheiten p40 und p19 zusammen und bindet an den Rezeptorkomplex aus IL-23R und IL-12Rβ1. An den intrazellulären Teil des IL-23R lagert sich die Januskinase JAK2 an, während TYK2 an den IL-12Rβ1 bindet. Sieben Tyrosinreste sind am intrazellulären Teil des IL-23R vorhanden, jedoch keiner am IL-12Rβ1. Nach Zytokinbindung werden die Januskinasen aktiviert und phosphorylieren die Proteine STAT1, -3, -4 und -5, welche als Dimer in den Nukleus wandern. Dort regulieren sie IL-23 abhängige Proteine, beispielsweise IL-17A, IL-17F aber auch SOCS3 und GM-CSF herauf. Ebenfalls aktiviert sind der MEK/ERK und der PI3K/AKT-Weg. Weiterhin induziert IL-23 Metabolismus, Proliferation und Differenzierung IL-23R-exprimierender Zellen. Dunkelgrau dargestellt sind Immunglobulin-ähnliche Domänen. Zytokinbindende Domänen sind schwarz dargestellt, wobei die typischen Cystein-Motive und WSXWX-Motive nicht hervorgehoben wurden. Hellgrau dargestellt sind Fibronectin-Typ-III-Domänen. Die intrazellulären Motive BOX1 und BOX2 sind als schwarze Linien hervorgehoben.

1.4.3 Die Rolle von IL-23 in der T-Zell-Differenzierung

Die Familie der T-Lymphozyten setzt sich aus unterschiedlichen Zelltypen zusammen, die sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen entfalten. Man unterscheidet zwischen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (CTLs), Tregs und CD4⁺ TH-Zellen (140, 141). TH-Zellen wurden funktionell aufgrund unterschiedlicher Zytokinexpressionsmuster 1986 erstmals in TH1- und TH2-Zellen unterschieden (142). IFN-γ sezernierende TH1-Zellen dienen der Abwehr infektiöser Erkrankungen durch intrazellulärer Erreger, wie beispielsweise durch *Mycobacterium tuberculosis*, während IL-4-sezernierende TH2-Zellen die Immunglobulin-E (IgE)-gesteuerte Abwehr von Parasiten fördern (143–145).

Deutlich jünger ist die Entdeckung des unabhängigen Subtypen TH17, der sich durch die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-17 auszeichnet (146). IL-17 umfasst eine Gruppe von sechs strukturhomologen Proteinen (IL-17A-F) und besitzt starke proinflammatorische Effekte, wie die Förderung der Granulopoese, die Induktion von Chemokinen des CXC-Typen sowie zahlreicher weiterer proinflammatorischer Substanzen, darunter IL-6, IL-8, und Prostaglandin-E2 (147–150). Neuer ist die Erkenntnis, dass TH17-Zellen über die Aktivierung von antikörperproduzierenden B-Zellen und die Bildung ektopen lymphatischen Gewebes weitere immunologische Funktionen ausüben (151, 152). Die physiologische Abwehrfunktion der TH17-Zellen konnte beispielsweise in Modellen zur Infektion mit *Mycoplasma pneumoniae* und *Candida albicans* belegt werden (153, 154).

Die TH17-Polarisation wird initial durch einen interzellulären Kontakt zwischen einer aktivierten Antigen-präsentierenden Zelle (APC) und einer TH-Vorläuferzelle induziert (155). Neben IL-6 sind IL-21, IL-1 β und der *transforming growth factor β* (TGFB) zentrale Signalmoleküle für die weitere Polarisation des humanen TH17-Subtypen (156–158). Für die Aufrechterhaltung der TH17-Zellen ist jedoch ein viertes Signalmolekül von herausragender Bedeutung: IL-23 (159). Das im Rahmen der TH17-Polarisation aktivierte pSTAT3 dient als Promotor für STAT3 abhängige DNA-Abschnitte, darunter die Gene des IL-17A, des IL-17F und des *Retinoic acid related orphan receptor γ thymus* (ROR γ t) (160). Gerade der Transkriptionsfaktor ROR γ t unterstützt die finale TH17-Polarisation in besonderem Maße und kann als Schlüsselmolekül in der TH17-Differenzierung betrachtet werden (160).

1.4.4 Die Pathophysiologie des IL-23

Ein großer Teil der pathophysiologischen Bedeutungen des IL-23 ist durch seine Funktion im Rahmen der Aufrechterhaltung des TH17-Subtypen erklärbar. Eine TH17-Überaktivität ist mit Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose (MS) und der Schuppenflechte (*Psoriasis vulgaris*) assoziiert (161, 162).

In einem Mausmodell der MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), führte die Gabe von Antikörpern gegen IL-23p19 zu einer Reduktion der IL-17-Serumkonzentration sowie zu einer Senkung der Rezidivrate (163). Dabei scheint IL-23 maßgeblich für den pathologischen Charakter der TH17-Antwort ursächlich zu sein: So verlieren *in vitro*-polarisierte, IL-23-naive TH17-Zellen ihre pathologische Wirkung im EAE-Modell (161).

Eine IL-23 abhängige Vermehrung des TH17-Zelltypen wurde ebenfalls in entzündlichen Hautveränderungen im Rahmen der *Psoriasis vulgaris* nachgewiesen (164). Im Rahmen genomweiter Assoziationsstudien konnten mindestens zwei humane IL-23R-Haplotypen (L310P, Q381R) mit protektiven Effekten gegenüber der *Psoriasis vulgaris* nachgewiesen werden, wodurch die Relevanz von IL-23 in der Pathogenese der Schuppenflechte unterstrichen wird (114, 165).

IL-23p19^{-/-} Mäuse entwickeln keine IL-10 Defizienz-induzierte entzündliche Darmerkrankung, was als Hinweis für eine Relevanz der IL-23-Achse bei der Entwicklung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CEDs) gilt (166). Unterstützt wird dies durch die Entdeckung von mindestens vier humanen IL-23R-Haplotypen (R86Q, G149R, V362I, R381Q) mit mutmaßlich protektivem Effekt gegenüber CEDs (114, 167, 168).

IL-23p19^{-/-} Mäuse zeigen keine entzündlichen Gelenkveränderungen im Kollagen-induzierten-Arthritis-Modell, woraus eine Beteiligung von IL-23 an der Entwicklung der *Rheumatoiden Arthritis* (RA) abgeleitet werden kann (169). Die humane IL-23R-Variante R381Q geht mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung der RA einher und unterstützt diese These (168, 170).

Gemeinsam belegen diese Daten die Relevanz der IL-23-Achse für die Entwicklung der MS, der *Psoriasis vulgaris*, CEDs und der RA. Es liegt nahe, dass IL-23 abhängige Signalwege potentielle pharmakologische Ziele darstellen.

Mit Ustekinumab (*Janssen Biotech Inc.*, Horsham, USA) konnte ein anti-p40-Antikörper, der sowohl den IL-12- als auch den IL-23-Signalweg hemmt, seine Wirksamkeit in mehreren Phase-III-Studien belegen (171–173). Ustekinumab ist in der EU aktuell zur Behandlung mittelschwerer bis schwerer Formen der *Plaque-Psoriasis*, der *Psoriasis-Arthritis* und mittelschwerer bis schwerer Formen des *Morbus Crohn* sowie der *Colitis ulcerosa* zugelassen (s. *European Medicines Agency*).

Die anti-p19-Antikörper Guselkumab (*Janssen Cilag International N.V.*, Beerse, Belgien), Tildrakizumab (*Almirall S.A.*, Barcelona, Spanien) und Risankizumab (*Abbvie Deutschland GmbH & Co. KG*, Wiesbaden, BRD) konnten ihre Wirksamkeit ebenfalls in Phase-III-Studien belegen (174–177). Aktuell besteht eine EU-Zulassung zur Behandlung von Patienten mit mittelschwerer bis schwerer *Plaque Psoriasis* (s. *European Medicines Agency*).

Auch die intrazelluläre Signaltransduktion des IL-23-Signalweges stellt ein potentielles pharmakologisches Ziel zur Therapie von Autoimmunerkrankungen dar. Der Tyrosinkinase-Inhibitor Tofacitinib (*Pfizer Inc.*, New York, USA) hemmt JAK1, JAK2 sowie JAK3 (178). Tofacitinib ist nach Phase 3 Studien zur Therapie der RA und der *Psoriasis-Arthritis* sowie der

Colitis ulcerosa zugelassen (179–181) (s. *European Medicines Agency*). Zahlreiche weitere Substanzen, beispielsweise zur Therapie des systemischen *Lupus erythematoses* und der *atopischen Dermatitis* befinden sich aktuell in klinischer Prüfung oder werden bereits *off label* in der Patientenversorgung eingesetzt (139).

1.5 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss putativer intrazellulärer Regulatorproteine auf die IL-23-Signaltransduktion. Das Heterodimer IL-23 besteht aus den Untereinheiten p19 und p40 und bindet an einen heterodimeren Rezeptorkomplex aus IL-12R β 1 und IL-23R (122, 130). Folgend werden intrazelluläre Signalwege, insbesondere der JAK/STAT-Weg, aktiviert und es folgt eine pSTAT3-vermittelte, genregulatorische Veränderung der Zielzelle (114, 122). Ein wichtiges pSTAT3-responsives Gen ist das *Socs3*, welches für das gleichnamige Protein kodiert (77, 91). SOCS3 bewirkt über eine Ubiquitinierung den Abbau der JAKs, Zytokinrezeptoren sowie pSTATs und ist in der Lage, JAKs direkt zu inhibieren (67, 89, 90, 92). SOCS3 ist dadurch ein wichtiger Regulator zahlreicher Signalwege, insbesondere des IL-6-Weges (93). Eine Bindestelle des SOCS3 am intrazellulären Teil des IL-6 Rezeptors gp130 ist bekannt (67, 92). Durch Bindung an gp130 wird die pSTAT3-Aktivität circa 60 Minuten nach IL-6-Gabe stark reduziert (91). Ein solcher Effekt ist nach der Aktivierung des IL-23 Rezeptorkomplexes trotz SOCS3-Expression nicht zu beobachten (47). Es ergibt sich die folgende Frage:

Ist eine SOCS3-vermittelte pSTAT3-Suppression über ein SOCS3-Bindemotiv am IL-23R möglich?

Im Rahmen seiner Dissertation am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf hat Franz Christian Horstmeier IL-23R-Fusionsproteine hergestellt, die am intrazellulären Teil des Rezeptors ein SOCS3-Bindemotiv aufweisen (bislang unveröffentlicht). Eine IL-23 abhängige pSTAT3-Suppression konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Ziel dieses Projektes ist es, IL-23R-gp130-Fusionsproteine zu erzeugen, um eine SOCS3-vermittelte pSTAT3-Suppression zu erreichen. Dafür werden Expressionsvektoren erzeugt, die für IL-23R-gp130-Fusionsproteine kodieren. Anschließend werden diese Rezeptorchimären transient in U4C und stabil in Ba/F3-gp130-Zellen transfiziert. Die erzeugten Zelllinien werden dann auf Expression der Rezeptorchimären, auf IL-23 abhängige Proliferation und Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges untersucht.

Des Weiteren soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Fusion des fluoreszierenden Proteins mCherry an den intrazellulären Teil des IL-23R Auswirkung auf dessen Signaltransduktion hat. Hierfür wird ein entsprechender Expressionsvektor von Franz Christian Horstmeier (bislang

unveröffentlicht) übernommen, Ba/F3-gp130-Zellen retroviral transduziert und diese hinsichtlich der IL-23 abhängigen Proliferation sowie der Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges untersucht.

Wo bindet hCiB2 an den IL-23R?

Ein weiterer Teil der Arbeit befasst sich mit dem zytoplasmatischen Protein *human calcium and integrin binding protein 2* (hCiB2), welches mutmaßlich mit dem IL-23R interagiert. Bisher konnte die genaue Bindestelle des hCiB2 am IL-23R nicht genau definiert werden und die Auswirkungen des Proteins auf den IL-23-Signalweg sind unklar. Im Folgenden soll die hCiB2-Bindestelle am IL-23R näher charakterisiert werden. Hierfür wird ein Expressionsvektor für eine IL-23R-Deletionsvariante erzeugt. Die Interaktion von hCiB2 und IL-23R beziehungsweise der IL-23R-Deletionsvariante wird mittels Immunpräzipitation von transient-transfizierten Zellen analysiert. Zudem wird die Deletionsvariante funktionell in stabil-transfizierten Zellen untersucht. Außerdem werden verschiedene Zelllinien auf die Expression von hCiB2 mittels RT-PCR überprüft.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemische Agenzien und Lösungen

In der Tabelle 4 sind die Chemikalien und Lösungen aufgeführt, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit genutzt wurden.

Tabelle 4: Chemikalien und Lösungen

<u>Chemikalie/Lösung</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Eigenschaft</u>
Acrylamidlösung 30% (Rotiphorese®)	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD</i>	Polymeres Trennmaterial
Agar	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt, BRD</i>	Polymeres Trennmaterial
Agarose	<i>Biozym Scientific, Oldendorf, BRD</i>	Polymeres Trennmaterial
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	<i>Merck KGaA, Darmstadt, BRD</i>	Polymerisationsinitiator
Bovines Serumalbumin (BSA)	<i>Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, BRD</i>	Proteinstandard
Bovines Fötenserum (FBS)	<i>Life Technologies, Darmstadt, BRD</i>	Wachstumsfaktorhaltige Lösung
Bromphenolblau	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD</i>	Farbstoff
Calciumdichlorid (CaCl₂)	<i>Merck KGaA, Darmstadt, BRD</i>	Transformationskatalysator
cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD</i>	Protease-Inhibitor
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt, BRD</i>	Gefrierschutzmittel
Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)	<i>Merck KGaA, Darmstadt, BRD</i>	Pufferbestandteil
Essigsäure (CH₃COOH)	<i>Merck KGaA, Darmstadt, BRD</i>	Pufferbestandteil
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD</i>	Komplexbildner und Pufferbestandteil
Ethanol (C₂H₆O)	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt, BRD</i>	Lösungsmittel
Ethidiumbromidlösung	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD</i>	UV-sensitive, fluoreszierende, DNA-Interkalanz

Glucose	<i>Merck KGaA, Darmstadt, BRD</i>	Nährstoff
Glycerin	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD</i>	Stabilisator, Kryoprotektor
Glycin	<i>Merck KGaA, Darmstadt, BRD</i>	Nährstoff, Puffersubstanz
Hefeextrakt	<i>Merck KGaA, Darmstadt, BRD</i>	Nährstoff
Isopropanol (C₃H₈O)	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt, BRD</i>	Lösungsmittel
Kaliumacetat (CH₃CO₂K)	<i>Merck KGaA, Darmstadt, BRD</i>	Pufferbestandteil
Kaliumchlorid (KCl)	<i>VWR International LLC, Radnor, USA</i>	Pufferbestandteil
β-Mercaptoethanol (C₂H₆OS)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD</i>	Reduktionsmittel von Disulfidbrücken
Magnesiumchlorid (MgCl₂)	<i>Merck KGaA, Darmstadt, BRD</i>	Pufferbestandteil, Enzymmodulator
Methanol (CH₃OH)	<i>Merck KGaA, Darmstadt, BRD</i>	Lösungsmittel
Magermilchpulver blotting grade	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD</i>	Proteinstandard
Natriumcarbonat (Na₂CO₃)	<i>Merck KGaA, Darmstadt, BRD</i>	Pufferbestandteil
Natriumchlorid (NaCl)	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt, BRD</i>	Pufferbestandteil
Natriumdodecylsulfat (SDS)	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD</i>	Linearisierung von Proteinen
Natriumhydroxid (NaOH)	<i>Merck KGaA, Darmstadt, BRD</i>	Pufferbestandteil
Nonoxinol 40 (NP-40)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD</i>	Zellmembrandetergenz
Polybrene	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD</i>	Kationisches Polymer
Polyethylenglykol 4000 (PEG4000)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD</i>	Hydrophiles Polymer
ProLongTM Gold	<i>Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA</i>	Fotoprotektor
Schwefelsäure (H₂SO₄)	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt, BRD</i>	Pufferbestandteil
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD</i>	Polymerisationsinitiator
Tris-HCl	<i>Merck KGaA, Darmstadt, BRD</i>	Pufferbestandteil

Triton™X-100	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD</i>	Zellmembrandetergenz
Trypan Blue Dye 0,4%	<i>Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA</i>	Proteinfarbstoff
Trypsin/EDTA (0,5/ 0,2%ig in PBS)	<i>Thermo Scientific, St.Leon-Rot, BRD</i>	Protease
Trypton	<i>Merck KGaA, Darmstadt, BRD</i>	Nährstoff
TurboFect™	<i>Thermo Scientific, St.Leon-Rot, BRD</i>	Kationische Transfektionsagenz
Polysorbat 20 (Tween)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD</i>	Membrandetergenz
Orange G	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD</i>	DNA/RNA-Farbstoff

Aus Tabelle 5 geht die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Nährmedien hervor. Falls kein Hersteller angegeben wurde, wurden die Substanzen selbstständig hergestellt.

Tabelle 5: Puffer und Nährmedien

<u>Puffer/Nährmedium</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Hersteller</u>
DMEM (-/-) Dulbecco's modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine	s. Herstellerangaben	<i>Life Technologies, Darmstadt und PAA Laboratories GmbH, Cölbe, BRD</i>
FACS-Puffer	1% BSA in sterilem PBS	
Lämmli-Puffer	0,0625 M Tris-HCl; pH 8,8; 10% Glycerol; 20% SDS; 5% β-Mercaptoethanol; Bromphenolblau	
lysogeny broth (LB)-Medium	1% NaCl, 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt, H ₂ O	AG Scheller
lysogeny broth (LB)- Platten	1% NaCl; 2% Agar; 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; H ₂ O	AG Scheller
Loading-Dye Solution 6x	30% Glycerol, 50 mM EDTA, Orange G, pH 8	<i>Thermo Scientific, St.Leon-Rot, BRD</i>
phosphate buffered saline (PBS)	137 mM NaCl; pH 7,4; 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 2,7 mM KCl; H ₂ O	

S1-Puffer	50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl; pH 8,0; 10 mM EDTA; 1:1000 RNase	Doreen Floss
S2-Puffer	0,2 mM NaOH; 1% SDS; <i>ad</i> 100 ml H ₂ O	Doreen Floss
S3-Puffer	60 ml 5 M Kaliumacetat; 11,5 ml Essigsäure; <i>ad</i> 100 ml H ₂ O	Doreen Floss
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl; pH 8,25; 192 mM Glycin	
SDS-Transferpuffer	2,5 mM Tris-HCl; pH 8,0; 19,2 mM Glycin; 0,01% SDS; 20% Methanol	
<i>stripping</i> Puffer	62,5 mM Tris; 2% SDS; 0,1% β-Mercaptoethanol	
TBS	200 mM Tris pH 7,5; 5 M NaCl	
TBS-T	TBS; 0,5% Tween	
TAE-Puffer	2 M Tris, 100 mM EDTA in H ₂ O, pH 8	

Ergänzend ist zu nennen, dass DMEM(-/-) nach Zugabe von 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FBS als DMEM(+/-) bezeichnet wird.

Folgende Antibiotika dienen der Selektion transfizierter Bakterien und eukaryotischer Zellen:

Tabelle 6: Antibiotika

<u>Antibiotikum</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Firma</u>
Ampicillin	100 µg/ml	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD</i>
Hygromycin B	1 mg/ml	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe, BRD</i>
Kanamycin	25 µg/ml	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD</i>
Penicillin + Streptomycin	10000 U Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin	<i>Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, BRD</i>
Puromycin	1,5 µg/ml	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe, BRD</i>

2.1.2 DNA-Moleküle

Plasmide sind ringförmige DNA-Moleküle, die physiologisch in Bakterien und einzelligen Eukaryoten vorkommen. Sie kodieren häufig für Proteine, die eine Antibiotikaresistenz vermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Plasmide verwendet, um gezielt genetische Informationen auf Bakterien oder Zellen zu übertragen. Zur *in silico* Konstruktion neuer Vektoren wurde die Software *pDRAW32* (*freeware*, www.acaclone.com) verwendet. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide ist der Tabelle 7 zu entnehmen:

Tabelle 7: Plasmide

<u>Name</u>	<u>Vektortyp</u>	<u>Resistenz</u>	<u>Herstellung</u>
pCR-Script	Klonierungsvektor	Ampicillin	<i>Stratagene, Agilent Technologies, La Jolla, USA</i>
pcDNA3.1	eukaryotischer Expressionsvektor	Ampicillin	<i>Invitrogen, Carlsbad, USA</i>
pcDNA3.1_hCIB2-3xFLAG	eukaryotischer Expressionsvektor	Ampicillin	Franz Christian Horstmeier
pcDNA3.1_hCIB2-GFP	eukaryotischer Expressionsvektor	Ampicillin	Franz Christian Horstmeier
pEGFP N1	eukaryotischer Expressionsvektor	Ampicillin, Kanamycin, Neomycin	<i>Takara Bio USA Inc., Mountain View, USA</i>
p409	eukaryotischer Expressionsvektor	Ampicillin	(182)
p409-hIL-23R(E444K)-P310	eukaryotischer Expressionsvektor	Ampicillin	Doreen Floss
p409-mIL-23R	eukaryotischer Expressionsvektor	Ampicillin	Doreen Floss
p409-mIL-23R-gp130	eukaryotischer Expressionsvektor	Ampicillin	Doreen Floss
p409-hIL-23R(E444K)-P310-mCherry	eukaryotischer Expressionsvektor	Ampicillin	Franz Christian Horstmeier
p409-mIL-23R-mCherry	eukaryotischer Expressionsvektor	Ampicillin	Franz Christian Horstmeier
p409-mIL-23RΔ503	eukaryotischer Expressionsvektor	Ampicillin	Doreen Floss
p409-mIL-23R^{Y416F}504^FΔ541	eukaryotischer Expressionsvektor	Ampicillin	Doreen Floss

pMOWS-puro	Retroviraler Expressionsvektor	Puromycin	(183)
pMOWS-puro-GFP	Retroviraler Expressionsvektor	Puromycin	Doreen Floss
pMOWS-puro_hIL-23R(E444K)-P310-mCherry	Retroviraler Expressionsvektor	Puromycin	Franz Christian Horstmeier
pMOWS-hygro	Retroviraler Expressionsvektor	Hygromycin	(184)

Oligonukleotide sind kurze, lineare Nukleinsäureketten. Sie dienen in dieser Arbeit hauptsächlich als Primer in der Polymerasekettenreaktion und stammen von *Eurofins MWG Operon GmbH* (Ebersberg, BRD). Eine Übersicht ist Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Oligonukleotide

<u>Name</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz 5'-3'</u>
DF7	oligo dT (18mer)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
DF97	5' mGAPDH	GAAGGGCTCATGACCACAGT
DF98	3' mGAPDH	CATTGTCATACCAGGAAATGAGCT
DF155	hIL23R-Not rev	CTGCGGCCGCCTTTTCCAAGAGTGAAATCC
DF210	cIL23R_delta RP	GACTGCGGCCGCTACAACGTAGTATTG
DF249	gp130-Not-R	TCTGCGGCCGCCTGAGGCATGTAGCCG
DF323	23R-gp130-SOE-FP	GATTGGGATATTTAATAAGCGAGACCTAATTA
DF479	hIL23R-SnaBI-FP	GCCAAACATTAAGTACGTATTTCAAGTGAG
DF480	hIL23R-130-SOE-R	CTCGCTTATTAATATCCCAATCAAAGAAAGAATTG
DF481	hIL23R-130-SOE F2	CGTGGTACACAGTGGATATAAACCCCAAATTC
DF482	hIL23R-130-SOE R2	TATATCCACTGTGTACCACGGTAGAATACTGGA
DF483	CIB2 fwd	CTTCAATAAGAAGGACATCCTCAAGC

DF484	CIB2 rev	GTCAGCAAAGCCCAGCTTG
--------------	----------	---------------------

Weiterhin fanden im Rahmen des PCR-Verfahrens Desoxynukleosidtriphosphate (*dNTP Mix*) der Firma *Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland* (Bonn, BRD) Verwendung.

2.1.3 Bakterienstämme und Zelllinien

Für die Vermehrung von Plasmiden wurde ein spezieller Stamm der gram-negativen Bakterienspezies *Escherichia coli* genutzt. Dieser trägt die Bezeichnung XL1-blue und sein Genotyp ist exakt beschrieben (endA1 gyrA96 (nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB+ lacIqϕ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)). Der Bakterienstamm wurde von *Stratagene (Agilent Technologies Inc., La Jolla, USA)* hergestellt.

In Tabelle 9 werden die verwendeten Zelllinien aufgeführt, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Bezeichnungen, die auf einen Unterstrich folgen, verdeutlichen, dass die jeweilige Zelllinie stabil mit dem jeweiligen Gen transfiziert wurde (Beispiel: ab_c_d bezeichnet, dass die Zelllinie „ab“ mit den Genen „c“ und „d“ transfiziert wurde).

Tabelle 9: Zelllinien

<u>Name</u>	<u>Zellart</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Medium</u>
A549 (ACC 107)	adhärente humane Adenokarzinomzelllinie	(185)	DMEM (+/+)
Ba/F3-gp130 (ACC 300)	suspensible murine prä-B-Zelllinie, die abhängig von IL-3 und HIL-6 proliferiert	<i>Immunex Inc.</i> (Seattle, USA)	DMEM (+/+) + 10 ng/ml HIL-6
Ba/F3-gp130_hIL-12Rβ1	s. Ba/F3-gp130	(186)	DMEM (+/+) + 10ng/ml HIL-6
Ba/F3-gp130_hIL-12Rβ1_hIL-23R	s.o., wächst desweiteren unter Stimulation durch humanes und murines HIL-23	(186)	DMEM (+/+) + 10 ng/ml HIL-6
Ba/F3-gp130_mIL-12Rβ1	s. Ba/F3-gp130	(47)	DMEM (+/+) + 10 ng/ml HIL-6
Ba/F3-gp130_mIL-12Rβ1_mIL-23R	s. Ba/F3-gp130 wächst unter Stimulation durch murines HIL-23	(47)	DMEM (+/+) + 10 ng/ml HIL-6

Ba/F3-gp130_mIL-12Rβ1_mIL-23R-gp130_IZD	s. Ba/F3-gp130	(187)	DMEM (+/+) + 10 ng/ml HIL-6
CHO-K1 (ACC 110)	Adhärente ovarielle Epithelzellen des chinesischen Hamsters (<i>Cricetulus griseus</i>)	Leibniz-Institut, DMSZ Braunschweig, BRD	DMEM (+/+)
COS-7 (ACC 60)	Fibroblastenähnliche Zelllinie aus Nierengewebe der afrikanischen grünen Meerkatze (<i>Chlorocebus</i>)	(188)	DMEM (+/+)
HEK293 (ACC 305)	Menschliche embryonale Nierenzellen	(189)	DMEM (+/+)
HeLa (ACC 57)	Menschliche Zervixkarzinomzellen	(190)	DMEM (+/+)
Phoenix-Eco (basierend auf 293T ACC 635)	Semiadhärente humane embryonale Nierenzellen mit retroviraler Verpackungsfunktion	DKFZ, Ursula Klingmüller (Heidelberg, BRD) (183)	DMEM (+/+)
U4C (basierend auf HT-1080 ACC 315)	Adhärente humane Fibrosarkomzellen mit JAK1-Defizienz	(191)	DMEM (+/+)

2.1.4 Bioaktive Peptide und Proteine

Die für die Zellkultur notwendigen Zytokine entstammen der AG Scheller. HIL-6 und HIL-23 wurden von stabil transfizierten CHO-K1-Zellen sezerniert, der konditionierte Zellkulturüberstand wurde entnommen. Anschließend wurde der proteinreiche Zellkulturüberstand isoliert, die Konzentration der Zytokine bestimmt und in einer Konzentration von 10 ng/ml verwendet.

Antikörper sind Proteine, die gezielt körperfremde Strukturen binden. In dieser Arbeit wurden sie genutzt, um gezielt Strukturen zu detektieren. Die folgenden Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 10: Verwendete Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Konzentration der Stammlösung</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Verwendung</u>
APC-Streptavidin (554067)	<i>BD Bioscience GmbH</i> , Heidelberg, BRD	0,2 mg/ml	1:100	Durchflusszytometrie

α-FLAG-Affinitätsgel (ANTI-FLAG® M2-Affinitätsgel, A2220)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD</i>	k.A.	1:1000	Immunopräzipitation
α-humaner IL-23R biotinyliert (BAF 1400)	<i>R&D Systems Inc., Minneapolis, USA</i>	0,2 mg/mL	1:1000	Western Blot
Kaninchen- α-humanes CIS3/SOCS-3 IgG (C005)	<i>IBL International GmbH, Hamburg, BRD</i>	k.A.	1:1000	Western Blot
Kaninchen- α-FLAG (F7425)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD</i>	0,8 mg/ml	1:200	Western Blot
Kaninchen- α-humaner IL-12Rβ1	<i>Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA</i>	0,2 mg/ml	1:40	Durchflusszytometrie
Kaninchen- α-Phospho-STAT3 Tyr 705 IgG (MAB 9145)	<i>Cell Signaling Technology Co., Danvers, USA</i>	k.A.	1:1000	Western Blot
Maus- α-STAT3 (MAB 9139)	<i>Cell Signaling Technology Co., Danvers, USA</i>	k.A.	1:1000	Western Blot
Ratte- α-humaner IL-23R biotinyliert	<i>R&D Systems Inc., Minneapolis, USA</i>	0,2 mg/ml	1:40	Durchflusszytometrie
Ratte- α-muriner IL-23R biotinyliert (MAB 16861A)	<i>R&D Systems Inc., Minneapolis, USA</i>	0,2 mg/ml	1:20	Durchflusszytometrie
Ratte- α-Tubulin A1B (SM568P)	<i>OriGene Technologies Inc., Rockville, USA</i>	1 mg/ml	1:500	Konfokalmikroskopie
Ziege- α-muriner IL-23R biotinyliert	<i>R&D Systems Inc., Minneapolis, USA</i>	0,2 mg/ml	1:1000	Western Blot
Ziege- α-Maus IgG Peroxidase (POD)-gekoppelt	<i>Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA</i>	2 mg/ml	1:2000	Western Blot
Ziege- α-Kaninchen IgG POD-gekoppelt	<i>Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA</i>	0,4 mg/ml	1:2000	Western Blot
Ziege α-muriner-IL-12Rβ1 Phycoerythrin (PE)- konjugiert (FAB 1998)	<i>R&D Systems Inc., Minneapolis, USA</i>	50 μ g/ml	1:10	Durchflusszytometrie

Ziege- α -Ratte IgG Alexa Fluor 647 konjugiert	<i>Dianova GmbH,</i> Hamburg, BRD	1,6 mg/ml	1:100	Durchflusszytometrie
Ziege- α -Ratte IgG Alexa Fluor 633- konjugiert	<i>Thermo Fischer Scientific Inc.,</i> Waltham, USA	1 mg/ml	1:1000	Konfokalmikroskopie
Streptavidin-HRP (Meerrettichperoxidase- gekoppelt) (890803)	<i>R&D Systems Inc.,</i> Minneapolis, USA	k.A.	1:1000	Western Blot

In Tabelle 11 sind die rekombinanten Enzyme sowie spezifischen Puffer aufgelistet, welche im Rahmen dieser Arbeit Verwendung fanden.

Tabelle 11: Verwendete Enzyme und Puffer

<u>Funktion</u>	<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
DNA-Ligase	<i>T4 DNA Ligase</i>	<i>Thermo Scientific, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, BRD</i>
DNA-Ligasepuffer	<i>T4 DNA Ligase Buffer (10x)</i>	<i>Thermo Scientific, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, BRD</i>
DNA-Polymerase und 5'-3'- Exonuklease	<i>Phusion®</i>	<i>Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, BRD</i>
DNA-Polymerase und 5'-3'- Exonuklease	<i>Pfu</i>	<i>Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, BRD</i>
DNA-Polymerase	<i>DreamTaq™</i>	<i>Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, BRD</i>
DNA-Polymerase- und 5'-3'- Exonukleasepuffer	<i>Phusion® GC buffer</i>	<i>Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, BRD</i>
DNA-Polymerase- und 5'-3'- Exonukleasepuffer	<i>Pfu Buffer</i>	<i>Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, BRD</i>
DNA-Polymerase- und 5'-3'- Exonukleasepuffer	<i>DreamTaq™ Puffer</i>	<i>Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, BRD</i>
Phosphatase	<i>FastAP™</i>	<i>Thermo Scientific, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, BRD</i>
Phosphatasepuffer	<i>FastAP™ Buffer</i>	<i>Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, BRD</i>
Polynukleotidkinase	<i>T4 PNK</i>	<i>Thermo Scientific, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, BRD</i>

Reverse Transkriptase	<i>RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase</i>	<i>Thermo Scientific, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, BRD</i>
Reverse Transkriptase Puffer	<i>RevertAid™ 5xRT Buffer</i>	<i>Thermo Scientific, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, BRD</i>

Neben den aufgeführten Enzymen wurden außerdem Restriktionsenzyme mit spezifischen Puffern verwendet, welche von der Firma *Thermo Scientific, Fermentas GmbH* (St. Leon-Rot, BRD) stammten.

2.1.5 Sonstige Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 12 sind die verwendeten Verbrauchsgegenstände aufgelistet.

Tabelle 12: Genutzte Verbrauchsgegenstände

<u>Material</u>	<u>spezifische Angaben</u>	<u>Hersteller</u>
Einmal-Zählkammer		<i>PEQLAB Biotechnologie GmbH, VWR International LLC, Radnor, USA</i>
Filter-Papier (<i>Whatman®</i>)		<i>VWR International LLC, Radnor, USA</i>
Kryoröhrchen (<i>CryoTubes™</i>)	1,8 ml	<i>VWR International LLC, Radnor, USA</i>
Nitril-Handschuhe (<i>MICRO-TOUCH®</i>)	Größe L	<i>Ansell Ltd., Brüssel, Belgien</i>
PCR-Gefäße und -Kappen	0,2 ml	<i>STARLAB International GmbH, Hamburg, BRD</i>
Pipettenspitzen (<i>TipOne®</i>)	10 µl, 20 µl, 200 µl, 500 µl, 1000 µl	<i>STARLAB International GmbH, Hamburg, BRD</i>
PVDF-Transfermembranen (<i>Rott®</i>)		<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD</i>
Reaktionsgefäße (<i>CELLSTAR®</i> Polypropylen Röhrchen)	15 ml, 50 ml	<i>Greiner Bio-One GmbH, Solingen, BRD</i>
Reaktionsgefäße (<i>Reagiergefäße</i>)	1,5 ml	<i>Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland</i>
Reaktionsgefäße (<i>Safe-Lock</i>)	0,5 ml; 2 ml	<i>Eppendorf AG, Hamburg, BRD</i>
Zellkulturplatten (adhärent)	6-Well	<i>TPP AG, Trasadingen, Schweiz</i>
Zellkulturplatten (<i>CytoOne®</i>)	6-Well, 96-Well	<i>STARLAB International GmbH, Hamburg, BRD</i>
Zellkulturschalen (adhärent)	60,1 cm ²	<i>TPP AG, Trasadingen, Schweiz</i>

Zellkulturschalen (CELLSTAR®)	58 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Solingen, BRD
----------------------------------	--------------------	-------------------------------------

2.1.6 Geräte

Aus Tabelle 13 gehen die verwendeten Geräte hervor.

Tabelle 13: Genutzte Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Agarosegelelektrophorese System (<i>Mini-Sub® Cell GT Horizontal Electrophoresis System</i>)	<i>Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA</i>
Akku-Pipettierhelfer (<i>Pipetus®</i>)	<i>Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, BRD</i>
Analysewaage (110M-300C)	<i>Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz</i>
Autoklav (<i>Laboklav 25</i>)	<i>SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloß, BRD</i>
CO₂-Inkubator (<i>HERAcell® 150</i>)	<i>Thermo Scientific, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, BRD</i>
Durchflusszytometer (<i>BD FACS Canto II</i>)	<i>BD Bioscience GmbH, Heidelberg, BRD</i>
Fluoreszenzmikroskop (<i>BZ-9000</i>)	<i>Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, BRD</i>
Inkubationsschüttler (<i>Multitron®</i>)	<i>Infors AG, Bottmingen, Schweiz</i>
Konfokalmikroskop (<i>LSM510-Meta confocal microscope</i>)	<i>Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, BRD</i>
Kühlschrank	<i>Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen, BRD</i>
Kühlzentrifugen (<i>5417 R und 5810 R</i>)	<i>Eppendorf AG, Hamburg, BRD</i>
Lichtmikroskop (<i>KL 1500 LCD</i>)	<i>Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, BRD</i>
Magnetrührer (mit Heizfunktion)	<i>Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, BRD</i>
Messpipetten	<i>Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, BRD</i>
Mikropipetten (<i>Research®</i>)	<i>Eppendorf AG, Hamburg, BRD</i>
Mikrowelle	<i>Moulinex, Groupe SEB S.A., Écully, Frankreich</i>
Minizentrifuge	<i>Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern, BRD</i>
Multimode-Platten-Reader (<i>Infinite® 200 PRO plate reader</i>)	<i>Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, BRD</i>
pH-Meter	<i>Sartorius Werkzeuge GmbH & Co. KG, Ratingen, BRD</i>
Rollenmischer (<i>Stuart® SRT9</i>)	<i>Cole-Parmer Ltd., Staffordshire, UK</i>

Schüttelwasserbad (<i>sw21</i>)	<i>JULABO GmbH, Seelbach, BRD</i>
SDS Gelelektrophorese System (<i>Mini-PROTEAN® Tetra Cell</i>)	<i>Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA</i>
SDS Western Blot Imager (<i>ChemoCam Imager</i>)	<i>Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, BRD</i>
SDS Western Blot Transfer System (<i>Trans-Blot® Turbo™</i>)	<i>Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA</i>
Sicherheitswerkbank	<i>Thermo Scientific, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, BRD</i>
Spannungsquelle (<i>PowerPac™ Basic Power Supply</i>)	<i>Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, USA</i>
Spektrophotometer (<i>NanoDrop® ND-1000</i>)	<i>Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA</i>
Thermocycler (<i>peqSTAR 2x</i>)	<i>VWR International LLC, Radnor, USA</i>
Ultratiefkühlschränke (<i>FORMA™</i>)	<i>Thermo Scientific, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, BRD</i>
UV-Tisch	<i>Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, BRD</i>
UV-Transluminator (<i>Gel iX Imager</i>)	<i>Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, BRD</i>
Vortex Schüttler	<i>neoLab Migge GmbH, Heidelberg, BRD</i>
Wechselblock/ Heizblock (<i>Thermomixer® comfort</i>)	<i>Eppendorf AG, Hamburg, BRD</i>
Zellzähler (<i>TC10™ Automated Cell Counter</i>)	<i>Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA</i>
Zentrifuge (5424)	<i>Eppendorf AG, Hamburg, BRD</i>

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Plasmide können mittels eines kurzen Hitzeschocks und hohen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen in kompetente Bakterienzellen transferiert werden. Weil *E. coli* keine natürliche Transformationskompetenz aufweisen, wurden diese zunächst in chemisch-kompetente XL1-blue Zellen umgewandelt. Dafür wurden 5 ml einer Übernachtskultur in 500 ml LB-Medium unter 37 °C bis zu einer spektrophotometrisch-bestimmten, optischen Dichte von 0,6 bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) inkubiert. Folgend wurde die Kultur pelletiert (4 °C, 5000 rpm, 15 Minuten) und das Zellpellet in 140 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung (50 mM) resuspendiert. Der Ansatz wurde für 20 Minuten auf Eis inkubiert und ein weiteres Mal pelletiert (4 °C, 5000 rpm, 15 Minuten). Anschließend wurde das Zellpellet in 25 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung mit 10 % Glycerin resuspendiert und pelletiert (4 °C, 5000 rpm, 15 Minuten). Final wurde das Zellpellet in 2 ml CaCl_2 -Lösung mit 10 % Glycerin resuspendiert, aliquotiert und in Flüssigstickstoff bei -80 °C gelagert.

XL1-blue Zellen konnten anschließend mittels Hitzeschock transformiert werden. Dafür wurde pro Ansatz ein Aliquot kompetenter Zellen mit DNA (1 μl Plasmid oder 10 μl Ligationsprodukt) vermischt und 5 Minuten lang auf Eis inkubiert. Dann erfolgte die 1-minütige Hitzeschockbehandlung auf einem Heizblock bei 42 °C. Anschließend wurden die Ansätze 5 Minuten auf Eis inkubiert und danach mit 500 μl vorgewärmtem LB-Medium für 60 Minuten bei 37 °C und kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Final wurde ein Teil der Bakterienlösung auf LB-Platten mit einem spezifischen Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2 Isolation von Plasmid-DNA

Um den Erfolg einer Transformation zu analysieren, wurde mithilfe der *Minipräparation* Plasmid-DNA isoliert. Dafür wurden drei unterschiedliche Pufferlösungen verwendet, namentlich S1, S2 und S3 (s. Tabelle 5). S1 diente der Resuspension und dem Verdau von RNA, S2 der alkalischen Lyse und S3 der Neutralisation des pH-Werts sowie der Denaturierung bakterieller Proteine und chromosomaler DNA.

Zu Beginn wurde eine Bakterienkolonie mit einem Selektionsantibiotikum in 2 ml LB-Medium aufgenommen und über Nacht inkubiert (37 °C, 140 rpm). Am nächsten Morgen wurden 1500 μl des Ansatzes pelletiert (Raumtemperatur, 5000 rpm, 5 Minuten) und das Zellpellet in 100 μl eiskalter S1-Lösung resuspendiert. Anschließend wurden 200 μl S2 hinzugegeben und circa

5 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden 150 µl S3 hinzugegeben und der Ansatz 10 weitere Minuten inkubiert. Folgend wurde der Ansatz bei 4 °C und 13000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Um die DNA auszufällen wurde der Überstand mit 900 µl reinem Ethanol versetzt und pelletiert (4 °C, 13000 rpm, 10 Minuten). Die DNA wurde in 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Das DNA-Pellet wurde abschließend in 30 µl H₂O resuspendiert.

Um ein Plasmid in großen Mengen und mit hohem Reinheitsgrad zu isolieren, wurde eine *Midipräparation* durchgeführt. Eingesetzt wurde dabei das *NucleoBond Xtra Midi/ Maxi*-Kit der Firma *Machery-Nagel GmbH&Co.KG* (Düren, BRD).

Für die *Midipräparation* wurde zunächst eine Bakterienkolonie in 100 ml LB-Medium inklusive spezifischem Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Bakterienlösung bei 13000 rpm und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und anschließend nach Herstelleranweisung isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde final in 100 µl destilliertem H₂O gelöst.

2.2.3 Agarosegelelektrophorese zur größenspezifischen Trennung von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente hinsichtlich ihrer Größe zu untersuchen, wurde das Verfahren der Agarosegelelektrophorese genutzt. Zugrunde liegt dabei das Prinzip, dass DNA-Fragmente größenabhängig mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch die gitterähnliche Struktur eines Agarosegels wandern und anschließend mittels der DNA-Interkalanz Ethidiumbromid visualisiert werden können.

Vor Versuchsbeginn wurde ein Agarosegel gegossen. Dafür wurden 1-2 % Agarose in TAE aufgekocht, anschließend in einen passenden Gelständer gegossen und sofort mit 0,001 % Ethidiumbromid versetzt. Die DNA-Proben wurden mit *Loading-Dye Solution 6x* versetzt, in die Taschen des Gels gegeben und bei einer konstanten Spannung von 100 V nach ihrer Größe voneinander getrennt. Nach Beendigung des Laufs wurde die DNA mithilfe eines UV-Transluminators sichtbar gemacht und per Kamera dokumentiert. Als Größenstandard dienten normierte Marker der Firma *Thermo Scientific, Fermentas GmbH* (St.Leon-Roth, BRD), welche ebenfalls auf das Gel aufgetragen wurden. Diese tragen folgende Bezeichnungen:

GeneRuler Express DNA ladder (100-5000 bp),
GeneRuler 1 kb DNA ladder (250-10000 bp) und
GeneRuler 50 bp DNA ladder (50-1000 bp).

2.2.4 DNA-Reinigung nach Agarosegelelektrophorese

Zur Isolation von DNA-Fragmenten nach einer Agarosegelelektrophorese wurde der *NucleoSpin Extract II-Kit* (Machery-Nagel GmbH&Co.KG, Düren, BRD) verwendet. Gelelektrophoreseprodukte wurden dafür unter UV-Durchleuchtung mithilfe eines Skalpell aus dem restlichen Agarosegel geschnitten. Es folgte die Isolation nach Herstellerangaben und die Lösung in 30 µl H₂O.

2.2.5 Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA an spezifischen palindromischen Basensequenzen schneiden und dabei glatte, doppelsträngige Enden (*blunt ends*) oder kohäsive, einzelsträngige Enden (*sticky ends*) hinterlassen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden analytische und präparative Restriktionsspaltungen durchgeführt.

Folgender Versuchsansatz wurde für eine analytische Spaltung verwendet und für mindestens 2 Stunden bei 37 °C inkubiert:

0,5 µl Enzym (*Thermo Scientific, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, BRD*)

2 µl spezifischer 10x Puffer (*Thermo Scientific, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, BRD*)

2 µl Plasmid-DNA (bei *Midipräparation* 1:10 verdünnt)

ad 20 µl H₂O.

Anschließend terminierte eine 20-minütige Inkubation bei 65 °C die Restriktion. Nach Zugabe von *Loading-Dye Solution 6x* wurde der Restriktionsansatz mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert (s. Abschnitt 2.2.3).

Präparative Restriktionsspaltungen wurden nach gleichem Prinzip, jedoch mit 5-10 µg DNA und unter einer 12-stündigen Inkubation bei 37 °C durchgeführt.

2.2.6 Nukleinsäurequantifizierung

Mit dem *NanoDrop® ND-1000* wurde die DNA-Konzentration einer untersuchten Probe spektrophotometrisch bestimmt. Dabei wurde UV-Strahlung eines definierten Spektrums durch die Probe gesandt und anschließend gemessen. Da Nukleinsäuren mittels aromatischer Ringe einen Teil der Strahlung absorbieren, konnte unter Berücksichtigung des Lambert-Beer'schen Gesetzes, aus der Intensität des UV-Strahls auf die vorliegende DNA-Konzentration rückgeschlossen werden. Mithilfe des Verhältnisses der UV-Absorption bei den Wellenlängen 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen), 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und

230 nm (Absorptionsmaximum von Kohlenhydraten) wurde die Reinheit der jeweiligen Probe bestimmt.

2.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um einen definierten DNA-Abschnitt (*template*) *in vitro* zu amplifizieren, wurde die Polymerasekettenreaktion verwendet (192). Neben dem *template* bestand der Versuchsaufbau aus einer hitzestabilen DNA-Polymerase mit spezifischem Puffermedium, Desoxyukleosidtriphosphaten (dNTP's) und zwei Primern. Letztere sind Oligonukleotide, die sequenzspezifisch an das *template* binden und als Start- und Ansatzpunkt für die DNA-Polymerase dienen.

Im Rahmen des **Standard-PCR-Ansatzes** wurden zwei unterschiedliche hitzestabile DNA-Polymerasen verwendet, namentlich *Phusion*[®] und *Pfu*, wobei beide ähnlich effizient, erstere aber etwas schneller arbeitete. Tabelle 14 verdeutlicht den Standard-PCR-Ansatz, der in dieser Arbeit verwendet wurde.

Tabelle 14: Standard-PCR-Ansatz mittels *Phusion*[®] und *Pfu* Polymerase

Inhaltsstoff	Konzentration
<i>GC Buffer</i> bei <i>Phusion</i> [®] ; <i>Pfu Buffer</i> bei <i>Pfu</i>	5 µl (<i>Phusion</i> [®] <i>GC Buffer</i>) oder 10 µl (<i>Pfu Buffer</i>) pro Ansatz
<i>dNTP-Mix</i>	250 µM
<i>forward</i> Primer	0,5 µM
<i>reverse</i> Primer	0,5 µM
<i>Phusion</i> [®] oder <i>Pfu</i>	1,25 U (<i>Pfu</i>) oder 2,5 U (<i>Phusion</i> [®]) pro Ansatz
Plasmid-DNA	1 pg – 10 ng /Ansatz
H ₂ O	<i>ad</i> 50 µl

Zur Kontrolle transformierter Klone hinsichtlich der Expression eines spezifischen DNA-Abschnitts wurde eine Sonderform des PCR-Verfahrens genutzt, die **Colony-PCR**. Dabei wurden die Klone markiert, mithilfe einer Pipettenspitze angepickt und in ein PCR-Gefäß mit 20 µl H₂O gegeben. Die Spitze wurde dem Klon entsprechend gekennzeichnet und in einem mit LB-Medium gefüllten Reaktionsgefäß bei 4 °C aufbewahrt, um im Falle eines positiven Ergebnisses der Erstellung einer Übernachtskultur zu dienen. Das PCR-Gefäß wurde initial für 10 Minuten bei 95 °C

inkubiert, um die Bakterien abzutöten. Anschließend wurden dem PCR-Ansatz weitere Substanzen (s. Tabelle 15) hinzugegeben.

Tabelle 15: Colony-PCR-Ansatz mittels *Dream Taq* Polymerase

Inhaltsstoff	Konzentration
<i>DreamTaq</i> TM Puffer 10x	5 µl /Ansatz
<i>dNTP-Mix</i>	250 µM
<i>forward</i> Primer	0,5 µM
<i>reverse</i> Primer	0,5 µM
<i>DreamTaq</i> TM	0,2 U/Ansatz
MgCl ₂	2,5 mM
H ₂ O	ad 50 µl

Alle PCR-Verfahren fanden mithilfe eines *Thermocyclers* in 30 bis 40 temperaturabhängigen Zyklen statt. Tabelle 16 zeigt die schematischen Abläufe des PCR-Verfahrens der Standard- sowie der *Colony*-PCR. Abschließend wurde zwecks Erfolgskontrolle stets eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.3).

Tabelle 16: Ablauf der PCR mittels *DreamTaq*TM, *Pfu* und *Phusion*[®]

	Phase 0: Initiale Denaturierung	Phase 1: Denaturierung	Phase 2: Annealing	Phase 3: Elongation	Phase 4: Finale Elongation
Gewünschter Prozess	Initiale Spaltung von DNA-Doppelsträngen in Einzelstränge	Spaltung von DNA-Doppelsträngen in Einzelstränge	Komplementäre Bindung von Primern an die Einzelstränge	Verlängerung der ursprünglichen Primer durch Polymerase zu Tochtersträngen	Finale Verlängerung der synthetisierten Stränge
Temperatur	95 °C (<i>Pfu</i> und <i>DreamTaq</i> TM) oder 98 °C (<i>Phusion</i> [®])	95 °C (<i>Pfu</i> - und <i>DreamTaq</i> TM) oder 98 °C (<i>Phusion</i> [®])	55 – 60 °C	72 °C	72 °C
Dauer	4 Minuten (<i>Phusion</i> [®]) oder 5 Minuten (<i>Pfu</i> und <i>DreamTaq</i> TM)	15 Sekunden (<i>Phusion</i> [®]) oder 1 Minute (<i>Pfu</i> und <i>DreamTaq</i> TM)	30 Sekunden (<i>Phusion</i> [®]) oder 1 Minute (<i>Pfu</i> - und <i>DreamTaq</i> TM)	45 Sekunden (<i>Phusion</i> [®]) oder 2 Minuten (<i>Pfu</i> - und <i>DreamTaq</i> TM)	5 Minuten (<i>Pfu</i> - und <i>DreamTaq</i> TM) oder 10 Minuten (<i>Phusion</i> [®])
Wiederholungen	1	30-40	30-40	30-40	1

Um gezielt den endständigen Teil einer Rezeptor-cDNA zu entfernen, wurde das Verfahren der **Deletions-PCR** genutzt. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass der zu entfernende Rezeptoranteil von dem Primer-Paar nicht umgeben wurde. Aufbau und Ablauf entsprachen den in den Tabellen 14 und 16 angegebenen Schemata.

Für die Herstellung von Fusions-cDNA wurde das Verfahren der **SOE-PCR** (*splicing by overlapping extension-PCR*) verwendet. Das Verfahren bestand aus zwei nacheinander ablaufenden PCR-Schritten. Im ersten Schritt wurden in jeweils zwei getrennten Ansätzen die cDNA-Abschnitte amplifiziert, die später fusioniert werden sollten. Dabei wurde pro Ansatz ein äußerer und ein innerer Primer genutzt. Innere Primer lagen an der gewünschten späteren Fusionsstelle und waren komplementär zueinander strukturiert, äußere Primer lagen an den äußeren Enden der gewünschten Fusions-cDNA. Auf den ersten PCR-Schritt folgte eine Agarosegelelektrophorese (s. Abschnitt 2.2.3) mitsamt Gelextraktion (s. Abschnitt 2.2.4). Im zweiten Schritt wurden dann die beiden gereinigten PCR-Produkte des ersten Schrittes in ungefähr gleichen Mengen in einen gemeinsamen Fusions-PCR-Ansatz überführt, wobei lediglich die äußeren Primer verwendet wurden. Eine schematische Darstellung der SOE-PCR ist der Abbildung 6 (s. Abschnitt 3.1.2) zu entnehmen. Die PCR-Ansätze und Programme beider Schritte waren analog zum Standard-PCR-Verfahren (s. Tabellen 14 und 16).

Das **RT-PCR-Verfahren** diente im Rahmen dieser Arbeit der gezielten Detektion von ausgewählten Transkripten aus eukaryotischem mRNA-Isolat. Dafür wurde zunächst mRNA-Isolat mithilfe des *NucleoSpin RNA II-Kits* (*Machery-Nagel GmbH&Co.KG*, Düren, BRD) nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend wurde die instabile mRNA in stabile cDNA umgeschrieben. Dafür wurde ein gegen den Poly-A-Schwanz der mRNA gerichteter oligo-dT-Primer und eine RNA abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) genutzt. Der initiale Ansatz sah wie folgt aus:

2 µg RNA
1 µl oligo-dT-Primer
ad 13 µl H₂O

Nach 5-minütiger Inkubation bei 70 °C und anschließender Lagerung auf Eis wurden dem Ansatz folgende Agenzien beigemischt:

1 µl *RevertAidTM M- MuLV Reverse Transcriptase*
4 µl *RevertAidTM 5xRT Buffer*

2 µl *dNTP-Mix*

Es erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C zur cDNA-Synthese. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase bei 72 °C für 10 Minuten inaktiviert. Im Anschluss folgte das eigentliche PCR-Verfahren (s. Tabellen 14 und 16), in dem 1 µl cDNA als *template* diente.

2.2.8 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um ein *insert* für die Ligation (Verknüpfung) mit einem Vektor vorzubereiten, wurde dieses am 5'-Ende mithilfe der *T4 PNK* (s. Tab. 11) nach Herstellerangaben phosphoryliert.

2.2.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um in einem linearisierten Vektor mit *blunt*- oder überlappenden *sticky ends* eine Religation zu vermeiden, wurde dieser zunächst mithilfe einer Phosphatase dephosphoryliert. Dies war notwendig, um anschließend eine Ligation mit einem anderen cDNA-Molekül zu gewährleisten (s. Abschnitt 2.2.10). Folgende Lösungen wurden dafür hinzugegeben und anschließend für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert:

3 µl *Fast-APTM*
2 µl *FastAPTM Buffer*
ad 60 µl H₂O

Anschließend wurde eine Gelelektrophorese (s. Abschnitt 2.2.3) und -extraktion (s. Abschnitt 2.2.4) durchgeführt.

2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung des 3'-OH-Endes eines DNA-Stranges mit dem 5'-Phosphatende eines anderen DNA-Stranges wird als Ligation bezeichnet. Dabei wird ein phosphoryliertes *insert* und ein linearisierter, dephosphorylierter Vektor miteinander mithilfe einer DNA-Ligase unter ATP-Spaltung verknüpft.

Der folgende Ligationsansatz wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und über Nacht bei 4 °C inkubiert:

1 µl Vektor
insert (s. Formel)
2 µl PEG4000 (bei *blunt ends*)
2 µl *T4 DNA Ligase Buffer (10x)*
2 µl *T4 DNA Ligase*

ad 20 µl H₂O

Das deutlich kleinere *insert* wurde, verglichen mit dem Vektor, in einem 3- bis 5-fachen Überschuss zugegeben. Folgende Formel fand dabei Verwendung:

$$\text{Masse des Inserts (ng)} = \frac{5 \times \text{Masse des Vektors (ng)} \times \text{Länge des inserts (bp)}}{\text{Länge des Vektors (bp)}}$$

Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz ohne *insert* hergestellt. Sowohl Ligationsprodukt als auch Kontrolle wurden am nächsten Tag in Bakterien transformiert (s. Abschnitt 2.2.1) und mittels *Colony-PCR* analysiert.

2.2.11 DNA-Sequenzierung

Um den Erfolg einer Plasmid-Klonierung zu kontrollieren, wurden die neuen Plasmide mittels Sanger-Methode sequenziert (193). Dies erfolgte durch *Microsynth Seqlab* (Göttingen, BRD). Die anschließende Auswertung über ein multiples Sequenzalignment fand mithilfe des Programms *ClustalW2* des *European Bioinformatics Institute* (Cambridge, UK) statt.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden die adhärenenten Zelllinien CHO-K1, Phoenix-Eco und U4C sowie die Suspensionszelllinie Ba/F3-gp130 kultiviert (s. Tabelle 9). Alle Zelllinien wurden in 10 ml DMEM (+/+) auf 58 cm² Zellkulturschalen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Ba/F3-gp130-Zellen wurden außerdem unter Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 inkubiert.

Die verwendeten Zelllinien wurden ein- (Phoenix-Eco, U4C, Ba/F3-gp130) oder zweimal (CHO-K1) pro Woche passagiert. CHO-K1- und U4C-Zellen wurden dafür mit sterilem PBS gewaschen, trypsinisiert und in einem Verhältnis von 1:20 (Cho-K1) oder 1:12,5 (U4C) auf eine neue Zellkulturschale überführt. Phoenix-Eco-Zellen wurden lediglich in sterilem PBS von der Zellkulturschale gelöst und in einem Verhältnis von 1:20 passagiert. Ba/F3-gp130-Zellen hingegen wurden in einem Verhältnis von 1:10000 auf eine neue Zellkulturschale überführt.

2.3.2 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Der vorübergehende Transfer von DNA auf eukaryotische Zellen wird als transiente Transfektion bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden U4C, CHO-K1- und Phoenix-Eco-Zellen mit den Vektoren p409 und pcDNA3.1 transient transfiziert. Von zentraler Bedeutung war dabei der DNA-stabilisierende, kationische Komplexbildner *TurboFect*TM, welcher die Aufnahme in die Zielzelle ermöglichte.

Die Zelllinien wurden zunächst bis zu einer Konfluenz von 60-70 % kultiviert. Folgend wurden 5 µg DNA mit 10 µl *TurboFect* in 1 ml DMEM (-/-) für 20 Minuten inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Anschließend wurde die DNA-haltige Mischung tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Der Ansatz wurde für 6 weitere Stunden inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Anschließend erfolgte ein Mediumswechsel mit DMEM (+/+). Lediglich bei der Transfektion von Phoenix-Eco-Zellen wurden beim Mediumwechsel 30 % statt 10 % FBS zugegeben. Nach 48 Stunden Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) wurden die Zellen zwecks Protein-Nachweis lysiert (s. Abschnitt 2.4.2).

2.3.3 Stabile retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen

Zwecks stabiler Transduktion von Ba/F3-gp130-Zelllinien wurde das Verfahren der retroviralen Transduktion genutzt. Das zugrundeliegende Prinzip ist, dass mit einem Retrovirus befallene Phoenix-Eco-Zellen als Verpackungszelllinie dienen. Nach der Transfektion von Phoenix-Eco-Zellen werden die übertragenen DNA-Abschnitte in mRNA umgeschrieben und in anschließend sezernierte Retroviren eingebaut. Im Folgenden können die Retroviren genutzt werden, um Ba/F3-

gp130-Zellen stabil zu transduzieren. Dabei wird die mRNA mithilfe der reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben und in das Genom der Ba/F3-gp130-Zelle integriert. Die stabile Transduktion ermöglicht so eine dauerhafte genetische Integration der transfizierten DNA und ihre Weitergabe an Tochter- und Enkelzellen.

Vor der Transduktion wurden 8×10^5 Phoenix-Eco-Zellen auf 6-Well-Platten in 4 ml DMEM (+/+) transient transfiziert (s. Abschnitt 2.3.2). Die Zellzählung erfolgte dabei nach Herstellerangaben mittels Trypan *Blue Dye 0,4 %* und dem *TC10™ Automated Cell Counter*. Am folgenden Tag wurde der Ansatz zentrifugiert (Raumtemperatur, 2000 rpm, 10 Minuten) und der Überstand entnommen. Gleichzeitig wurden Ba/F3-gp130-Zellen zentrifugiert (Raumtemperatur, 1500 rpm, 5 Minuten), gewaschen (PBS) und auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ ml DMEM (+/+) verdünnt. Fünfzig μl (10^5) Ba/F3-gp130-Zellen wurden gemeinsam mit 250 μl des Phoenix-Eco-Überstandes und 3 μl *Polybrene* in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (Raumtemperatur, 1800 rpm, 2 Stunden). Folgend wurden das Medium entfernt und die Zellen in 5 ml DMEM (+/+) plus 10 ng/ml HIL-6 überführt. Nach zweitägiger Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) wurden spezifische Selektionsantibiotika zugegeben.

In der vorliegenden Arbeit wurden die retroviralen Vektoren pMOWS-puro und pMOWS-hygro als Transduktionsvektoren verwendet. Zwecks Selektion wurden folglich Puromycin (1,5 $\mu\text{g/ml}$) oder Hygromycin (20 $\mu\text{g/ml}$) eingesetzt.

2.3.4 Durchflusszytometrie

Um die Rezeptoroberflächenexpression stabil-transfizierter Ba/F3-gp130-Zellen nachzuweisen, wurde das Verfahren der Durchflusszytometrie genutzt. Das zugrundeliegende Prinzip ist dabei, dass Oberflächenrezeptoren mit fluoreszierenden Antikörpern markiert und folgend die nach Laserbehandlung emittierten, optischen Signale detektiert werden.

Die untersuchten Zellen wurden zunächst in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und pelletiert (Raumtemperatur, 1800 rpm, 5 Minuten). Die Zellpellets wurden anschließend in sterilem PBS gewaschen und in DMEM (+/+) bei einer Konzentration von 500000 Zellen pro ml resuspendiert. Fünfhunderttausend Zellen wurden pro Ansatz in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pelletiert (4 °C, 1800 rpm, 5 Minuten) und in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden ein weiteres Mal pelletiert (4 °C, 1800 rpm, 5 Minuten) und in 100 μl FACS-Antikörper (Verdünnung 1:10 bis 1:20 in FACS-Puffer) resuspendiert. Es folgte ein zweistündiger Inkubationsschritt bei 4 °C. Dann wurden die Zellen in 1 ml FACS-Puffer gewaschen (5 Minuten, 1800 rpm, 4 °C). Für den

Nachweis des IL-12R β 1 erfolgte die Resuspension des Zellpellets in 0,5 ml FACS-Puffer und die sofortige durchflusszytometrische Analyse mittels *BD FACSCanto II*. Im Falle des IL-23R wurden 100 μ l eines sekundären, fluoreszierenden Antikörpers (nach Herstellerangaben in FACS-Puffer verdünnt) zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen in 1 ml FACS-Puffer gewaschen (4 °C, 1800 rpm), in 0,5 ml FACS-Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch untersucht. Die Ergebnisse wurden mittels *FCS Express Software (De Novo Software Inc., Los Angeles, USA)* analysiert.

2.3.5 Zellviabilitätsmessung mithilfe des Proliferationsassays

Um die Zytokinresponsivität von Ba/F3-gp130-Zellen zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Zellviabilitätsassays (*CellTiter-Blue Cell Viability Assay's, Promega Corp., Fitchburg, USA*) genutzt. Zugrunde liegt dabei, dass der Redoxfarbstoff Resaruzin von metabolisch aktiven Zellen zu der fluoreszierenden Substanz Resorufin umgesetzt wird. Mithilfe eines Spektrophotometers kann auf die Resorufin-Konzentration (Wellenlängen: 560 nm Extinktion, 590 nm Emission) und damit die Zellviabilität rückgeschlossen werden.

Die untersuchten Zellen wurden zunächst in einem 15-ml-Reaktionsgefäß pelletiert (Raumtemperatur, 1500 rpm, 5 Minuten) und dreimal in sterilem PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in DMEM (+/+) resuspendiert und auf eine Konzentration von 50000 Zellen pro ml verdünnt. Fünftausend Zellen pro *Well* wurden abhängig vom Versuchsaufbau mit oder ohne Zytokin in Dreifachansatz auf eine 96-*Well*-Platte gegeben. In der vorliegenden Arbeit wurden 0,2 % HIL-6 oder HIL-23 (10 ng/ml) verwendet. Außerdem wurden konzentrationsabhängige Proliferationsassays durchgeführt, die zunehmende HIL-23-Konzentrationen enthielten und in einem Vierfachansatz stattfanden. Nach Zugabe des Zytokins erfolgten eine 72-stündige Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) und anschließend die spektrophotometrische Viabilitätsbestimmung mittels *infinite M200 PRO*. Die Messung wurde nach 0, 20, 40, 60, 90 und 120 Minuten durchgeführt, wobei der Zeitpunkt 0 als Referenzwert diente. Die Auswertung erfolgte mittels *Microsoft Excel (Microsoft Corporation Inc., Redmond, USA)*.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Stimulationsassay zwecks Nachweis der Signaltransduktion nach Zytokinstimulation

Um die intrazelluläre Signaltransduktion von Ba/F3-gp130-Zellen nach Zytokinstimulation zu untersuchen, wurden Stimulationsassays durchgeführt. Dabei handelt es sich vereinfacht um Zeitreihen, die mithilfe von Western Blots analysiert werden.

Ba/F3-gp130-Zellen wurden dreimal in sterilem PBS gewaschen (Raumtemperatur, 1800 rpm, 5 Minuten). Dann erfolgte eine Resuspension in DMEM (-/-). Es folgte die Verteilung auf eine 6-well-Platte (2 ml pro well) und die Inkubation für 4-6 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂.

Nun erfolgte je nach Protokoll die Stimulation der Zellen mithilfe der gewählten Zytokine, welche in einer Konzentration von 10 ng/ml zugegeben wurden. Die Ansätze wurden anschließend zu normierten Zeitpunkten entnommen, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und geerntet (Raumtemperatur, 1800 rpm, 5 Minuten). Der Überstand wurde entnommen, das Reaktionsgefäß für circa 1 Minute in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend bei -20 °C gelagert. Die Proben wurden am nächsten Tag mittels pSTAT3-Lysepuffer lysiert, der Proteingehalt bestimmt, die Lösungen in *Lämmli*-Puffer gekocht und das Western Blot-Verfahren mit spezifischen Antikörpern (anti-pSTAT3, -STAT3 und -SOCS3) durchgeführt.

2.4.2 Herstellung von Zelllysaten

Um definierte Proteine einer gewählten Zelllinie zu untersuchen, wurden diese zunächst lysiert. Verschiedene Lysepuffer wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Der pSTAT3-Lysepuffer diente der Herstellung von Zelllysaten, die mittels Westernblot-Analyse untersucht wurden. Die Zusammensetzung ist Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 17: Zusammensetzung des pSTAT3-Lysepuffers

Inhaltsstoff	Konzentration
Tris-HCl	50 mM
KaCl	150 mM
EDTA	2 mM
NP-40	1 %
Triton X-100	1 %

<i>cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail</i>	1 Tablette/ 50 ml
NaF	1 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
pH	<i>ad 7,5</i>

Der IP-Lysepuffer diente der Herstellung von Zelllysaten, die mittels Immunpräzipitation analysiert wurden. Die Zusammensetzung des IP-Lysepuffers ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Zusammensetzung des IP-Lysepuffers

Inhaltsstoff	Konzentration
Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Triton X-100	1 %
<i>cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail</i>	1 Tablette/ 20 ml
pH	<i>ad 7,4</i>

Zur Lyse von Ba/F3-gp130-Zellen für den nachfolgenden Western Blot wurden die Zellen zunächst in ein Reaktionsgefäß überführt und pelletiert (4 °C, 1800 rpm, 5 Minuten). Anschließend wurden die Zellen in 200 µl Lysepuffer resuspendiert und für 2 Stunden bei 4 °C inkubiert. Final wurden die lysierten Zellreste abzentrifugiert (4 °C, 13000 rpm, 20 Minuten). Der proteinreiche Überstand wurde isoliert und weiterverwendet.

Zur Lyse adhärenter U4C-Zellen zwecks Western Blot wurden die Zellen zunächst gewaschen (PBS), anschließend mit einem Zellschaber von der Zellplatte gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation und anschließend eine zweistündige Lyse in 200 µl Lysepuffer bei 4 °C. Der proteinreiche Überstand wurde isoliert (s.o.) und zwecks Proteinnachweiß weiterverwendet.

Bei der Lyse transient-transfizierter CHO-K1-Zellen (s. Abschnitt 2.3.2) im Rahmen der Immunkopräzipitation wurden diese nach zweitägiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ in ein Reaktionsgefäß überführt und auf Eis zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend folgte

die Lyse mithilfe von 300 µl IP-Lysepuffer für 30 Minuten bei 4 °C in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß. Folgend wurden die Lösungen abzentrifugiert (4 °C, 14000 rpm, 15 Minuten) und die proteinreichen Überstände zwecks Immunpräzipitation in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

2.4.3 Proteinquantifizierung

Um den Proteingehalt in einem Zelllysats zu bestimmen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Bicinchoninsäure (BCA)-Assay vorgenommen. Zugrunde liegt dabei der Umstand, dass Cu^{2+} durch die negative Ladung von Proteinketten zu Cu^+ reagiert. Cu^+ wiederum ist in der Lage, einen Farbumschlag von BCA zu induzieren, welcher spektrophotometrisch bestimmt werden kann (Absorption bei 562 nm). Dadurch kann letztlich auf die Proteinkonzentration rückgeschlossen werden.

Es wurde der *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, Perbio Science GmbH, Bonn, BRD) verwendet. Protokollgetreu wurden Proben mit definierten BSA-Konzentrationen hergestellt und zwecks Eichgrade mittels *infinite M200 PRO* analysiert. Anschließend wurde die Absorbtion des Zelllysats (1:20 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{DD}}$) bestimmt und mit der Eichgrade verglichen. Die Untersuchungen fanden dabei in Zweifachansätzen auf einer 96-Well-Platte statt.

2.4.4 Western Blot

Das Western Blot-Verfahren diente der größenspezifischen Trennung von Proteinen und dem anschließenden Nachweis spezifischer Proteinbanden mithilfe von spezifischen Antikörpern. Das Verfahren erfolgte in drei Schritten.

Im ersten Schritt wurden die Proteinlysate (s. Abschnitt 2.4.2) in *Lämmli*-Puffer aufgekocht (95 °C, 10 Minuten) und anschließend die Proteine der Größe nach voneinander getrennt. Durch das im *Lämmli*-Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol wurden Proteindisulfidbrücken gelöst, während das ebenfalls enthaltene SDS eine negative Ladung der Proteine verursachte. Anschließend wurden die verschiedenen Proteine unter Anlage von 90 V Spannung mithilfe des *Power Pac 300* in einem SDS-Polyacrylamid-Gel voneinander getrennt. Die Trennung fand in SDS-Laufpuffer statt. Die Geschwindigkeit, mit der die unterschiedlichen Proteine durch das Gel zur Anode wanderten, korrelierte mit der entsprechenden Größe.

Die verwendeten Gele setzten sich aus einem in Laufrichtung proximalen 10%igen Sammelgel sowie einem distalen Trenngel zusammen und wurden am Vortag in umgekehrter Reihenfolge gegossen. Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel ist in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel

Inhaltsstoff	Sammelgel	Trenngel
H ₂ O	2,28 ml	4 ml
Acrylamidlösung 30 %	0,67 ml	3,3 ml
Puffer	1 ml Sammelgelpuffer (500 mM Tris-HCl; pH 6,8; 0,4 % SDS)	2,6 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl; pH 8,8; 0,4 % SDS)
TEMED	0,004 ml	0,004 ml
Ammoniumpersulfat (APS)	0,04 ml	0,1 ml

Im zweiten Schritt des Western Blot-Verfahrens wurden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Transfermembran transferiert. Dabei wurde das sogenannte *semi-dry* Verfahren genutzt. Dies geschah ebenfalls mithilfe einer Spannungsquelle (*Trans-Blot® Turbo™*), die Laufrichtung war jedoch orthogonal zu der Laufrichtung des ersten Schrittes. Zunächst wurden zehn *Whatman®*-Filterpapiere zurechtgeschnitten und in Transferpuffer eingeweicht. Fünf *Whatman®*-Filterpapiere wurden gestapelt in die Transferkassette gelegt. Die PVDF-Membran wurde 2 Minuten in Methanol aktiviert und auf die *Whatman®*-Filterpapiere gelegt. Das SDS-Gel wurde anschließend auf der Membran platziert und mit den fünf weiteren *Whatman®*-Filterpapieren bedeckt. Der Transfervorgang erfolgte für eine Stunde bei 20 V.

Anschließend folgte die dritte Phase des Western Blot-Verfahrens. Dabei wurde die mit Proteinen beladene Membran zunächst für zwei Stunden in 10 ml Magermilchlösung (5 % in TBST) inkubiert, wodurch unspezifische Antikörperbindestellen blockiert wurden. Es folgten drei Waschschrte mit TBST und die Zugabe eines entsprechenden primären Antikörpers zur Inkubation bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Morgen erfolgten erneut drei Waschschrte mit TBS-T und die Zugabe des sekundären Antikörpers, welcher gegen den primären Antikörper gerichtet und mit einer Peroxidase gekoppelt war. Nach zwei Stunden Inkubationszeit erfolgten drei finale Waschschrte, zweimal mit TBS-T und einmal mit TBS.

Die Auswertung erfolgte mithilfe des *ECL Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare, Chalfont, St. Giles, UK)* nach Angaben des Herstellers. Der zugrundeliegende Mechanismus der

Detektion ist, dass eine Antikörper-gekoppelte Peroxidase das in der Reaktionsagenz enthaltene Luminol umsetzt. Dabei wird Licht emittiert, welches mittels des *ChemoCam Imagers* und der *ChemoStar Professional Software* detektiert und per Foto festgehalten wird. Die Fotos wurden in dieser Arbeit mittels der Software *ImageJ* (*National Institutes of Health, Bethesda, USA*) dokumentiert und bearbeitet.

Im Anschluss konnten die Antikörper von der Membran entfernt („*strippen*“) und die Membran zur Detektion weiterer Proteine verwendet werden. Dafür wurde die Membran zunächst für 30 Minuten bei 65 °C in *stripping* Puffer und anschließend für 2 Stunden erneut in 5%iger Magermilchlösung (TBST) inkubiert. Die Membran konnte nun mit weiteren Antikörpern beprobt werden.

Die Antikörper wurden entweder in 5%iger Magermilchlösung (TBST) oder in 5%iger FBS-Lösung (TBST) genutzt. Biotinylierte Antikörper wurden lichtgeschützt gelagert und verwendet, wobei statt eines sekundären Antikörpers *Streptavidin-HRP* genutzt wurde.

2.4.5 Immunokopräzipitationsassays

In der vorliegenden Arbeit wurden Immunokopräzipitationsassays genutzt, um die Bildung von Proteinkomplexen nachzuweisen. Zugrundeliegend war dabei die Präzipitation gewählter FLAG-markierter Proteine aus Proteinlysate mithilfe eines FLAG-Antikörper-gekoppelten Affinitätsgels (*ANTI-FLAG® M2-Affinitätsgel*). Anschließend konnte mithilfe weiterer Antikörper ein Nachweis der Proteine erfolgen, welche aufgrund ihrer Bindung an das FLAG-markierte Protein ebenfalls präzipitiert worden waren. FLAG bezeichnet dabei das Aminosäuremotiv Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys und diente als biologisch-funktionsfreie Zielstruktur des Antikörpers (194).

Zunächst wurden CHO-K1-Zellen transient transfiziert (s. Abschnitt 2.3.2) und mithilfe von IP-Lysepuffer lysiert (s. Abschnitt 2.4.2). Anschließend wurden 40 µl α-FLAG-Affinitätsgel durch vier- bis fünfmaliges Waschen mit 1 ml Lysepuffer (30 Sekunden, 5000g, 4 °C) äquibriert und mit IP-Lysepuffer auf 40 µl aufgefüllt. Lysate und Affinitätsgel wurden zusammengeführt und über Nacht bei kontinuierlichem Invertieren und 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen folgte eine Zentrifugation (4 °C, 5000g, 30 Sekunden), der Überstand wurde entfernt und das Präzipitat dreimal in Lysepuffer ohne Triton gewaschen. Final wurden 50 µl 2,5x *Lämmli* Puffer zugegeben und die Lösung für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Western Blot-Verfahrens (s. Abschnitt 2.4.4).

2.4.6 Konfokalmikroskopie

Um Zellen hinsichtlich ihrer räumlichen Struktur und der Lokalisation exprimierter, fluoreszierender Proteine zu untersuchen, wurde das Verfahren der Konfokalmikroskopie angewendet. Dabei wurden HeLa-Zellen mit fluoreszierenden Substanzen transfiziert. Außerdem wurden die Zellen mit einem Tubulin-Antikörper und fluoreszierenden sekundären Antikörpern gefärbt, um das Zytoskelett sichtbar zu machen. Eine letzte angewendete Visualisierungsmethode war die Färbung des Zellkerns mittels DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol 1:1000 in 1 % BSA (PBS)).

Autoklavierte Deckplatten wurden zunächst mittels Ethanol gewaschen und einzeln auf 6-Well-Platten verteilt. Pro Well wurden 180000 HeLa-Zellen in 1-2 ml DMEM (+/+) suspendiert und für 6 Stunden inkubiert, um eine Anhaftung der HeLa-Zellen an den Deckplatten zu erreichen. Es folgte eine transiente Transfektion (s. Abschnitt 2.3.2), und eine Inkubation über 24 h (37 °C, 5 % CO₂).

Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen mittels PBS vorsichtig gewaschen. Es folgte eine 4-minütige Inkubation in 4 % Formaldehyd (PBS) zwecks Fixierung der Zellen. Nach einem weiteren Waschschriff mittels PBS folgte eine 10-minütige Inkubation mittels 0,2 % Triton X-100 (PBS) (Raumtemperatur, völlige Dunkelheit) um die Membrandurchlässigkeit zu erhöhen. Das Medium wurde entfernt und die Zellen für 30 Minuten in 1 % BSA (PBS) inkubiert (Raumtemperatur, völlige Dunkelheit), um unspezifische Proteinbindestellen zu blockieren. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit entnommen und ein spezifischer primärer Antikörper zugegeben. Es folgte die Inkubation über Nacht (4 °C, völlige Dunkelheit).

Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit einem sekundären Antikörper sowie DAPI-Färbung für 1 Stunde inkubiert (Raumtemperatur, völlige Dunkelheit). Es folgten zwei weitere Waschschriffe (PBS) und die Deckplatten wurden mittels *ProLongTM Gold* auf einem Objektträger befestigt. Die mikroskopische Analyse erfolgte mittels des *LSM510-Meta confocal microscope* und der Software *ImageJ*.

3 Ergebnisse

3.1 IL-23R-gp130-Chimären induzieren eine pSTAT3-Suppression nach HIL-23-Stimulation

3.1.1 Hintergrund und Fragestellung

Die IL-23-Signaltransduktion basiert auf einem Rezeptorkomplex aus IL-12R β 1 und IL-23R sowie der konsekutiven Aktivierung des JAK/STAT3-Signalweges (122). Ein wichtiges STAT3-responsives Protein ist SOCS3, welches im IL-6-Signalweg über die Bindung des Rezeptors gp130 eine pSTAT3-Suppression verursacht (77, 91). Im IL-23-Signalweg jedoch bleibt trotz Bildung von SOCS3 eine pSTAT3-Suppression aus (47).

Die Kinetik der IL-23-Signaltransduktion im Hinblick auf die STAT3-Aktivierung wurde im Rahmen dieser Arbeit dargestellt. Dabei wurden stabil transduzierte Ba/F3-gp130_hIL-12R β 1_hIL-23R- und Ba/F3-gp130_mIL-12R β 1_mIL-23R-Zellen mit entsprechendem Zytokin stimuliert (s. Abschnitt 2.4.1). Anschließend wurden zu definierten Zeitpunkten Zellen entnommen, lysiert und eine Menge von 37,5 μ g Protein pro Bande mittels Western Blot-Verfahren analysiert (s. Abb. 4). Da beide Zelllinien gp130 exprimieren, wurden diese im Rahmen eines Kontrollexperiments mittels HIL-6 *trans*-stimuliert (vgl. Abschnitt 1.2.2) (41).

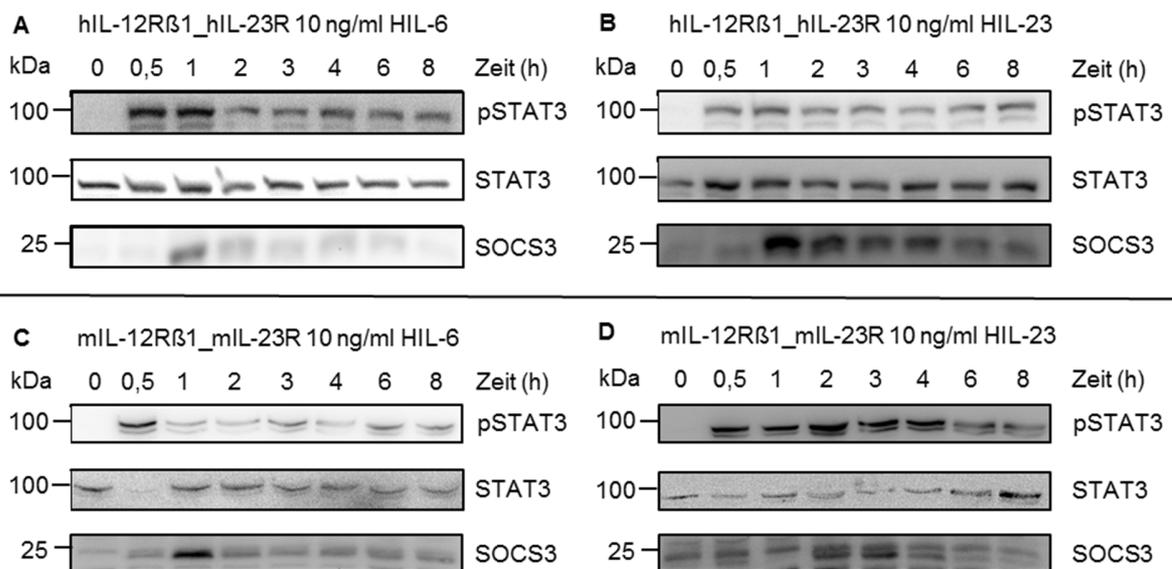


Abb. 4: Kinetik der STAT3-Aktivierung nach Stimulation mit HIL-6 und HIL-23. Ba/F3-gp130_hIL-12R β 1_hIL-23R- und Ba/F3-gp130_mIL-12R β 1_mIL-23R-Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, für 5 Stunden in FBS-freiem Medium inkubiert und anschließend für x Minuten mit 10 ng/ml HIL-6 oder HIL-23 stimuliert. Die Zellen wurden pelletiert und lysiert. Anschließend wurden pro Bande 37,5 μ g Proteinlysate auf ein SDS-Agarosegel aufgetragen. Folgend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und pSTAT3, STAT3 und SOCS3 mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Abgebildet sind repräsentative Ergebnisse aus n=3 unabhängigen Ergebnissen.

In Ba/F3-gp130-Zellen, die den murinen (m-) oder humanen (h-) IL-23 Rezeptorkomplex exprimieren, führte die Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 zu einer STAT3-Aktivierung nach circa 30 Minuten, während nahezu kein SOCS3 nachweisbar war. Nach circa 60 Minuten kam es zu einer Reduktion von pSTAT3, während invers-korrelierend die Expression von SOCS3 anstieg. Die Stimulation von beiden Zelllinien mit 10 ng/ml HIL-23 führte ebenfalls zu einer Aktivierung von STAT3, welche nach 60 Minuten ihr Maximum erreichte und über die folgenden 7 Stunden konstant blieb. Nach circa 120 Minuten konnte die Expression von SOCS3 beobachtet werden; eine inverse Korrelation zwischen SOCS3 und pSTAT3 bestand jedoch nicht. Als Ladekontrolle diente inaktives STAT3, welches in beiden Zeitreihen in ähnlichem Ausmaß detektiert wurde (s. Abb. 4).

In seiner Dissertation hat Franz Christian Horstmeier in der AG Scheller dargestellt, dass die Insertion des postulierten SOCS3-Bindemotivs aus gp130 in den hIL-23R zu keiner inversen Korrelation zwischen STAT3-Aktivierung und SOCS3-Expression führte (bislang unveröffentlicht). In einem ersten Schritt dieses Teilprojekts sollte eine Chimäre, bestehend aus dem hIL-23R und gp130 hergestellt werden. Anschließend sollte diese Chimäre hinsichtlich der Aktivierung von STAT3 und Expression von SOCS3 untersucht werden.

3.1.2 Klonierung der Rezeptorchimäre hIL-23R-gp130

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein chimärer Rezeptor, bestehend aus der extrazellulären Domäne sowie dem Transmembranabschnitt des hIL-23R (Aminosäuren 1-376) und dem intrazellulären Teil von gp130 erzeugt. Die zugehörigen Aminosäuresequenzen und eine schematische Übersicht der Rezeptorchimäre im Vergleich mit dem Wildtyp gehen aus Abbildung 5 hervor. Die Aminosäuresequenzen entstammen den Arbeiten von Hibi *et al.* 1990 und Parham *et al.* 2002 (31, 122).

hIL-23R-Wildtyp

LLLGMI VFAVMLSILSLIGIFNRSFRTGIKRRILLIPKWLYEDIPNMKNSNVVKMLQENSELMNNSSEQVLYVDPM
 ITEIKEIFIPKHKPTDYKKENTGPLETRDYPQNSLFDNNTVVYIPDLNTGYKPOISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKP
 PVDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELSLILNQEGCSPDIQNSVEEETTMLLENDSPSEIPEQTL
 LPDEFVSCLGIVNEELPSINTYFPQNI LESHFNRI S LLEK

hIL-23R-gp130

LLLGMI VFAVMLSILSLIGIFNKRDLIKKH IWPNVDP SKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMYSDGNFTD VSVVEIEA
 NDKK PFPEDLKS LDFKKEKINTEGHSSGIGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSSSTVOYSTV VHSYRHO VPSVQV
 FSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGGD GILPROQ YFKQ NCSQHESPDI SHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISD
 HISQSCGSGQMKMFQEVSAADAFGP GTEGQVERFETVGM EAAATDEGM PKSYLPQ TVRQGG YMPQ

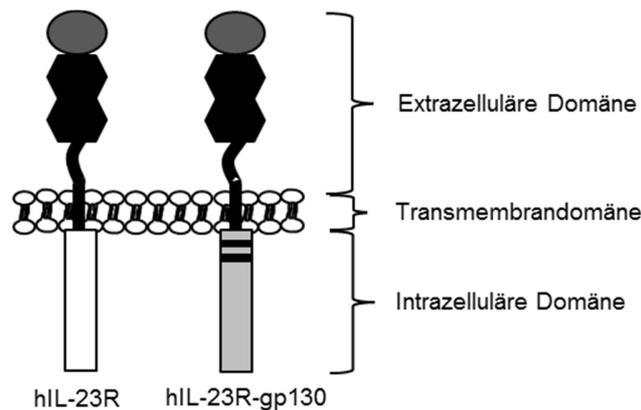


Abb. 5: Schematische Übersicht und Aminosäuresequenz der Chimäre hIL-23R-gp130 im Vergleich mit dem Wildtyp IL-23R. Oben: Aminosäuresequenzen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nur Transmembrandomänen und intrazelluläre Domänen dargestellt. Schwarz dargestellt sind die Transmembrandomäne sowie die intrazelluläre Domäne des hIL-23R. Grau dargestellt ist die intrazelluläre Domäne von gp130 mit Ausnahme des SOCS3-Bindemotivs, das rot dargestellt ist. Rot hervorgehoben sind die pSTAT3 bindenden YXXQ-Motive. Blau hervorgehoben sind die Motive BOX1 (membrannah) und BOX2 (membranfern). Weitere Informationen und die zugehörigen Quellen sind 1.2.3 und 1.4.2 zu entnehmen. Unten: Strukturelle Übersicht. Dunkelgrau dargestellt sind Immunglobulin-ähnliche Domänen. Zytokinbindende Domänen sind schwarz dargestellt, wobei die typischen Cystein-Motive und WSXWS-Motive nicht hervorgehoben wurden. Die intrazellulären Motive BOX1 und BOX2 sind als schwarze Linien hervorgehoben. Die intrazellulären Domänen sind weiß (hIL-23R) und hellgrau (gp130) dargestellt.

In einem ersten Klonierungsschritt wurde mittels SOE-PCR ein Teil der gewünschten hIL-23R-gp130-cDNA hergestellt, die für die gesamte intrazelluläre Domäne von gp130 sowie die Transmembrandomäne, die *stalk region* und einige Aminosäuren der Domäne D3 des humanen IL-

23R kodierte. Die synthetisierte cDNA enthielt zwecks weiterer Klonierung die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Sna*BI und *Not*I. Aus dem *template* p409-hIL-23R(E444K)-P310 (s. Tabelle 7) wurde zunächst ein 283 bp umfassendes Zwischenprodukt synthetisiert. Parallel wurde in einem zweiten Ansatz mittels PCR aus dem *template* p409-mIL-23R-gp130 (s. Tabelle 7) ein 854 bp großes, zweites Zwischenprodukt erstellt. Beide Zwischenprodukte wurden mittels Gelelektrophorese kontrolliert, isoliert und anschließend in einem gemeinsamen PCR-Ansatz fusioniert. Das Endprodukt wurde ebenfalls geelektrophoretisch kontrolliert, isoliert, phosphoryliert und in den *Hinc*II-geschnittenen, dephosphorylierten Vektor pCR-Script (s. Tabelle 7) ligiert. In Abbildung 6 ist das erläuterte Vorgehen graphisch dargestellt.

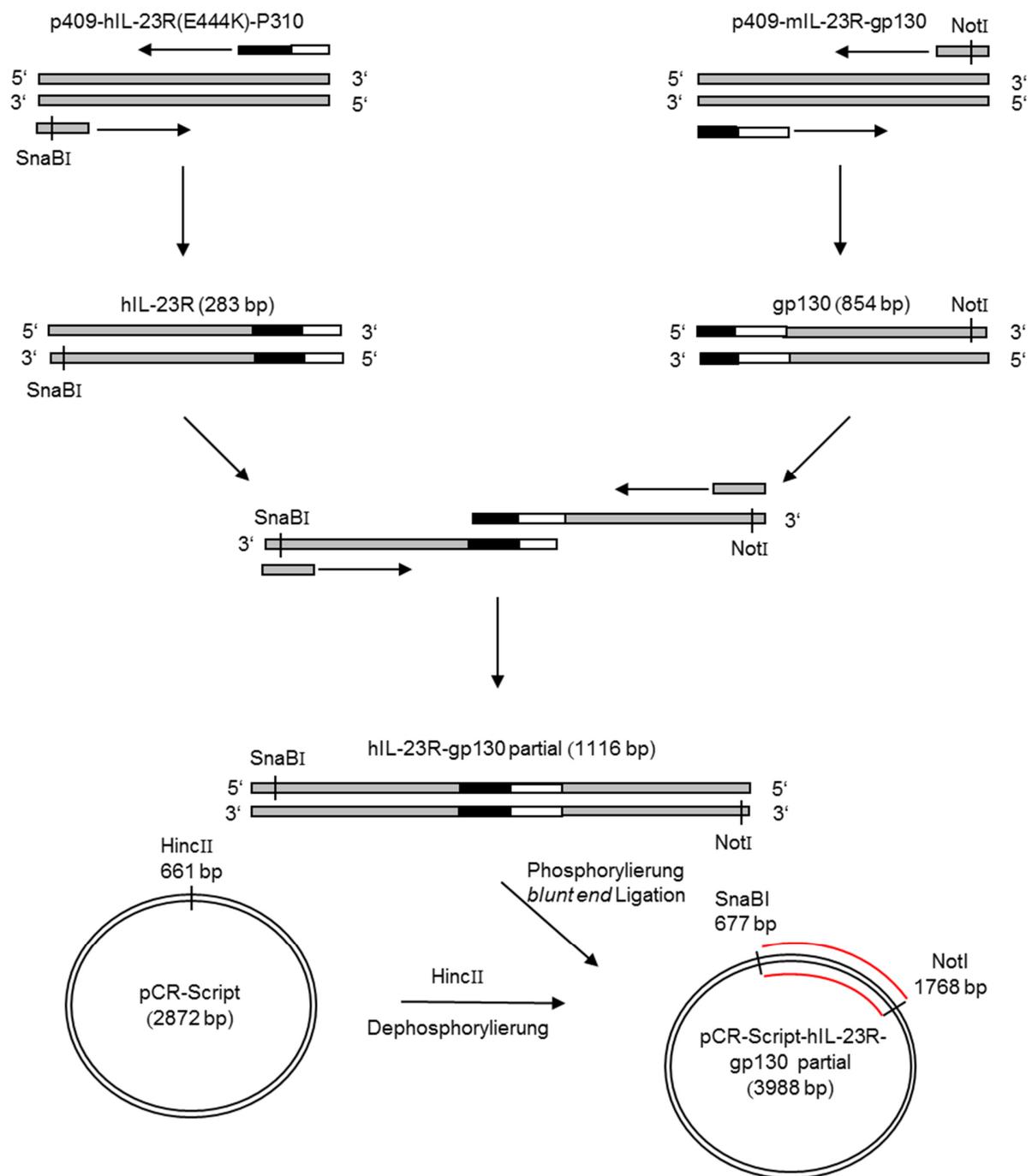


Abb. 6: Erster Schritt zur Herstellung der IL-23R-gp130-cDNA und Ligation in den Klonierungsvektor pCR-Script. Mittels SOE-PCR wurde aus dem Vektoren p409-hIL-23R(E444K)-P310 mithilfe der Oligonukleotide DF479 und -480 ein 283 bp großes erstes Zwischenprodukt synthetisiert. Aus dem Vektor p409-mIL-23R-gp130 wurde mittels der Primer DF323 und -249 ein zweites, 854 bp großes Zwischenprodukt synthetisiert. Beide Zwischenprodukte wurden mittels Gelelektrophorese kontrolliert, isoliert und anschließend in äquimolaren Mengen in einem gemeinsamen PCR-Ansatz mithilfe der Primer DF479 und -249 zu einem 1116 bp großen Endprodukt fusioniert und amplifiziert. Dieses wurde nach gelelektrophoretischer Kontrolle, Isolation und Phosphorylierung mittels Ligation in den HincII-geschnittenen, dephosphorylierten Vektor pCR-Script (2872 bp) eingebracht, sodass das 3988 bp große Plasmid pCR-Script-hIL-23R-gp130 partial entstand.

Nach der Sequenzierung des Inserts im Plasmid pCR-Script-hIL-23R-gp130 (s. 2.2.11) wurde im nächsten Klonierungsschritt die erstellte cDNA aus dem Vektor isoliert und so auf den Expressionsvektor p409-hIL-23R(E444K)-P310 übertragen, dass die Fusions-cDNA um den verbliebenen extrazellulären Abschnitt des hIL-23R komplettiert wurde. Dabei wurde zunächst das Plasmid pCR-Script-hIL-23R-gp130 mithilfe der Restriktionsenzyme SnaBI und NotI geschnitten. Aus dem Vektor p409-hIL-23R(E444K)-P310 wurde mittels SnaBI und NotI der zu ersetzende, 1019 bp große extrazelluläre Abschnitt der hIL-23R-Wildtyp-cDNA entfernt. Anschließend wurde in den verbliebenen, 8747 bp großen Teil des Plasmids p409-hIL-23R(E444K)-P310 das *insert* (s. oben) ligiert. Dieser Klonierungsschritt ist Abbildung 7 zu entnehmen.

Das Expressionsplasmid p409-hIL-23R(E444K)-P310-gp130 enthielt nun die vollständige cDNA der Rezeptorchimäre hIL-23R-gp130, umgeben von zwei PmeI-Schnittstellen. Anschließend erfolgte eine Kontrollrestriktion mittels EcoRI, welche die erwarteten Ergebnisse validierte (s. Abb. 8).

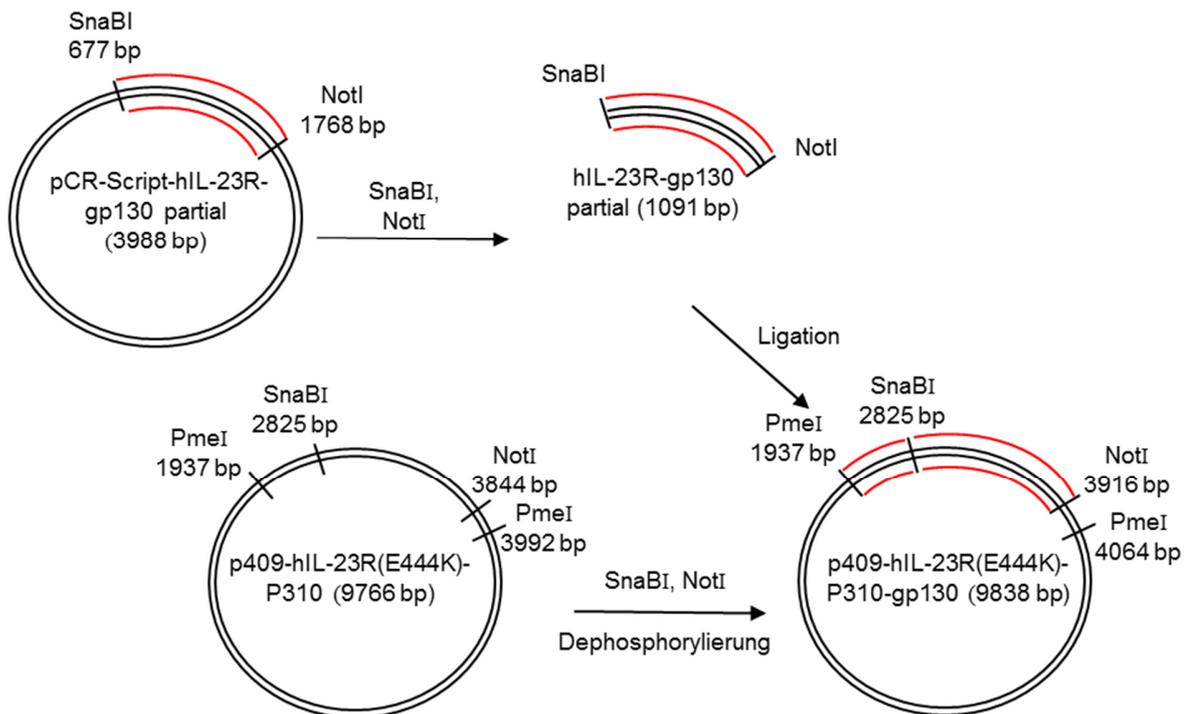


Abb. 7: Klonierung des eukaryotischen Expressionsvektors p409-hIL-23R-gp130. Mittels SnaBI- und NotI-Restriktion wurde das 1091 bp große *insert* aus dem Vektor pCR-Script-hIL-23R-gp130 partial isoliert und in den ebenfalls mittels SnaBI und NotI-geschnittenen Vektor p409-hIL23R(E444K)-P310 überführt.

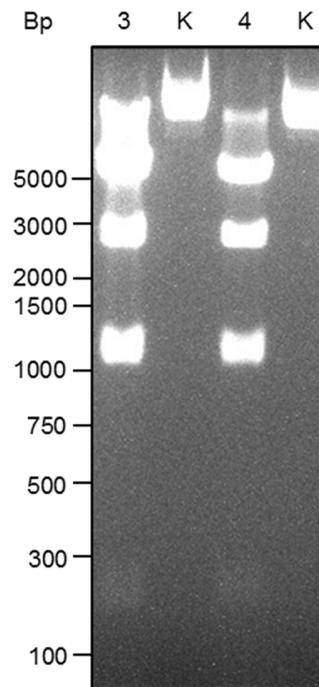


Abb. 8: EcoRI-Spaltung des Expressionsplasmids p409-hIL-23R(E444K)-P310-gp130. Dargestellt sind zwei, identisch hergestellte Klone des erstellten Plasmids (3, 4). Erwartete Größe der Fragmente: 5150 bp, 2436 bp, 1089 bp, 1008 bp, 155 bp. Die rechtsliegenden Kontrollen („K“) enthielten das jeweilige ungeschnittene Plasmid. Aufgrund geringer Größenunterschiede imponieren die Banden bei 1089 bp und 1008 bp hier in einer gemeinsamen Bande. Eine zusätzliche Bande auf Höhe der Kontrolle stellt ungeschnittene Plasmide dar. Zwecks Größenbestimmung wurde der DNA-Marker *GeneRuler Express DNA Ladder* verwendet.

Im nächsten Schritt wurden U4C-Zellen mit 5 µg des Plasmids p409-hIL-23R(E444K)-P310-gp130, des Plasmids p409-hIL-23R(E444K)-P310 (Positivkontrolle) und des Plasmids pEGFP N1 (Negativkontrolle) transfiziert. Nach zweitägiger Inkubation wurden die Zellen geerntet, lysiert und gleiche Proteinmengen auf ein SDS-Agarosegel aufgetragen. Nach dem anschließenden Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion mittels eines hIL-23R-Antikörpers. Dabei lagen die Banden des hIL-23R-Wildtypen und der Variante hIL-23R-gp130 wie erwartet bei 68 respektive 71,5 kDa (s. Abb. 9). Es wurden allenfalls leichte Unterschiede hinsichtlich der Expressionsmengen beobachtet, während das Vorhandensein mehrerer Banden sowohl in der Positivkontrolle, als auch in der konstruierten Chimäre auf das Vorhandensein unterschiedlicher, post-translatinaler Modifikationen zurückzuführen war.

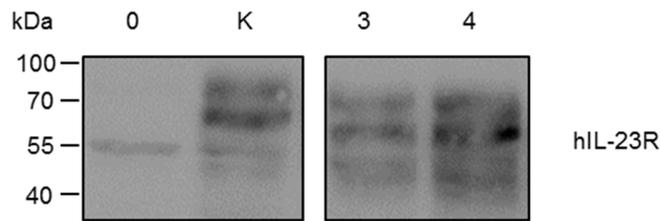


Abb. 9: Expressionsanalyse der Chimäre hIL-23R-gp130 in U4C-Zellen. U4C-Zellen wurden mit der Positivkontrolle p409-hIL-23R(E444K)-P310 (K), mit dem erstellten Plasmid p409-hIL-23R(E444K)-P310-gp130 (3, 4) und der Negativkontrolle pEGFP N1 (0) transient transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion erfolgte die Lyse mittels pSTAT3-Lysepuffer und eine Proteinquantifizierung mittels BCA-Assay. Die Proben wurden in *Lämmli*-Puffer versetzt, 10 Minuten bei 95 °C aufgeköcht und 50 µg Lysat pro Bande auf ein SDS-Agarosegel aufgetragen. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die Banden mittels eines spezifischen hIL-23R-Antikörpers gefärbt. Zur Größenbestimmung diente der Proteinmarker *PageRuler Prestained Protein Ladder*.

Im letzten Schritt wurde die Rezeptor-kodierende cDNA von dem Expressionsvektor p409 in den retroviralen Vektor pMOWS-puro-GFP (s. Tabelle 7) subkloniert. Dabei wurde zunächst das 2127 bp große *insert* mithilfe des Restriktionsenzym *PmeI* aus dem Plasmid p409-hIL-23R(E444K)-P310-gp130 isoliert. Das im Vorfeld durch Dr. Doreen Floss hergestellte *backbone* aus pMOWS-puro-GFP wurde mittels *EcoNI* und *BamHI* isoliert, die überhängenden Enden mittels Klenow-Fragment aufgefüllt und im Rahmen dieser Arbeit mit dem *insert* verknüpft (s. Abb. 10).

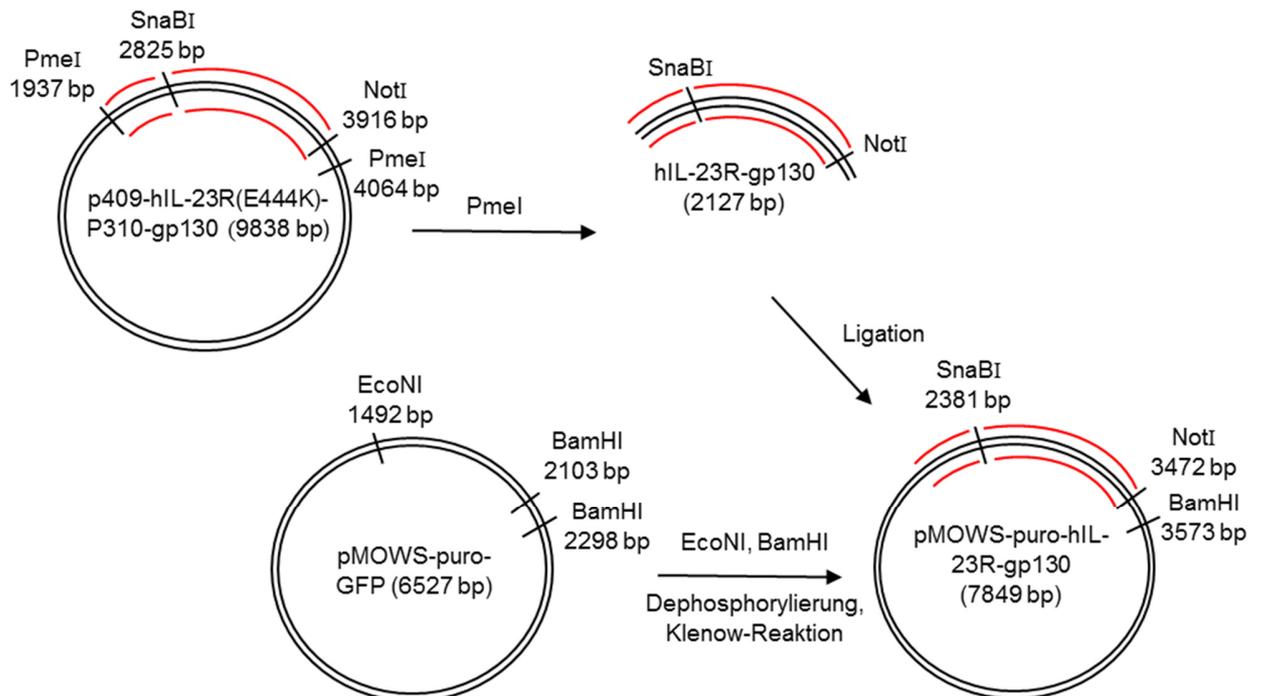


Abb. 10: Transfer der hIL-23R-gp130-cDNA von p409 auf den retroviralen Vektor pMOWS-puro-GFP. Das *insert* (2127 bp) wurde durch *PmeI*-Verdau aus dem Vektor p409-hIL23R-gp130 isoliert. Das Plasmid pMOWS-puro-GFP wurde mittels *EcoNI* und *BamHI* geschnitten, mit der Klenow-Reaktion behandelt und dephosphoryliert. Es folgte die Isolation des Vektorfragments (5721 bp). Anschließend wurde das Vektorfragment mit dem *insert* ligiert und das entstehende Plasmid mittels Restriktionsanalyse kontrolliert.

3.1.3 Die Chimäre hIL-23R-gp130 wird aktiv in Ba/F3-gp130-Zellen exprimiert

Um die Signaltransduktion der Rezeptorvariante hIL-23R-gp130 zu analysieren, wurde die synthetisierte Rezeptorvariante stabil in Ba/F3-gp130-Zellen eingebracht. Ba/F3-Zellen sind murine lymphoblastische Vorläuferzellen, die sich in der Erforschung von Zytokinsignalwegen bewährt haben (195). Die in dieser Arbeit verwendete Tochterzelllinie entstammt der AG Scheller und exprimiert zusätzlich gp130 (47). Sie konnten also HIL-6 abhängig kultiviert werden.

Die stabile Expression wurde mithilfe einer retroviralen Transduktion erreicht (s. Abschnitt 2.3.3). Dabei wurden zunächst Phoenix-Eco-Zellen mit dem Plasmid pMOWS-puro-hIL-23R-gp130 transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde der Überstand entnommen und mit Ba/F3-gp130-Zellen sowie *Polybrene* inkubiert. Neben naiven Ba/F3-gp130-Zellen wurden ebenfalls Tochterzellen transfiziert, die bereits den hIL-12Rβ1 exprimierten und aus vorherigen Arbeiten der AG Scheller stammten. Die so erstellten Zelllinien Ba/F3-gp130_hIL-23R-gp130 und Ba/F3-gp130_hIL12Rβ1_hIL-23R-gp130 wurden im Folgenden mittels Puromycin, letztere zusätzlich mittels Hygromycin B selektiert.

Im nächsten Schritt wurde mittels Durchflusszytometrie und hIL-23R- sowie hIL-12Rβ1-Antikörpern die Oberflächenexpression der eingebrachten Rezeptoren überprüft (s. Abb. 11). Dabei konnte je nach Zelllinie eine verstärkte Fluoreszenzintensität der erzeugten Zelllinien im Vergleich zu untransfizierten Ba/F3-gp130-Zellen nach Färbung mittels hIL-12Rβ1- und/oder hIL-23R-Antikörpern beobachtet werden, was die erfolgreiche Oberflächenexpression der Rezeptoren belegte.

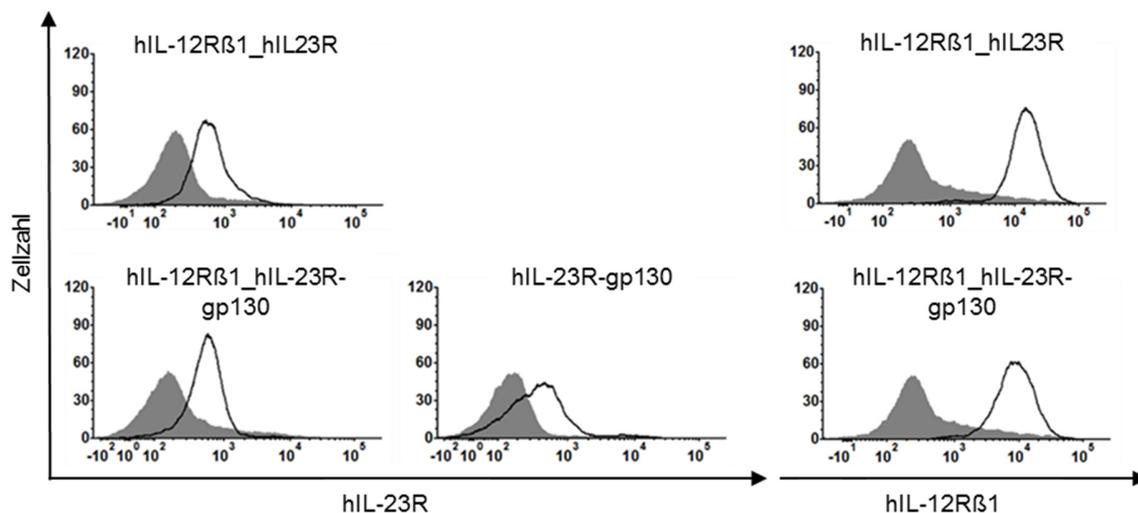


Abb. 11: Analyse der stabilen Oberflächenexpression der Chimäre hIL-23R-gp130 in Ba/F3-gp130-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Pro Ansatz wurden 500000 Zellen mittels fluoreszierender Antikörper gegen den hIL-23R und den hIL-12Rβ1 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die X-Achse bildet die Intensität des Fluoreszenzsignals ab, welche mit der Expressionsmenge des jeweiligen Rezeptors korreliert. Die Y-Achse ist ein Maß für die Zellzahl. Die grau-hinterlegte Kurve stellt gefärbte Ba/F3-gp130-Zellen, welche als Negativkontrolle dienen, dar. Die schwarze Kurve bildet das gemessene Signal der untersuchten Zelllinie ab. Liegt die schwarze Kurve rechts der Negativkontrolle, weist das auf eine Bindung des verwendeten Antikörpers (s.o.) an die Zelloberfläche und damit auf eine verstärkte Rezeptor-Oberflächenexpression hin. Die Zelllinie Ba/F3-gp130_hIL-12Rβ1_hIL-23R diene als Positivkontrolle.

3.1.4 hIL-23R-gp130 und mL-23R-gp130 induzieren eine IL-23 abhängige Zellproliferation mit pSTAT3-Suppression

Um nachzuweisen, dass die Rezeptorchimäre hIL-23R-gp130 nach HIL-23-Stimulation ähnlich wie der IL-23R-Wildtyp zu einer Erhöhung der Zellviabilität führt, wurden Zellviabilitätsassays durchgeführt (s. Abb. 12).

Neben den in dieser Arbeit erstellten Zelllinien Ba/F3-gp130_hIL-23R-gp130 und Ba/F3-gp130_hIL-12Rβ1_hIL-23R-gp130 wurde eine weitere Ba/F3-gp130-Zelllinie, die das murine Äquivalent letzterer Zelllinie darstellte, verwendet (Ba/F3-gp130_mIL-12Rβ1_mIL-23R-gp130) (187). Als Kontrollen dienten verschiedene Ba/F3-gp130-Zelllinien, die entsprechende humane IL-23 Rezeptoren einzeln exprimierten und aus der AG Scheller stammten (s. Abb. 12).

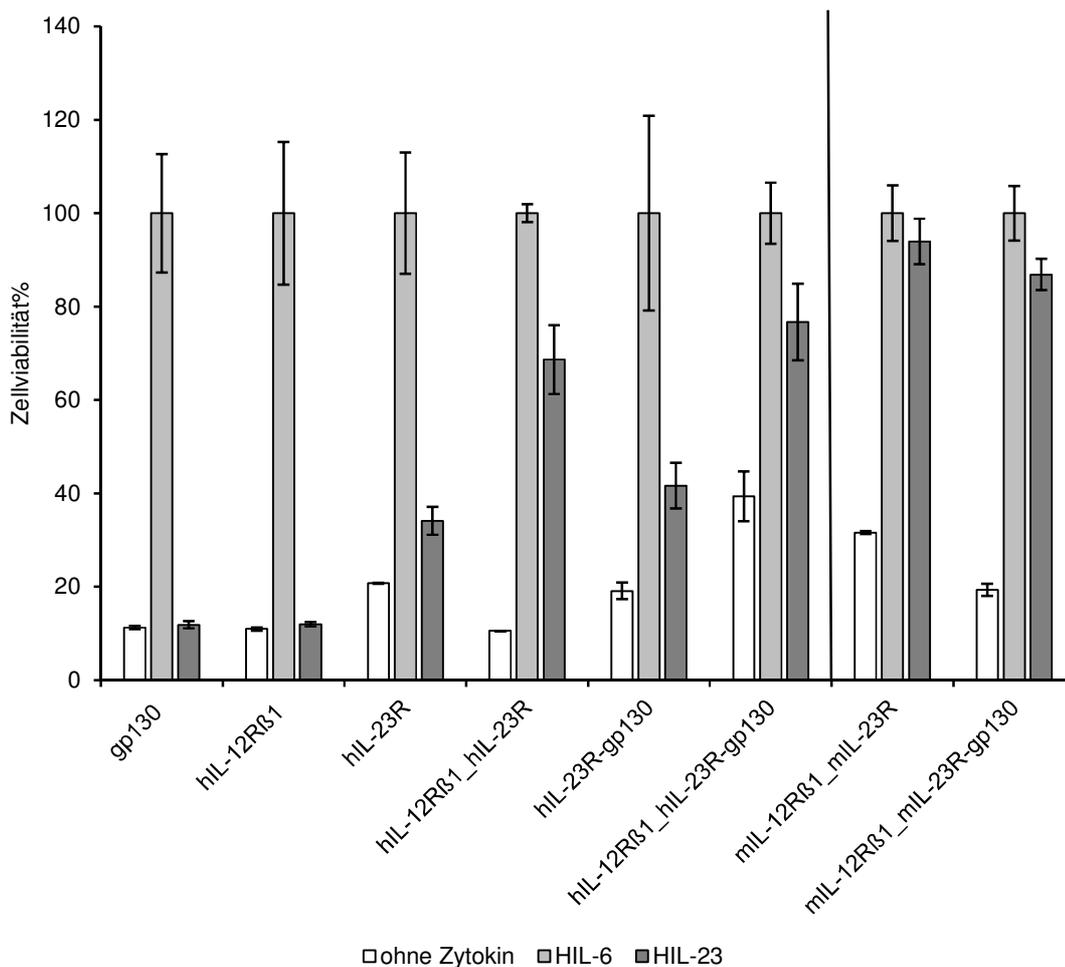


Abb. 12: Analyse der HIL-23 abhängigen Viabilität in den Zelllinien Ba/F3-gp130_hIL12Rβ1_hIL-23R-gp130 und Ba/F3-gp130_mIL-12Rβ1_mIL-23R-gp130. Die Zellen wurden dreimal mit sterilem PBS gewaschen und für 72 Stunden mit 10 ng/ml HIL-6, 10 ng/ml HIL-23 oder ohne Zytokin inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit *CellTiter-Blue Cell Viability Assay's*. Als Negativkontrollen dienten untransfizierte Ba/F3-gp130-Zellen. Potentielle Effekte aufgrund von Homodimerbildung wurden durch Zelllinien untersucht, die lediglich einen Bestandteil des Wildtyp- oder chimären IL-23 Rezeptorkomplexes bildeten. Als Positivkontrolle dienten Ba/F3-gp130-Zelllinien, die beide Bestandteile des IL-23 Rezeptorkomplexes exprimierten. Die gemessenen Zellviabilitäten sind relativ zu dem gemessenen Wachstum unter HIL-6-Zugabe aufgetragen, die Fehlerbalken geben die jeweiligen Standardabweichungen an. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus n=2 (rechts) bzw. n=3 (links) unabhängigen Ergebnissen.

Alle untersuchten Zelllinien zeigten die für Ba/F3-gp130-Zellen typische Erhöhung der Zellviabilität nach Gabe von 10 ng/ml HIL-6. Die Zytokin-unabhängige Viabilität (*background*) war bei allen Zelllinien niedrig, wobei die Zelllinie Ba/F3-gp130_hIL-12Rβ1_hIL-23R-gp130 mit circa 40 % der HIL-6-vermittelten Zellviabilität ein leicht erhöhtes *background*-Signal aufwies. Ba/F3-gp130-Zellen, die lediglich den IL-23R oder den IL-23R-gp130, aber keinen IL-12Rβ1 exprimierten, zeigten nach HIL-23-Gabe eine erhöhte Aktivität bei circa 40 % der HIL-6-vermittelten Zellviabilität. Sowohl die in dieser Arbeit hergestellte Zelllinie Ba/F3-gp130_hIL-

12R β 1_hIL-23R-gp130 als auch das murine Pendant zeigten nach HIL-23-Stimulation eine Zellviabilitätserhöhung zwischen 70 und 100 % der HIL-6-Induzierten Viabilität was mit dem Verhalten des Wildtyp Rezeptorkomplexes vergleichbar war.

Im Folgenden wurden die Linien Ba/F3-gp130_hIL-12R β 1_hIL-23R-gp130 und Ba/F3_mIL-12R β 1_mIL-23R-gp130 mittels Stimulationsassays hinsichtlich ihrer HIL-23 abhängigen STAT3-Aktivierung mit dem jeweiligen Rezeptor-Wildtyp verglichen. Dafür wurden die Zellen stimuliert und nach definierten Zeitpunkten (0, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 480 Minuten) Zellen entnommen, lysiert und eine Menge von 37,5 μ g Gesamtprotein pro Variante mittels Western Blot-Verfahren analysiert (s. Abb. 13).

Die Stimulation humaner und muriner IL-12R β 1/IL-23R-gp130-exprimierender Ba/F3-gp130-Zellen mit 10 ng/ml HIL-23 (s. Abb. 13 D, H) zeigte eine deutliche Veränderung der pSTAT3-Kinetik verglichen mit dem Wildtyp Rezeptorkomplex (s. Abb. 13 B, F). Während im Wildtyp Rezeptor die HIL-23-Stimulation zu einem andauernden pSTAT3- und SOCS3-Signal ohne inverse Korrelation führte, zeigten IL-23R-gp130-exprimierende Zellen eine Reduktion der STAT3-Aktivierung nach Expression von SOCS3. Dieser Effekt setzte in der humanen Variante circa 1 Stunde und in der murinen Variante circa 3 Stunden nach HIL-23-Stimulation ein. Die Lagekontrolle (STAT3) war bei allen Varianten mit gleicher Intensität nachweisbar. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die HIL-23-Stimulation der IL-23R-gp130-Chimären vermehrt die typische pSTAT3-Charakteristik der HIL-6-Stimulation (Positivkontrollen, Abb. 13 A, C, E, G) aufwies und folglich der bekannte, *negative feedback loop* vom IL-6- auf den IL-23-Signalweg übertragen wurde (196).

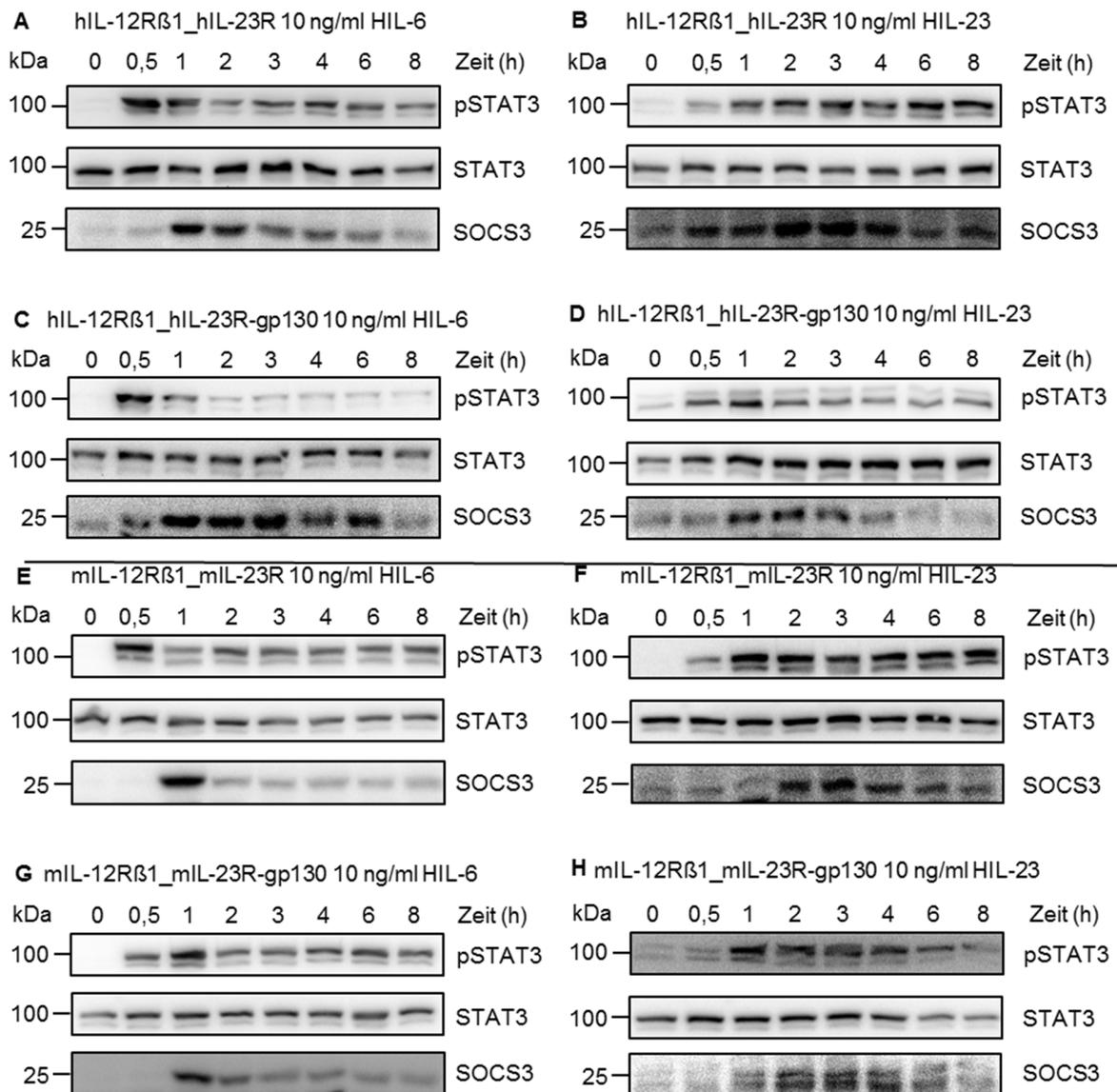


Abb. 13: Kinetik der STAT3-Aktivierung nach HIL-6- und HIL-23-Stimulation der Zelllinien Ba/F3-gp130_hIL-12Rβ1_hIL-23R-gp130 und Ba/F3-gp130_mIL-12Rβ1_mIL-23R-gp130. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, für 5 Stunden in FBS-freiem Medium inkubiert und anschließend für x Minuten mit 10 ng/ml HIL-6 oder HIL-23 stimuliert. Die Zellen wurden pelletiert und lysiert. Anschließend wurden pro Bande 37,5 µg Proteinlysate auf ein SDS-Agarosegel aufgetragen. Folgend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und pSTAT3, STAT3 und SOCS3 mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Als Kontrollen dienten Zellen, die den jeweiligen Wildtyp Rezeptorkomplex exprimieren. Abgebildet sind repräsentative Ergebnisse aus n=2 (humane Rezeptorvarianten) bzw n=3 (murine Rezeptorvarianten) unabhängigen Ergebnissen.

3.1.5 Klonierung der Rezeptorvariante hIL-23R-gp130_N642-S765

Im nächsten Schritt wurde das chimäre Protein hIL-23R-gp130_N642-S765 hergestellt. Jenes entsprach dem hIL-23R-Wildtyp, in dem lediglich die membrannahen intrazellulären 106 Aminosäuren des hIL-23R durch die 123 Aminosäuren 642-765 des humanen gp130 ersetzt wurden. Dadurch wurden neben dem SOCS3-Bindemotiv ebenfalls die membrannahen Motive

BOX1 und BOX2 übertragen (vgl. 1.2.3). Mithilfe dieser Rezeptorvariante sollte gezeigt werden, dass der Transfer der membranahen 123 Aminosäuren von gp130 in den hIL-23R ausreicht, um eine negative Rückkopplung auf das STAT3-Signal zu induzieren. Die zugehörigen Aminosäuresequenzen der transmembranären und intrazellulären Domänen sind in Abbildung 14 dargestellt, während aus Abbildung 15 eine schematische Übersicht der Rezeptorchimäre hervorgeht. Die Aminosäuresequenzen entstammen den Arbeiten von Murakami *et al.* 1991, Hibi *et al.* 1990 und Parham *et al.* 2002 (31, 60, 122).

hIL-23R-Wildtyp

```

LLLGMI VFAVMLSILSLIGIFNRSFR TGIKRRILLIPKWL YEDIPNMKNSNVVKMLQENSELMNNSNSEQVLYVDPM
ITEIKEIFIPKHKPTDYK KENTGPLETRDYPQNSLFDNTTVVYIPDLNTG YKPKQISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKP
PVDSLDSGNNPRLQKHPNFAF SVSVNSLSNTIFLGELSLILNQEGCSPDIQNSVEEETTMLENDSPSETIPEQTL
LPDEFV SCLGIVNEELPSINT YFPQNILESHFNRI S LLEK
  
```

hIL-23R-gp130_N642-S765

```

LLLGMI VFAVMLSILSLIGIF NKRDLIKKH IWPNVDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDOMYSDGNFTD VSVVEIEA
NDKKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSST VQYSTVVHSG YKPKQISNFLP
EGSHLSNNNEITSLTLKPPVD SLDSGNNPRLQKHPNFAF SVSVNSLSNTIFLGELSLILNQEGCSPDIQNSVEEET
TMLENDSPSETIPEQTL LPDEFV SCLGIVNEELPSINT YFPQNILESHFNRI S LLEK
  
```

Abb. 14: Aminosäuresequenz des hIL-23R-Wildtypen und der Chimäre hIL-23R-gp130_N642-S765. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nur Transmembrandomänen und intrazelluläre Domänen dargestellt. Schwarz dargestellt sind die Transmembrandomäne sowie die intrazelluläre Domäne des hIL-23R. Grau dargestellt ist die intrazelluläre Domäne von gp130 mit Ausnahme des SOCS3-Bindemotivs, das rot dargestellt ist. Rot hervorgehoben sind die pSTAT3 bindenden YXXQ-Motive. Blau hervorgehoben sind die Motive BOX1 (membrannah) und BOX2 (membranfern). Weitere Informationen und die zugehörigen Quellen sind 1.2.3 und 1.4.2 zu entnehmen.

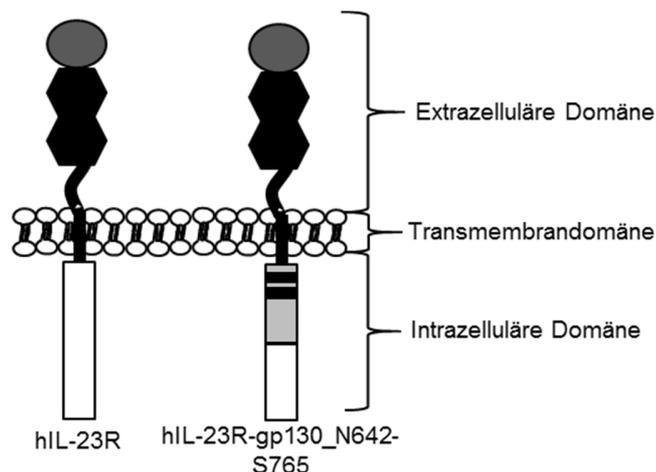


Abb. 15: Schematische Übersicht der Variante hIL-23R-gp130_N642-S765 im Vergleich zum hIL-23R. Dunkelgrau dargestellt sind Immunglobulin-ähnliche Domänen. Zytokinbindende Domänen sind schwarz dargestellt, wobei die typischen Cystein-Motive und WSXWS-Motive nicht hervorgehoben wurden. Die intrazellulären Motive BOX1 und BOX2 sind als schwarze Linien hervorgehoben. Die intrazellulären Domänen sind weiß (hIL-23R) und hellgrau (gp130) dargestellt.

Analog zur Klonierung der Variante hIL-23R-gp130 wurde nun in einem ersten Klonierungsschritt mittels SOE-PCR, ein Teil der gewünschten hIL-23R-gp130_N642-S765-cDNA isoliert. Dafür wurde mittels der Primer DF479 und -482 (s. Tabelle 8) ein 652 bp großes cDNA-Molekül aus dem Plasmid pCR-Script_hIL-23R-gp130 isoliert, das für die membrannahen extrazellulären Aminosäuren und die Aminosäuren der Transmembrandomäne des hIL-23R sowie den gewünschten intrazellulären Teil von gp130 kodierte. Mit Hilfe der Primer DF481 und -155 (s. Tabelle 8) wurde aus dem Plasmid p409_hIL-23R(E444K)-P310 (s. Tabelle 7) ein 463 bp großes cDNA-Fragment isoliert, das für die membranfernen intrazellulären Aminosäuren des hIL-23R kodierte. Beide Abschnitte wurden in einem gemeinsamen PCR-Schritt mittels der Primer DF479 und -155 zu einem 1096 großen cDNA-Fragment fusioniert, gelelektrophoretisch kontrolliert, phosphoryliert und in den dephosphorylierten, mit HincII geschnittenen Vektor pCR-Script eingebracht (vgl. Abb. 7). Das Klonierungsschema inklusive der folgenden Schritte ist Abbildung 16 zu entnehmen.

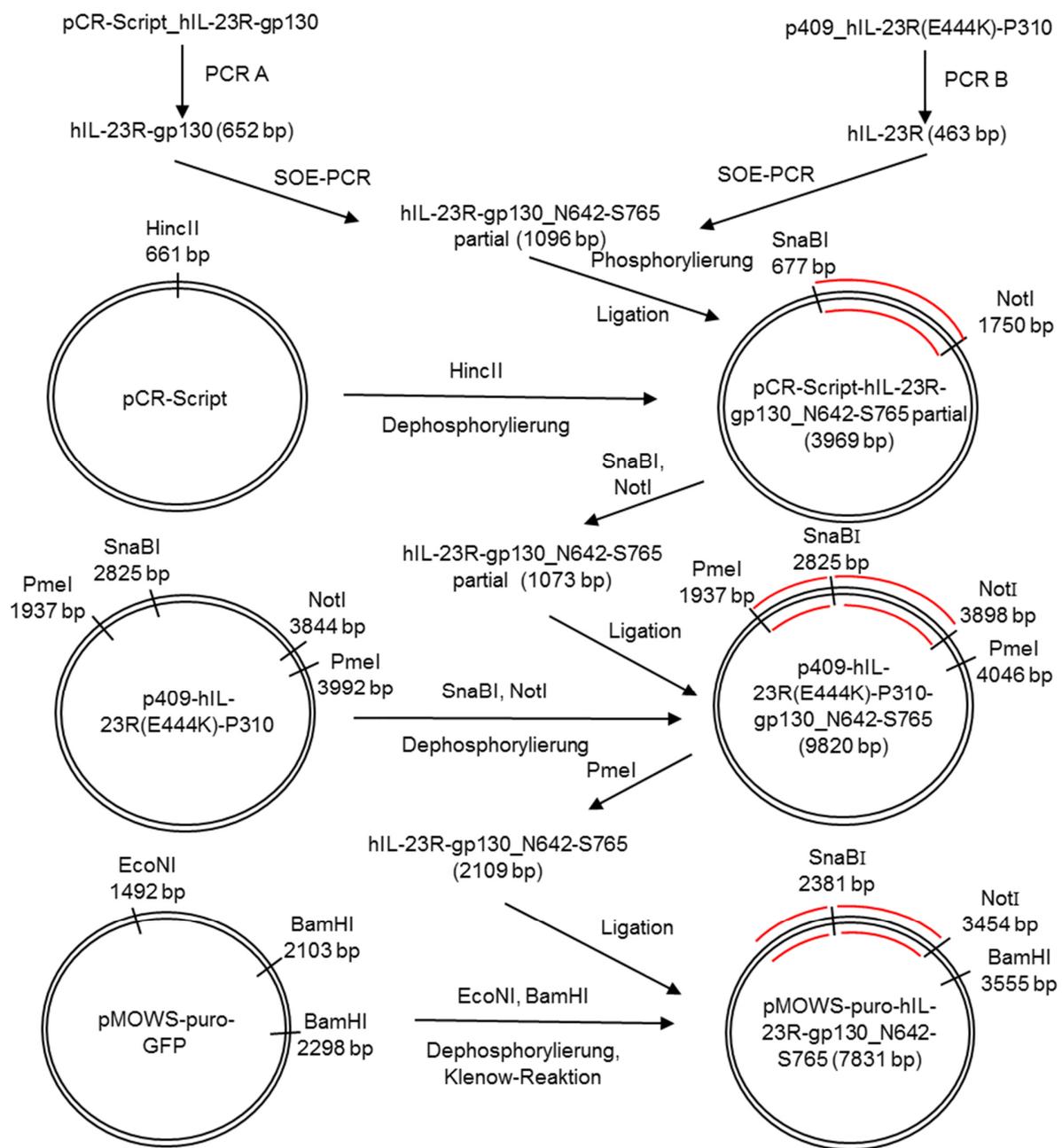


Abb. 16: Klonierungsschema der Rezeptorchimäre hIL-23R-gp130_N642-S765. Aus dem Vektor pCR-Script-hIL-23R-gp130 wurde in einem PCR-Verfahren mittels der Primer DF479 und -482 ein 652 bp großes Zwischenprodukt synthetisiert. Parallel wurde aus dem Vektor p409-hIL-23R(E444K)-P310 mittels der Primer DF481 und -155 ein zweites, 463 bp großes Zwischenprodukt synthetisiert. Beide Zwischenprodukte wurden gelelektrophoretisch kontrolliert, isoliert und in äquimolaren Mengen mittels SOE-PCR zu einer 1096 bp großen Fusions-cDNA verknüpft. Nach gelelektrophoretischer Kontrolle, Isolation und Phosphorylierung wurde diese mit dem HincII-geschnittenen, dephosphorylierten Vektor pCR-Script ligiert. Im nächsten Klonierungsschritt wurde die cDNA mittels SnaBI- und NotI-Restriktion isoliert und in den ebenfalls mittels SnaBI und NotI-geschnittenen Vektor p409-hIL23R(E444K)-P310 überführt. Nach erfolgreicher Testtransfektion wurde die Rezeptor-cDNA im dritten Klonierungsschritt durch PmeI-Restriktion aus dem Vektor p409-hIL23R-gp130_N642-S765 (9820 bp) isoliert und mit dem durch Dr. Doreen Floss im Vorfeld mittels EcoNI- sowie BamHI-geschnittenen, mit der Klenow-Reaktion behandelten und dephosphorylierten Vektor pMOWS-puro-GFP ligiert. Der virale Expressionsvektor pMOWS-puro-hIL-23R-gp130_N642-S765 wurde anschließend mittels Restriktionsanalyse kontrolliert.

Nach einer Kontrollsequenzierung des synthetisierten Plasmids pCR-Script_hIL-23R-gp130_N642-S765 partial wurde im nächsten Klonierungsschritt analog zur Klonierung der Variante hIL-23R-gp130 die erstellte Fusions-cDNA aus dem Vektor pCR-Script-hIL-23R-gp130_N642-S765 partial isoliert und in den Expressionsvektor p409-hIL-23R(E444K)-P310 übertragen, so dass das cDNA-Fragment um den verbliebenen extrazellulären Abschnitt des hIL-23R komplettiert wurde. Dabei wurde ebenfalls mittels SnaB1 und NotI ein 1073 bp großes *insert* isoliert und in das 8747 bp große, dephosphorylierte *backbone* des SnaBI- und NotI-geschnittenen Vektors p409-hIL-23R(E444K)-P310 ligiert. Das Expressionsplasmid p409-hIL-23R(E444K)-P310-gp130_N642-S765 enthielt nun die komplette gewünschte cDNA, umgeben von zwei PmeI-Schnittstellen (s. Abb. 16). Anschließend erfolgte eine Restriktionskontrolle mittels EcoRI, die die erwarteten Ergebnisse validierte (s. Abb. 17).

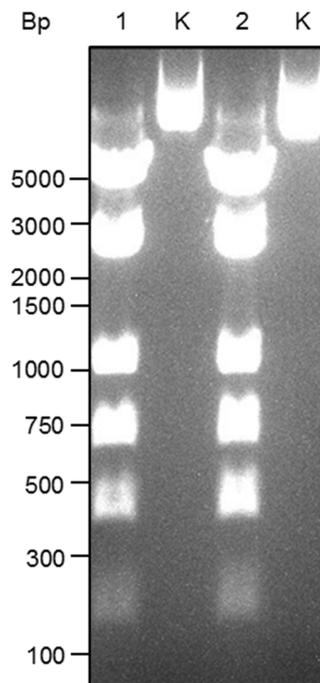


Abb. 17: EcoRI-Restriktionsanalyse des Expressionsplasmids p409_hIL-23R(E444K)-P310-gp130_N642-S765. Dargestellt sind zwei Klone des erstellten Plasmids (1, 2). Erwartete Größe der Fragmente: 5150 bp, 2436 bp, 1008 bp, 669 bp, 402 bp, 155 bp. Die rechtsliegenden Kontrollen („K“) enthielten das jeweilige unverdaute Plasmid mit 9820 bp Länge. Als Größenstandard diente der *GeneRuler Express DNA Ladder*.

Im nächsten Schritt wurden U4C-Zellen mit 5 µg des Plasmids p409-hIL-23R(E444K)-P310-gp130_N642-S765 transient transfiziert. Anschließend wurde in einem Western Blot-Verfahren die Expression der hIL-23 Rezeptorchimäre nachgewiesen, wobei mittels p409-hIL-23R(E444K)-P310 transfizierte U4C-Zellen als Positiv- und pEGFP N1-transfizierte U4C-Zellen als Negativkontrolle dienten (s. Abb. 18). Die Banden des hIL-23R-Wildtypen und der Variante hIL-23R-gp130_N642-S765 lagen dabei wie erwartet bei 68 respektive 70,3 kDa, während die Expressionsmengen vergleichbar waren.

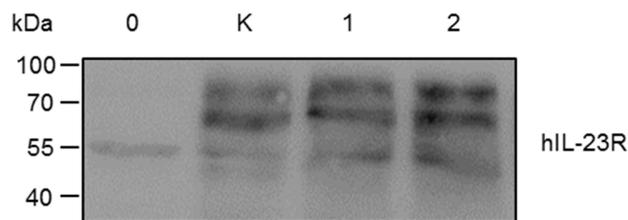


Abb. 18: Expressionsanalyse der Chimäre hIL-23R-gp130_N642-S765 in U4C-Zellen. U4C-Zellen wurden mit der Positivkontrolle p409-hIL-23R(E444K)-P310 (K) und dem erstellten Plasmid p409-hIL-23R(E444K)-P310-gp130_N642-S765 (1, 2) transient transfiziert. Die Zahl 0 kennzeichnet das Lysat pEGFP-transfizierter U4C-Zellen (Negativkontrolle). Zwei Tage nach Transfektion erfolgte die Lyse mittels pSTAT3-Lysepuffer und eine Proteinquantifizierung mittels BCA-Assay. Die Proben wurden mit *Lämmli*-Puffer versetzt, 10 Minuten bei 95 °C aufgekocht und anschließend wurden 50 µg Lysat pro Bande auf ein SDS-Agarosegel aufgetragen. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die Banden mittels eines spezifischen hIL-23R-Antikörpers gefärbt. Als Größenstandard diente der Proteinmarker *PageRuler Prestained Protein Ladder*.

Im letzten Schritt wurde die Rezeptor-kodierende cDNA von dem Expressionsvektor p409 in den retroviralen Vektor pMOWS-puro-GFP subkloniert. Dabei wurde das 2109 bp große *insert* mithilfe einer *PmeI*-Restriktion sowie einer anschließenden Isolation aus dem Plasmid p409-hIL-23R(E444K)-P310-gp130_N642-S765 erzeugt. Das Plasmid pMOWS-puro-GFP wurde mittels *EcoNI* und *BamHI* geschnitten. Das dadurch entstandene 5722 bp große, mittels Klenow-Reaktion behandelte *backbone* wurde folgend mit der *insert* cDNA ligiert (s. Abb.16).

3.1.6 Die Chimäre hIL-23R-gp130_N642-S765 wird stabil in Ba/F3-gp130-Zellen exprimiert

Auch das im Rahmen dieser Arbeit erstellte Plasmid pMOWS-puro-hIL-23R-gp130_N642-S765 wurde genutzt, um stabil transfizierte Ba/F3-gp130-Zellen herzustellen. Das Vorgehen entsprach dabei exakt dem in 3.1.3 geschilderten Ablauf.

Im nächsten Schritt wurde ebenfalls mittels Durchflusszytometrie und fluoreszenzmarkierten hIL-23R- sowie hIL-12Rβ1-Antikörpern die Oberflächenexpression der eingebrachten Rezeptoren überprüft (s. Abb. 19). Wie erwartet konnte in den erstellten Zelllinien ein verstärktes Fluoreszenzsignal verglichen mit untransfizierten Ba/F3-gp130-Zellen nach hIL-12Rβ1- und/oder

hIL-23R-Antikörpergabe beobachtet und so die erfolgreiche Oberflächenexpression dargestellt werden.

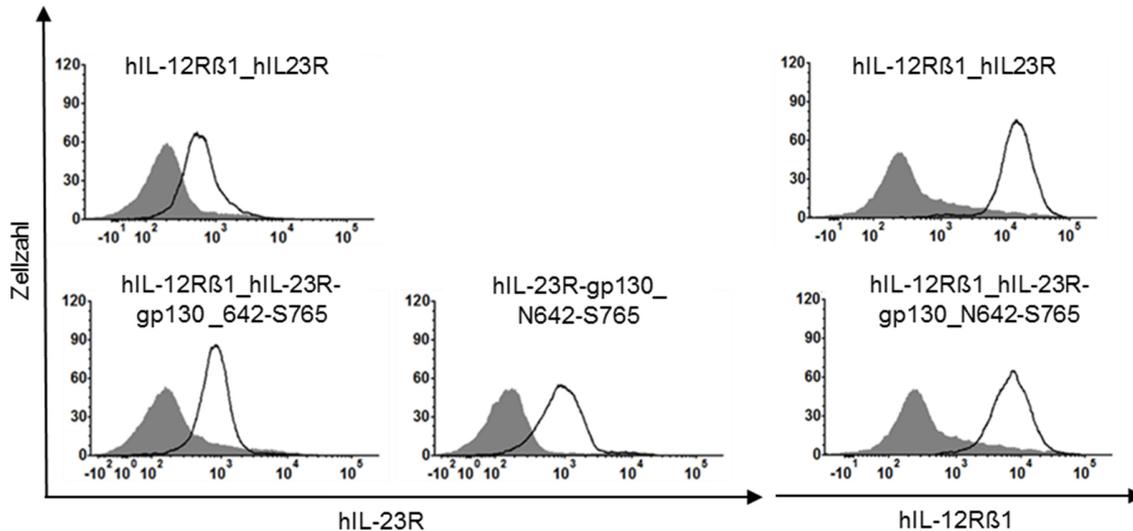


Abb. 19: Analyse der stabilen Oberflächenexpression der Chimäre hIL-23R-gp130_N642-S765 in Ba/F3-gp130-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Pro Ansatz wurden 500000 Zellen mittels fluoreszierender Antikörper gegen den hIL-23R und den hIL-12Rβ1 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die X-Achse bildet die Intensität des Fluoreszenzsignals ab, welche mit der Expressionsmenge des jeweiligen Rezeptors korreliert. Die Y-Achse ist ein Maß für die Zellzahl. Die grau-hinterlegte Kurve stellt gefärbte Ba/F3-gp130-Zellen, welche als Negativkontrolle dienen, dar. Die schwarze Kurve bildet das gemessene Signal der untersuchten Zelllinie ab. Liegt die schwarze Kurve rechts der Negativkontrolle, weist das auf eine Bindung des jeweiligen Antikörpers (s.o.) an die Zelloberfläche und damit auf eine verstärkte Rezeptor-Oberflächenexpression hin. Die Zelllinie Ba/F3-gp130_hIL-12Rβ1_hIL-23R diente als Positivkontrolle.

3.1.7 hIL-23R-gp130_N642-S765 induziert eine IL-23 abhängige Zellproliferation mit partieller pSTAT3-Suppression

Die erstellten Zelllinien Ba/F3-gp130_hIL-23R-gp130_N642-S765 und Ba/F3-gp130_hIL-12Rβ1_hIL-23R-gp130_N642-S765 wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer HIL-6- und HIL-23-induzierten Zellviabilität untersucht (s. Abb. 20). Alle untersuchten Zelllinien zeigten dabei eine Erhöhung der Zellviabilität nach Gabe von 10 ng/ml HIL-6, was den grundsätzlich-proliferativen Status belegte. Die Zytokin-unabhängige Zellproliferation (*background*) war bei allen Zelllinien niedrig. Die HIL-23-induzierte Proliferation war in Zellen, die lediglich den hIL-23R-gp130_N642-S765 exprimierten leicht und in Zellen, die zusätzlich den hIL-12Rβ1 exprimierten deutlich erhöht, was ebenfalls den Erwartungen entsprach.

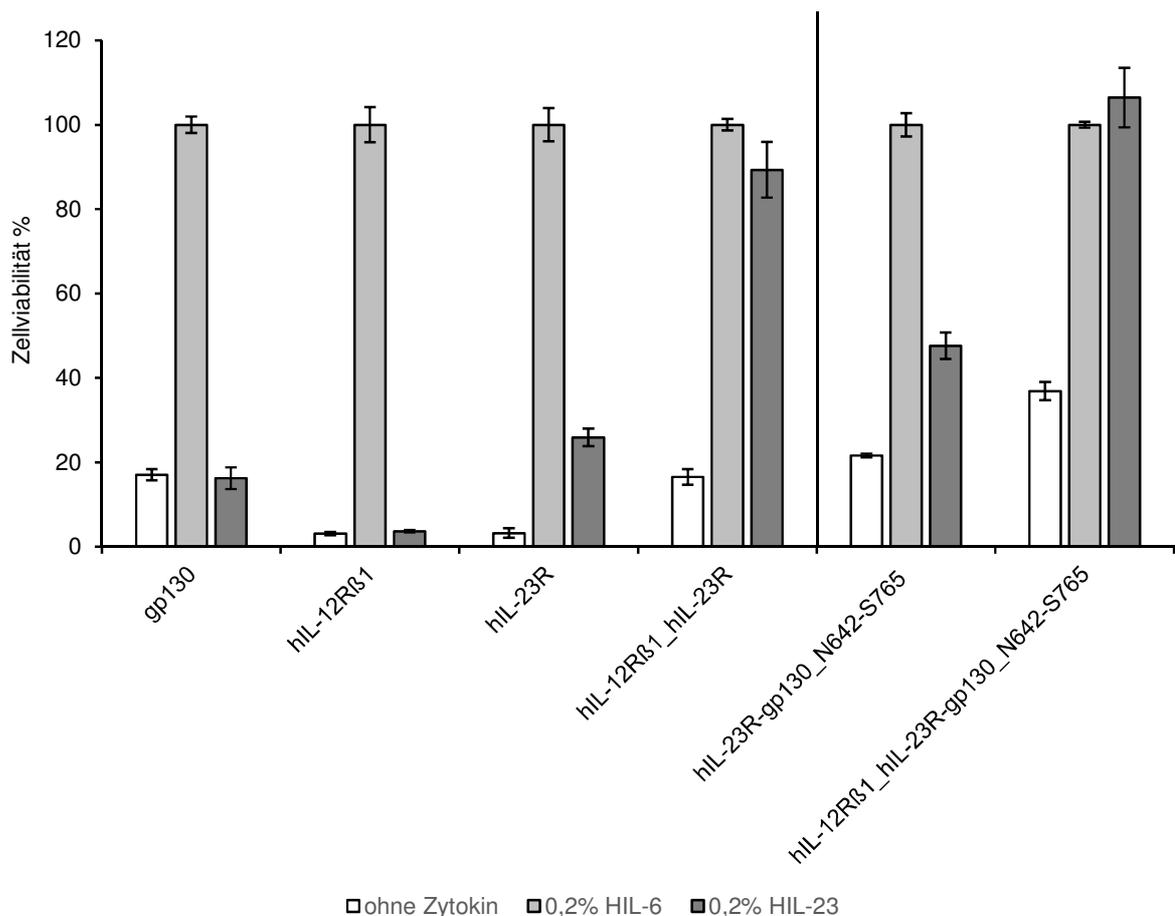


Abb. 20: Analyse der HIL-23 abhängigen Viabilität in den Zelllinien Ba/F3-gp130_hIL-23R-gp130_N642-S765 und Ba/F3-gp130_hIL-12Rβ1_hIL-23R-gp130_N642-S765. Die Zellen wurden dreimal mittels sterilem PBS gewaschen und für 72 Stunden mit 10 ng/ml HIL-6, 10 ng/ml HIL-23 oder ohne Zytokin inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit *CellTiter-Blue Cell Viability Assays*. Als Negativkontrollen dienten untransfizierte Ba/F3-gp130-Zellen. Potentielle Effekte aufgrund von Homodimerbildung wurden durch Zelllinien untersucht, die lediglich einen Bestandteil des Wildtyp- oder chimären IL-23 Rezeptorkomplexes bildeten. Als Positivkontrolle dienten Ba/F3-gp130-Zelllinien, die beide Bestandteile des IL-23 Rezeptorkomplexes exprimieren. Die gemessenen Zellviabilitäten sind relativ zu dem gemessenen Wachstum unter HIL-6-Zugabe aufgetragen, die Fehlerbalken geben die jeweiligen Standardabweichungen an. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus n=3 unabhängigen Ergebnissen.

Im Folgenden wurde die Linie Ba/F3-gp130_hIL-12Rβ1_hIL-23R-gp130_N642-S765 mittels Stimulationsassay hinsichtlich ihrer HIL-23 abhängigen STAT3-Aktivierung analysiert. Dafür wurden die Zellen stimuliert und zu definierten Zeitpunkten (0, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 480 Minuten) Proben entnommen, lysiert und anschließend 37,5 µg Gesamtprotein pro Bande mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion von pSTAT3, STAT3 und SOCS3 mittels spezifischer, fluoreszenzmarkierter Antikörper (s. Abb. 21).

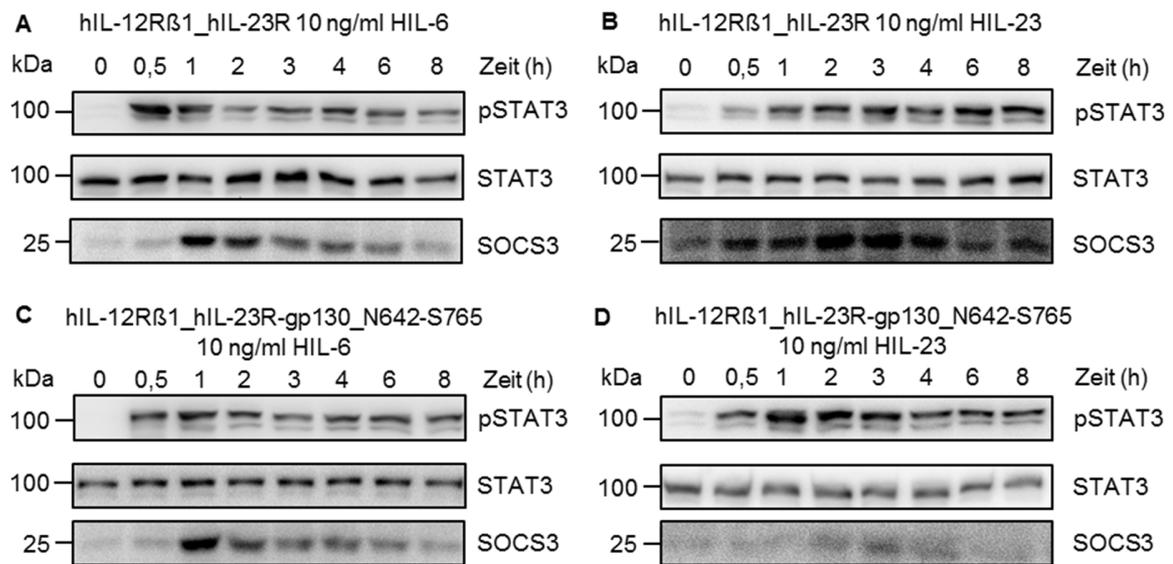


Abb. 21: Aktivierung von STAT3 nach HIL-6- und HIL-23-Stimulation in der Zelllinie Ba/F3-gp130_hIL-12R β 1_hIL-23R-gp130_N642-S765. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, für 5 Stunden in FBS-freiem Medium inkubiert und anschließend für x Minuten mit 10 ng/ml HIL-6 oder HIL-23 stimuliert. Die Zellen wurden pelletiert und lysiert. Anschließend wurden pro Bande 37,5 μ g Proteinlysate auf ein SDS-Agarosegel aufgetragen. Folgend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und pSTAT3, STAT3 und SOCS3 mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Die dargestellte Stimulation Wildtyp Rezeptorkomplex exprimierender Zellen (A, B) diente als Kontrolle und zeigt dieselbe Versuchsreihe wie Abbildung 13. Als Größenstandard diente der Proteinmarker *PageRuler Prestained Protein Ladder*. Abgebildet sind repräsentative Ergebnisse aus n=2 unabhängigen Ergebnissen.

Auch der Rezeptorkomplex aus hIL-12R β 1 und hIL-23R-gp130_N642-S765 zeigte eine HIL-23-induzierte, HIL-6-ähnliche STAT3-Aktivierung, die im Zeitverlauf abnahm (s. Abb 21, C-D). Die beobachtete Reduktion der STAT3-Aktivierung, zeitgleich mit der Expression von SOCS3 nach 1-2 Stunden, war dabei vergleichbar mit den in Abbildung 13 aufgeführten Ergebnissen, wenn auch schwächer ausgeprägt. Das Signal der Ladekontrolle (STAT3) war auch innerhalb dieses Versuchsaufbaus vergleichbar, was die Validität der erhobenen Ergebnisse unterstreicht. Zusammengefasst konnte die IL-23-induzierte STAT3-Aktivierung durch die Erzeugung von IL-23R-gp130-Chimären gehemmt werden. Ein negativer *feedback* Mechanismus vergleichbar zur IL-6-Signaltransduktion konnte somit erzeugt werden.

3.2 Visualisierung des IL-23R mittels mCherry

3.2.1 Verhält sich die Variante IL-23R-mCherry wie der Rezeptorwildtyp?

Ziel des zweiten Teilprojekts war es, die intrazelluläre IL-23R-Expression und -Verortung bei intakter IL-23-Signaltransduktion zu ermöglichen. Im Rahmen dessen wurde eine Rezeptorvariante analysiert, die aus dem IL-23R und einem C-terminal addierten mCherry-Molekül bestand (s. Abb. 22). mCherry ist ein 236-Aminosäuren-großes Fluoreszenzprotein, das Licht mit einem optischen Maximum bei 587 nm Wellenlänge emittiert (197).

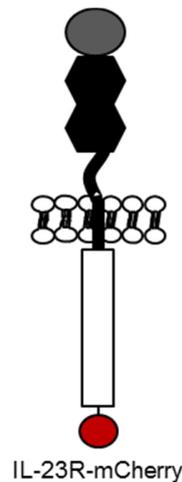


Abb. 22: Schematische Übersicht des Fusionsproteins IL-23R-mCherry. Grau dargestellt ist die Immunglobulin-ähnliche Domäne. Zytokinbindende Domänen sind schwarz dargestellt, wobei die typischen Cystein-Motive und WSXWS-Motive nicht hervorgehoben wurden. Weiß dargestellt ist die intrazelluläre Domäne. Rot hervorgehoben ist das addierte, C-terminale mCherry.

3.2.2 hIL-23R-mCherry wird stabil in Ba/F3-gp130-Zellen exprimiert

Die Plasmide p409_hIL-23R(E444K)-P310-mCherry, p409_mIL-23R-mCherry und pMOWS-puro_hIL-23R(E444K)-P310-mCherry konnten von Franz Christian Horstmeier übernommen werden. Zwecks stabiler Expression wurden, wie in den Abschnitten 3.1.3 und 3.1.6 dargelegt, ebenfalls Ba/F3-gp130- und Ba/F3-gp130_hIL-12R β 1-Zellen retroviral transduziert, zwei Wochen mittels Puromycin/Hygromycin selektiert und anschließend mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper sowie Durchflusszytometrie auf eine stabile Oberflächenexpression des IL-23R-mCherry Proteins hin überprüft (s. Abb. 23).

Wie erwartet konnte in den erstellten Zelllinien ein verstärktes Fluoreszenzsignal verglichen mit Ba/F3-gp130-Zellen nach hIL-12R β 1- und/oder hIL-23R-Antikörpergabe beobachtet und so die erfolgreiche Oberflächenexpression des Fusionsproteins dargestellt werden. Eine Interferenz des fluoreszierenden Signals von mCherry mit dem emittierten Signal der genutzten Antikörper lag dabei nicht vor.

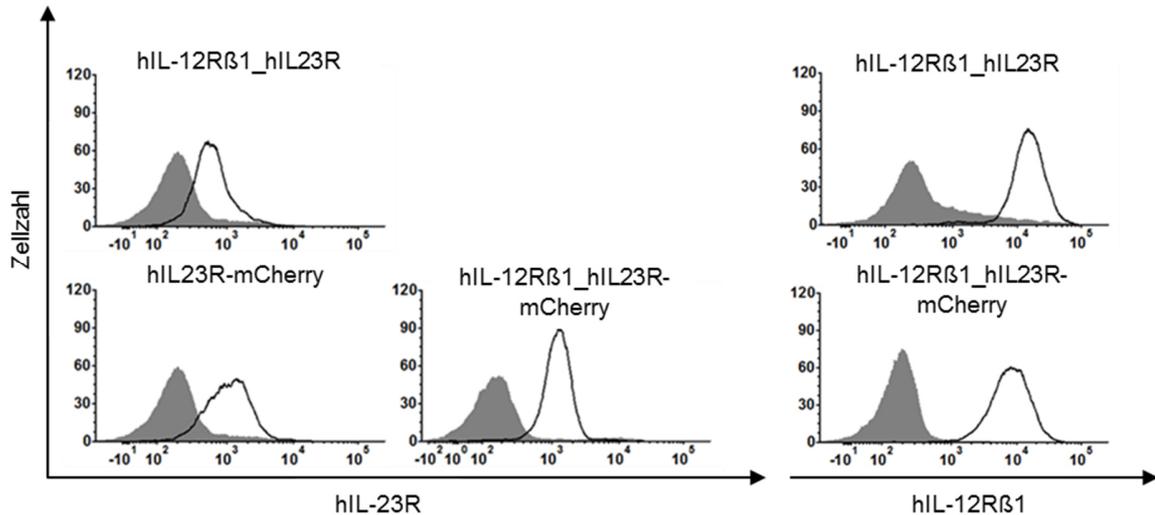


Abb. 23: Analyse der stabilen Oberflächenexpression des Fusionsproteins hIL-23R-mCherry in Ba/F3-gp130-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Pro Ansatz wurden 500000 Zellen mittels fluoreszierender Antikörper gegen den hIL-23R und den hIL-12R β 1 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die X-Achse bildet die Intensität des Fluoreszenzsignals ab, welche mit der Expressionsmenge des jeweiligen Rezeptors korreliert. Die Y-Achse ist ein Maß für die Zellzahl. Die grau-hinterlegte Kurve stellt gefärbte Ba/F3-gp130-Zellen, welche als Negativkontrolle dienen, dar. Die schwarze Kurve bildet das gemessene Signal der untersuchten Zelllinie ab. Liegt die schwarze Kurve rechts der Negativkontrolle, weist das auf eine Bindung des Antikörpers (s.o.) an die Zelloberfläche und damit auf eine verstärkte Rezeptor-Oberflächenexpression hin. Die Zelllinie Ba/F3-gp130_hIL-12R β 1_hIL-23R diente als Positivkontrolle.

3.2.3 Die Rezeptorvariante hIL-23R-mCherry ist funktionell mit dem Wildtyp Rezeptor vergleichbar

Die erstellten Zelllinien Ba/F3-gp130_hIL-23R-mCherry und Ba/F3-gp130_hIL-12R β 1_hIL-23R-mCherry wurden hinsichtlich ihrer HIL-6- und HIL-23-induzierten Zellproliferation untersucht (s. Abb. 24).

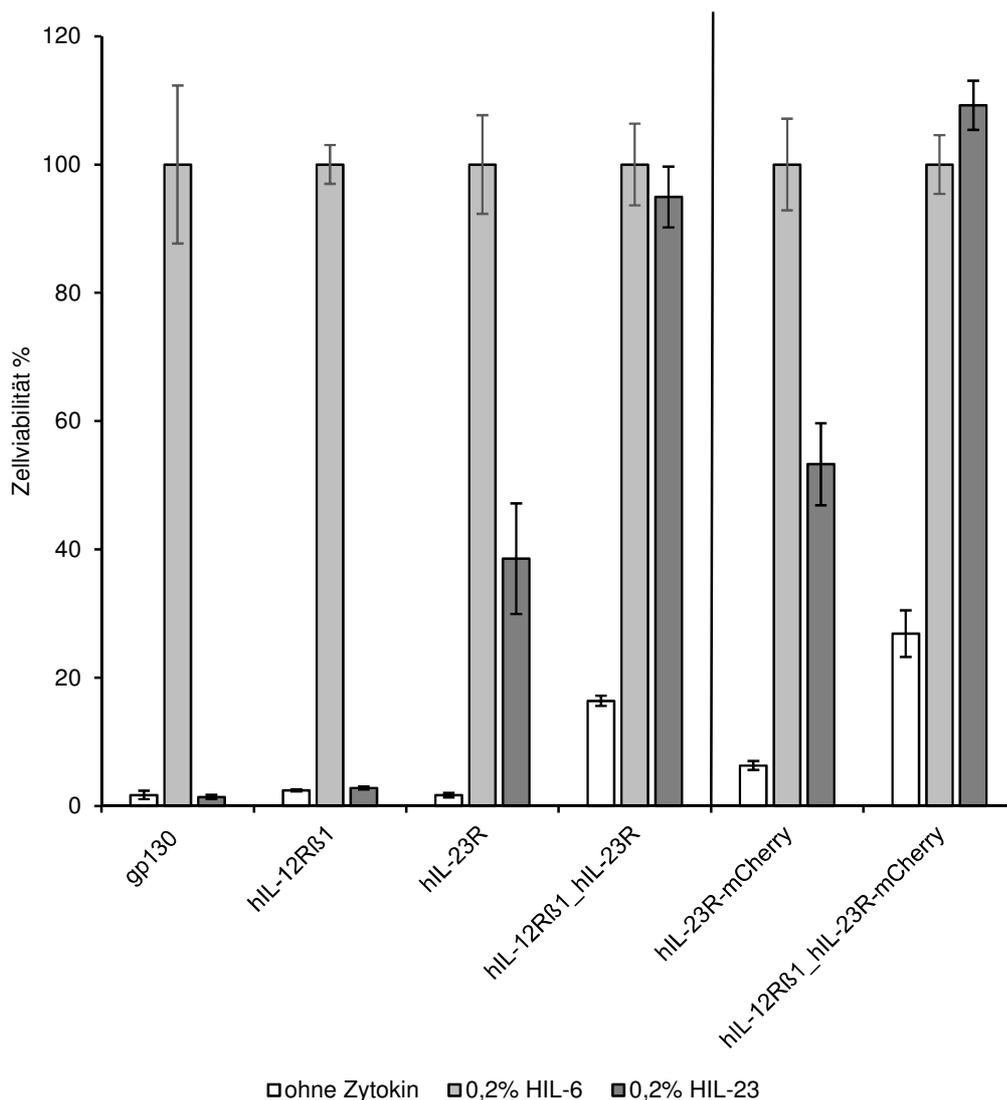


Abb. 24: Analyse der HIL-23 abhängigen Viabilität in den Zelllinien Ba/F3-gp130_hIL-23R-mCherry und Ba/F3-gp130_hIL-12Rβ1_hIL-23R-mCherry. Die Zellen wurden dreimal mittels sterilem PBS gewaschen und für 72 Stunden mit 10 ng/ml HIL-6, 10 ng/ml HIL-23 oder ohne Zytokin inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit *CellTiter-Blue Cell Viability Assays*. Als Negativkontrollen dienten untransfizierte Ba/F3-gp130-Zellen. Potentielle Effekte aufgrund von Homodimerbildung wurden durch Zelllinien untersucht, die lediglich einen Bestandteil des Wildtyp- oder chimären IL-23 Rezeptorkomplexes bildeten. Als Positivkontrolle dienten Ba/F3-gp130-Zelllinien, die beide Bestandteile des IL-23 Rezeptorkomplexes exprimieren. Die gemessenen Zellviabilitäten sind relativ zu dem gemessenen Wachstum unter HIL-6-Zugabe aufgetragen, die Fehlerbalken geben die jeweiligen Standardabweichungen an. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus n=2 unabhängigen Ergebnissen.

Alle untersuchten Zelllinien zeigten eine Erhöhung der Zellproliferation nach Gabe von 10 ng/ml HIL-6, was den proliferativen Zellstatus belegte. Die Zytokin-unabhängige Viabilität (*background*) war bei allen Zelllinien niedrig. Die HIL-23-induzierte Proliferation war in hIL-23R-mCherry-exprimierenden Zellen leicht und in hIL-23R-mCherry-hIL-12Rβ1-koexprimierenden Zellen deutlich erhöht. Zusammengefasst lässt sich schlussfolgern, dass hIL-23R-mCherry-Homodimere eine partielle und hIL-12Rβ1-hIL-23R-mCherry-Heterodimere eine starke HIL-23-induzierte

Zellproliferation vermitteln. Folglich ist die Variante hIL-23R-mCherry hinsichtlich der zytokinabhängigen Proliferation mit dem Wildtyprezeptorkomplex vergleichbar (47, 196).

Um zu untersuchen, ob das HIL-23-responsive Verhalten auch bei unterschiedlichen HIL-23-Konzentrationen vergleichbar zum Wildtyp ist, wurde im Folgenden ein konzentrationsabhängiger Proliferationsassay durchgeführt (s. Abb. 25).

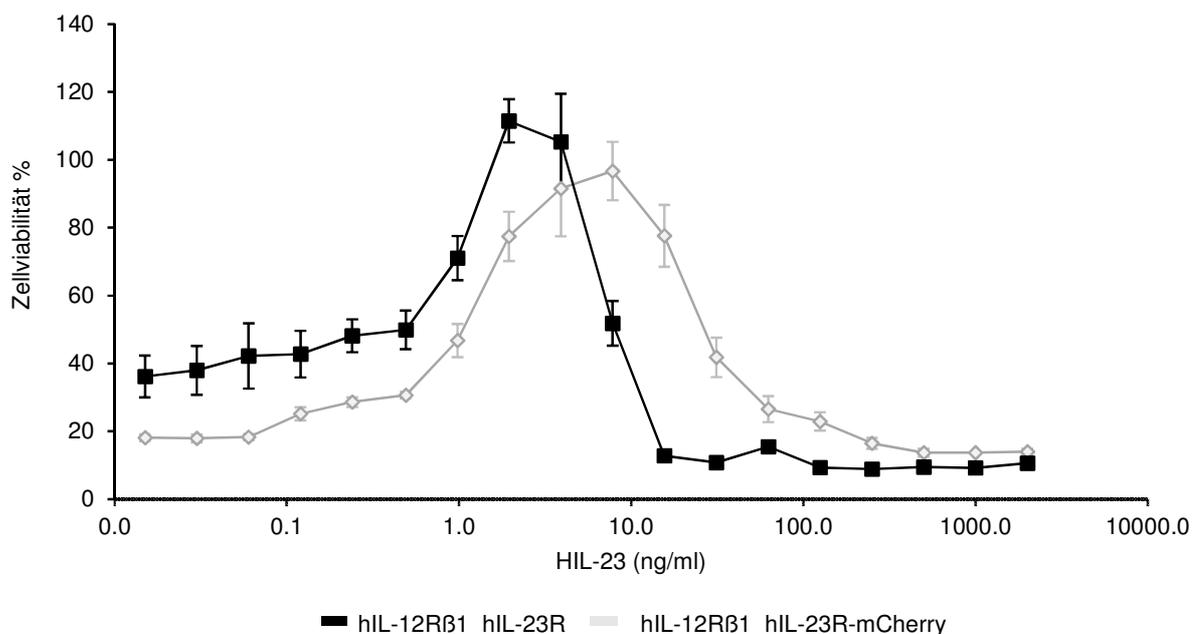


Abb. 25: Analyse der konzentrationsabhängigen, HIL-23-vermittelten Proliferation der Zelllinie Ba/F3-gp130_hIL-12Rβ1_hIL-23R-mCherry. Die Zellen wurden dreimal mittels sterilem PBS gewaschen und für 72 Stunden mit 10 ng/ml HIL-6, unterschiedlichen Konzentrationen HIL-23 oder ohne Zytokin inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels des *CellTiter-Blue Cell Viability Assays*. Als Positivkontrolle diente eine Zelllinie, die den Wildtyp-hIL-23 Rezeptorkomplex exprimiert. Die gemessenen Zellviabilitäten sind relativ zu dem gemessenen Wachstum unter HIL-6-Zugabe aufgetragen, die Fehlerbalken geben die jeweiligen Standardabweichungen an. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus n=2 unabhängigen Ergebnissen.

Aus Abbildung 25 geht hervor, dass hIL-12Rβ1/hIL-23R –exprimierende Ba/F3-gp130 Zellen eine vergleichbare Zellproliferation wie hIL-12Rβ1/hIL-23R-mCherry-exprimierende Ba/F3-gp130 Zellen nach Zugabe unterschiedlicher HIL-23-Konzentrationen aufweisen, da beide Kurven einen ähnlichen Verlauf nehmen. Bei sehr niedrigen HIL-23-Konzentrationen bestand lediglich eine geringe Zellproliferation zwischen 20 % (hIL-12Rβ1/hIL-23R) und 40 % (hIL-12Rβ1/hIL-23R-mCherry) der Zellproliferation nach Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6. Ab einer Konzentration von circa 0,5 ng/ml kam es jedoch zu einem rapiden Anstieg der gemessenen Zellproliferation mit einem Maximum von über 80 % der HIL-6-vermittelten Zellproliferation zwischen 2 ng/ml HIL-23 (hIL-12Rβ1/hIL-23R) und 8 ng/ml HIL-23 (hIL-12Rβ1/hIL-23R-mCherry). Das Maximum der HIL-23-induzierten Zellproliferation war in hIL-12Rβ1/hIL-23R-mCherry-exprimierenden Zellen

in Richtung höherer HIL-23-Konzentrationen verschoben, was auf eine leichte Minderung der HIL-23-Responsivität hinweisen könnte. Unter höheren Zytokinkonzentrationen kam es in beiden Zelllinien zu einem Absinken der gemessenen Zellproliferation, mit einem Minimum von unter 20 % bei HIL-23-Konzentrationen von 500 ng/ml aufwärts. Diese beobachteten toxischen Effekte hoher HIL-23-Konzentrationen auf hIL-12R β 1/hIL-23R-exprimierende Ba/F3-gp130 Zellen sind aus der Doktorarbeit von Franz Christian Horstmeier (bislang unveröffentlicht) und der Masterarbeit von Sofie Beier bekannt (198). Zusammengefasst ist davon auszugehen, dass die intrazelluläre Addition von mCherry einen geringen Einfluss auf konzentrationsabhängige Effekte der IL-23-Signaltransduktion hat.

Um die physiologische, HIL-23-responsive Aktivität der Variante hIL-23R-mCherry vollständig zu etablieren, wurde zuletzt getestet, ob eine HIL-23-Stimulation ebenfalls zur STAT3-Aktivierung führte. Dafür wurden Ba/F3-gp130_hIL-12R β 1_hIL-23R-mCherry-Zellen nach Stimulation mit 10 ng/ml HIL-23 und HIL-6 lysiert und mittels Western Blot untersucht. Aus Abbildung 26 geht hervor, dass in der Variante hIL-23R-mCherry vergleichbar mit dem Rezeptor-Wildtyp eine STAT3-Aktivierung erfolgte.

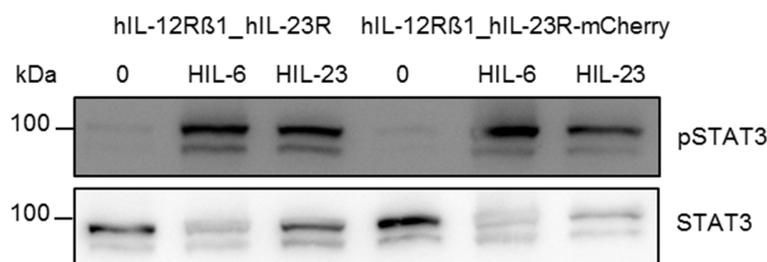


Abb. 26: Das Rezeptorfusionsprotein hIL-23R-mCherry aktiviert STAT3 vergleichbar mit dem Wildtyp Rezeptor. Stabil-transfizierte Ba/F3-gp130-Zellen wurden fünfmal mittels sterilem PBS gewaschen, für 3 Stunden in FBS-freiem Medium inkubiert und anschließend mit 10 ng/ml HIL-6, HIL-23 oder ohne Zytokin für 30 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert und lysiert. Anschließend wurden 50 μ g Proteinlysate pro Variante auf ein SDS-Agarosegel aufgetragen. Folgend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und pSTAT3 sowie STAT3 mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Als Kontrollen dienten Ba/F3-gp130 Zellen, die den Wildtyp Rezeptorkomplex exprimieren. Als Größenstandard diente der Proteinmarker *PageRuler Prestained Protein Ladder*.

3.2.4 mIL-23R-mCherry kann mittels Konfokalmikroskopie visualisiert werden

In seiner Dissertation konnte Franz Christian Horstmeier die Interaktion von hCIB2 und dem hIL-23R demonstrieren (bislang unveröffentlicht). hCIB2 ist ein Ca²⁺- und Integrin bindendes Protein, dass in intrazelluläre Signalwege und das *trafficking* membrangebundener Moleküle involviert ist (199–201). Im Rahmen seiner bisher unveröffentlichten Dissertation konnte Franz Christian

Horstmeier die Hypothese aufstellen, dass hCIB2 als negativer Regulator der intrazellulären Transportvorgänge des hIL-23R wirkt.

Im letzten Abschnitt dieses Teilprojektes wurde ein Fusionsprotein aus dem mIL-23R und mCherry (mIL-23R-mCherry) und ein Fusionsprotein aus hCIB2 und dem *green fluorescent protein* (hCIB2-GFP) dafür verwendet, die Interaktion zwischen dem mIL-23R und hCIB2 konfokalmikroskopisch zu untersuchen (202). So sollten Franz Christian Horstmeiers Erkenntnisse vertieft und auf den murinen IL-23R ausgeweitet werden. Im Rahmen dessen wurden HeLa-Zellen zunächst transient mit den Vektoren p409_mIL-23R-mCherry und pcDNA3.1_hCIB2-GFP transfiziert. Die Zellen wurden folgend mittels DAPI-Kernfärbung und einem spezifischen Tubulin-Antikörper zwecks Visualisierung des Zytoskletts behandelt (s. Abschnitt 2.4.6).

Aus Abbildung 27 ist ersichtlich, dass mIL-23R-mCherry sich im Bereich des Zellkerns sowie in geringerem Ausmaß an die Zellmembran anlagerte (C). Auch das Protein hCIB2-GFP befand sich überwiegend im Bereich des Zellkerns (B). Der mittels DAPI angefärbte Zellkern imponiert blau (A), während die Färbung des Zytoskletts mittels des α -Tubulin-Antikörpers hellbraun imponiert (D). Während die gemeinsame Visualisierung beider fluoreszierender Proteine möglich war (E), konnten jedoch keine Rückschlüsse auf eine Veränderung der Lokalisation des mIL-23R durch hCIB2 gezogen werden.

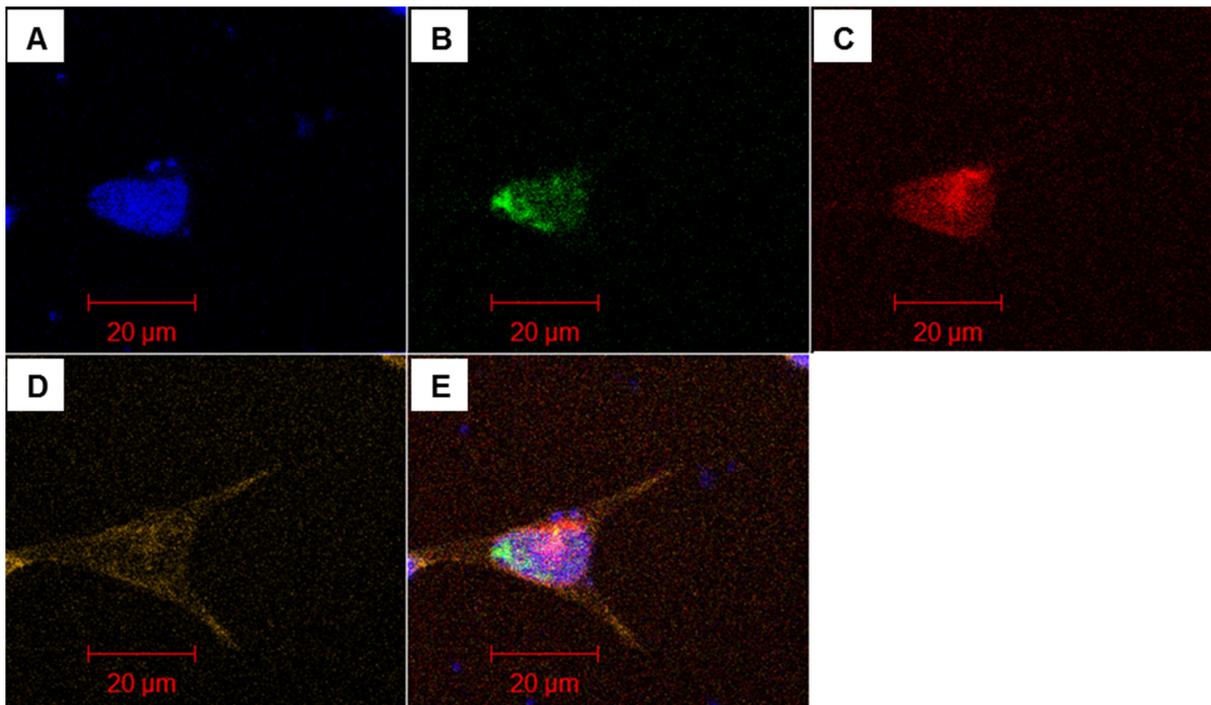


Abb. 27: Konfokalmikroskopische Darstellung von mIL-23R-mCherry in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden zunächst mit den Vektoren p409_mIL-23R-mCherry (C) sowie pcDNA3.1_hCIB2-GFP (B) transfiziert. Es folgte eine dreitägige Inkubation mit zwischenzeitlichem Mediumswechsel. Nach Fixierung der Zellen mittels Formaldehyd wurde durch Triton-Gabe die Zellpermeabilität erhöht und mittels der Gabe eines spezifischen Tubulin-Antikörpers (D) das Zytoskelett angefärbt. Am nächsten Tag folgte die Kernfärbung mittels DAPI (A). Die Auswertung erfolgte mittels des *LSM510-Meta confocal microscope*.

3.3 Analyse der Deletionsvariante hIL-23R Δ 476

3.3.1 Wie wirkt sich die Deletion 476-629 auf die Aktivität des hIL-23R aus?

Floss *et al.* zeigten 2013, dass eine murin-humane IL-23 Rezeptorchimäre, bei der die Aminosäuren 476 bis 629 deletiert worden waren, eine hIL-23-induzierte, pSTAT3-unabhängige Zellproliferation aufwies (47). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde in dieser Arbeit die humane Deletionsvariante hIL-23R Δ 476, welche das nicht-chimäre, humane Pendant darstellt, synthetisiert und funktionell in Ba/F3-gp130-Zellen charakterisiert.

3.3.2 Klonierung der Deletionsvariante hIL-23R Δ 476

Das Alignment des hIL-23R sowie der synthetisierten Deletionsvariante hIL-23R Δ 476 ist Abbildung 28 zu entnehmen. Dabei ist zu beachten, dass die konstruierte Variante keine pSTAT3 bindenden YXXQ-Motive (484, 611) und lediglich das membrannaher, SHP2 bindende YEDI-Motiv an der Stelle 397 enthielt (47). Die Aminosäuresequenz entstammt der Arbeit von Parham *et al.* 2002 (122).

hIL-23R	LLLGMI VF AVMLSILSLIGIFNRSFRTGIKRRILLIPKWL YEDI IPNMKNSNVVKMLQEN
hIL-23R Δ 476	LLLGMI VF AVMLSILSLIGIFNRSFRTGIKRRILLIPKWL YEDI IPNMKNSNVVKMLQEN
hIL-23R	SELMNNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTGPLETRDYPQNSLFDNTTVV
hIL-23R Δ 476	SELMNNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTGPLETRDYPQNSLFDNTTVV
hIL-23R	YIPDLNTG YKPO ISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPPVDSLDSGNNPRLQKHPNF AF SVS
hIL-23R Δ 476	-----
hIL-23R	SVNSLSNTIFLGELSLILNQGECS SP DIQNSVEEETMLLENDSPSETIPEQTLLPDEFV
hIL-23R Δ 476	-----
hIL-23R	SCLGIVNEELPSINT YFPQ NI LE SHFN RIS LLEK
hIL-23R Δ 476	-----

Abb. 28: Alignment des hIL-23R und der Deletionsvariante hIL-23R Δ 476. Die Abbildung zeigt die Aminosäuresequenzen der Transmembrandomänen (blau hervorgehoben) und der intrazellulären Abschnitte des hIL-23R sowie der Deletionsvariante hIL-23R Δ 476. Der extrazelluläre Abschnitt des hIL-23R ist aus Übersichtsgründen nicht aufgeführt. Gelb hervorgehoben ist das membrannaher YEDI-Motiv. Rot hervorgehoben sind pSTAT3 bindende YXXQ-Motive. Weitere Informationen und die zugehörigen Quellen sind den Abschnitten 1.2.3 und 1.4.2 zu entnehmen.

Zur Synthese des 582 bp großen, extrazellulären und transmembranären Teils der hIL-23R Δ 476-cDNA wurde das Verfahren der Deletions-PCR eingesetzt. Als *template* diente im ersten Schritt das Plasmid p409_hIL-23R(E444K)-P310 (s. Tabelle 7), wobei die genutzten Primer DF479 und -210 (s. Tabelle 8) lediglich den gewünschten Rezeptorteil begrenzten und eine SnaBI- sowie NotI-

Restriktionsschnittstelle enthielten. Als Klonierungsvektor fungierte das HincII-verdaute Plasmid pCR-Script (s. Tabelle 7). Nach einer Phosphorylierung des generierten *inserts* folgte die Ligation in das dephosphorylierte Vektor *backbone* mit anschließender Kontrollsequenzierung. Im nächsten Klonierungsschritt erfolgte die Subklonierung des *inserts* mittels SnaBI-/NotI-Restriktionsspaltung des erstellten Plasmids pCR-Script-hIL-23R Δ 476 in den ebenfalls mittels NotI-/SnaBI-geschnittenen Vektor p409-hIL-23R(E444K)-P310. Diese sowie die im Verlauf folgenden Klonierungsschritte sind Abbildung 29 zu entnehmen.

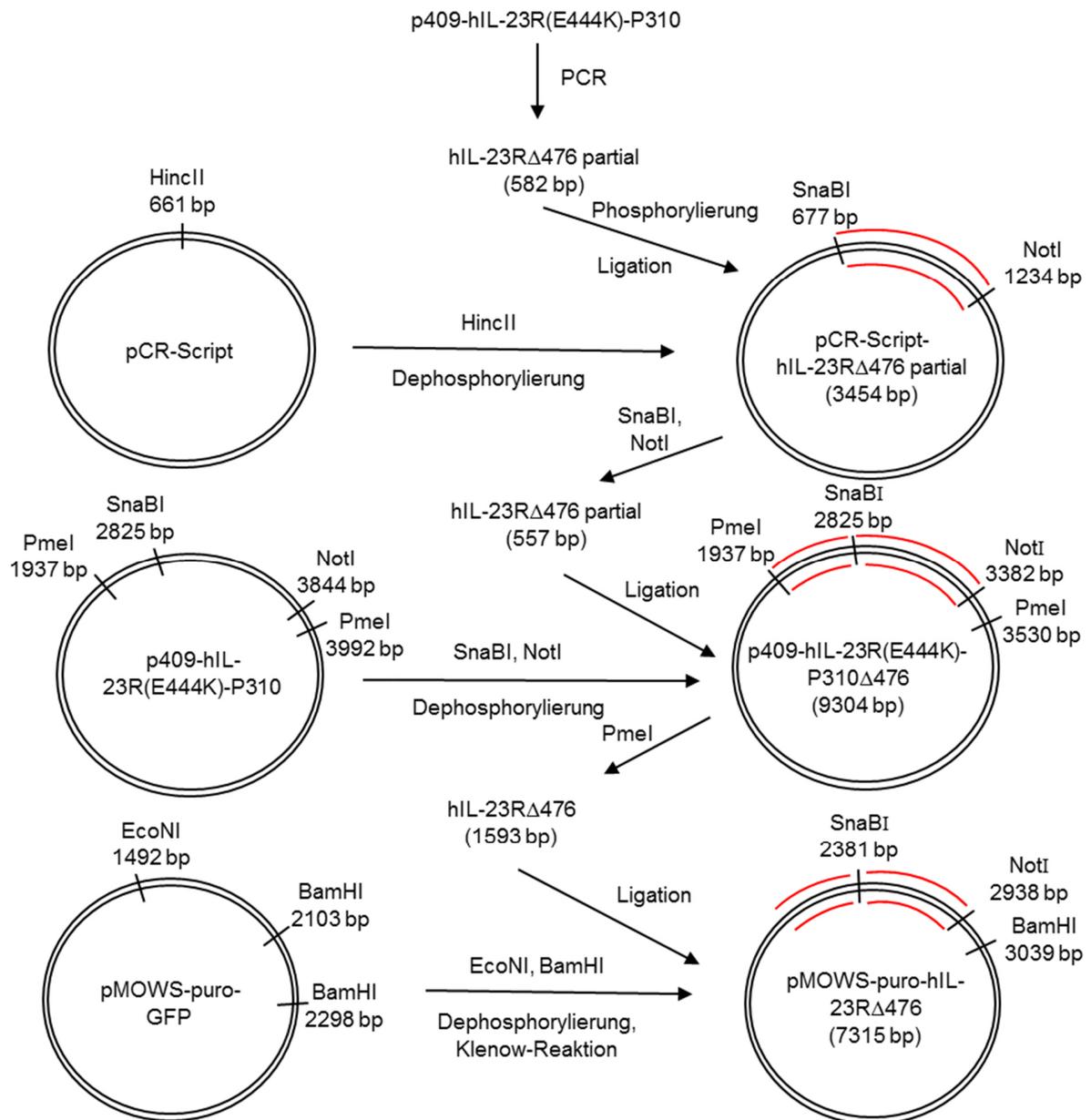


Abb. 29: Klonierungsschema der Rezeptorvariante hIL-23R Δ 476. Aus dem Plasmid p409-hIL-23R(E444K)-P310 wurde mittels der Primer DF479 und -210 in einer Deletions-PCR ein 582 bp großer cDNA-Abschnitt hergestellt (hIL-23R Δ 476 partial). Nach gelelektrophoretischer Kontrolle, Isolation und Phosphorylierung wurde dieser mit dem HincII-geschnittenen, dephosphorylierten Vektor pCR-Script ligiert. Im nächsten Klonierungsschritt wurde die cDNA mittels SnaBI- und NotI-Restriktion isoliert und mit dem ebenfalls mittels SnaBI und NotI-geschnittenen Vektor p409-hIL23R(E444K)-P310 ligiert. Nach erfolgreicher Testtransfektion wurde die Rezeptor-cDNA im dritten Klonierungsschritt durch PmeI-Restriktion aus dem Vektor p409-hIL23R Δ 476 (9304 bp) isoliert und mit dem im Vorfeld durch Dr. Doreen Floss mittels EcoNI- sowie BamHI-geschnittenen, mit der Klenow-Reaktion behandelten, dephosphorylierten Vektor pMOWS-puro-GFP ligiert. Der virale Expressionsvektor pMOWS-puro-hIL-23R Δ 476 (7315 bp) wurde abschließend mittels Restriktionsanalyse kontrolliert.

Zur Kontrolle des erstellten Plasmids p409_hIL-23R(E444K)-P310Δ476 wurde eine analytische EcoRI-Restriktionsspaltung mit anschließender Agarosegelelektrophorese durchgeführt (s. Abb. 30 A). Anschließend erfolgte die transiente Transfektion von U4C-Zellen, welche die Expression der erzeugten Rezeptorvariante belegte (s. Abb. 30 B).

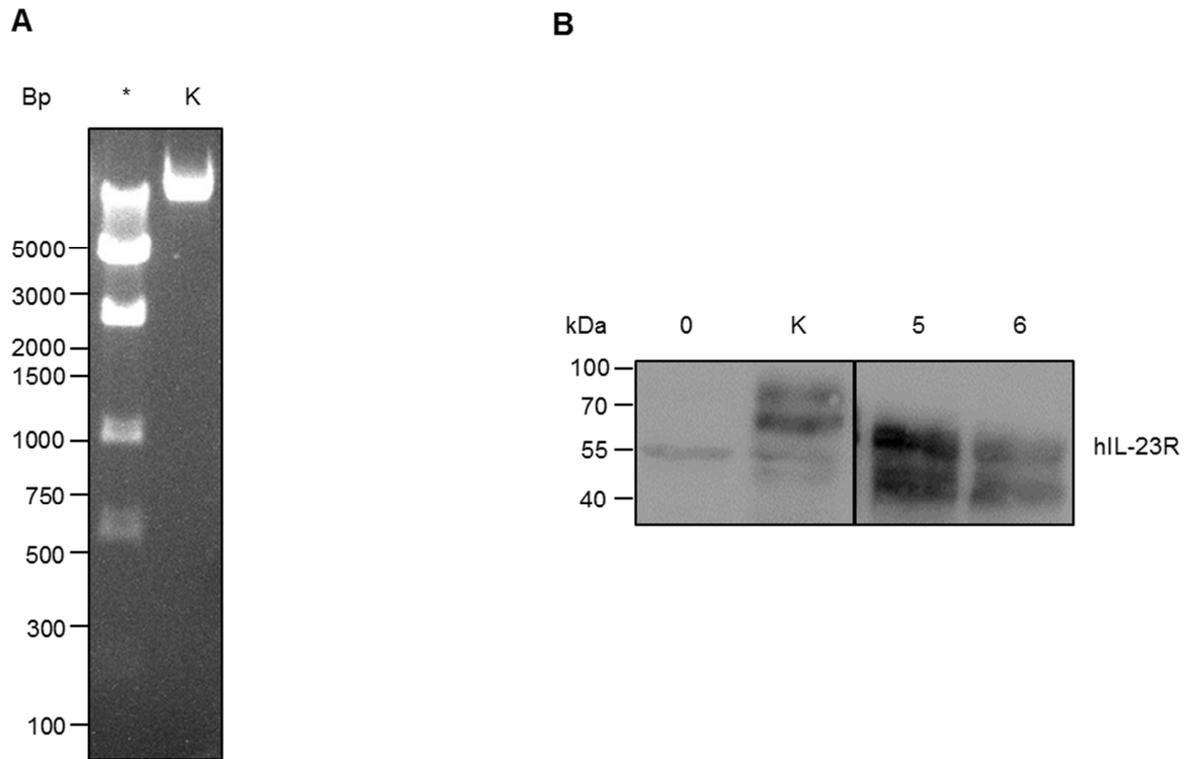


Abb. 30: EcoRI-Restriktionsspaltung und Testtransfektion des Expressionsplasmids p409_hIL-23R(E444K)-P310Δ476. (A) EcoRI-Restriktion des erstellten Plasmids (*). Erwartete Größe der Fragmente: 5150 bp, 2436 bp, 1008 bp, 555 bp, 155 bp. Die Kontrolle („K“) enthielt das unbehandelte Plasmid mit 9304 bp Länge. Als Größenstandard diente der *GeneRuler Express DNA Ladder*. (B) Expressionsanalyse der Deletionsvariante hIL-23RΔ476 in U4C-Zellen. U4C-Zellen wurden mit der Positivkontrolle p409-hIL-23R(E444K)-P310 (K) und dem erstellten Plasmid p409-hIL-23R(E444K)-P310Δ476 (5, 6) transient transfiziert. Die Zahl 0 kennzeichnet das Lysat pEGFP-transfizierter U4C-Zellen (Negativkontrolle). Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mittels pSTAT3-Lysepuffer lysiert und eine Proteinquantifizierung mittels BCA-Assay durchgeführt. Die Proben wurden mit Lämmli-Puffer versetzt, 10 Minuten bei 95 °C aufgekocht und es wurden 50 µg Lysat pro Bande auf ein SDS-Agarosegel aufgetragen. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die Banden mittels eines spezifischen hIL-23R-Antikörpers gefärbt. Als Größenstandard diente der Proteinmarker *PageRuler Prestained Protein Ladder*.

Abschließend wurde mithilfe einer PmeI-Restriktion die 1593 bp große hIL-23RΔ476-cDNA isoliert und in den mittels EcoNI-/BamHI-Restriktion, Klenow-Fragment und Dephosphorylierung behandelten retroviralen Vektor pMOWS-puro-GFP subkloniert (s. Abb. 29).

3.3.3 hIL-23R Δ 476 wird stabil in Ba/F3-gp130-Zellen exprimiert

Das im Rahmen dieses Projekts erstellte Plasmid pMOWS-puro-hIL-23R Δ 476 wurde genutzt, um stabil transfizierte Ba/F3-gp130-Zellen herzustellen. Das Vorgehen entsprach dabei exakt dem in den Kapiteln 3.1.3, 3.1.6 und 3.2.2 geschilderten Ablauf.

Mittels Durchflusszytometrie und fluoreszenzmarkierten hIL-23R- sowie hIL-12R β 1-Antikörpern wurde die Oberflächenexpression der eingebrachten Rezeptoren überprüft (s. Abb. 31). Wie erwartet wurde in den erstellten Zelllinien ein verstärktes Fluoreszenzsignal verglichen mit untransfizierten Ba/F3-gp130-Zellen nach hIL-12R β 1- und/oder hIL-23R-Antikörpereinsatz beobachtet und so die erfolgreiche Oberflächenexpression dargestellt.

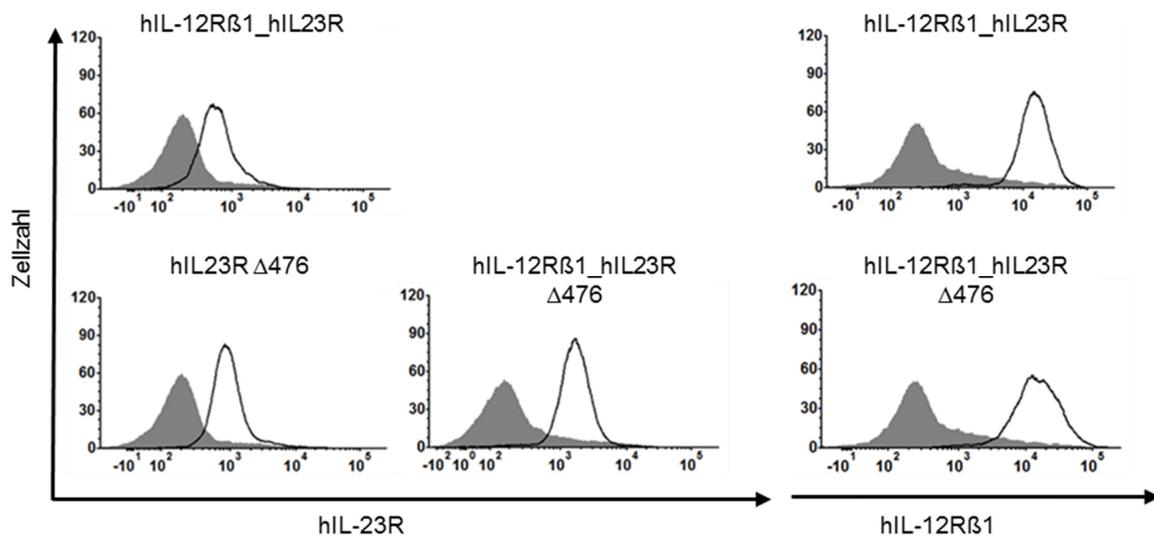


Abb. 31: Analyse der stabilen Oberflächenexpression der Deletionsvariante hIL-23R Δ 476 in Ba/F3-gp130-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Pro Ansatz wurden 500000 Zellen mittels fluoreszierender Antikörper gegen den hIL-23R und den hIL-12R β 1 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die X-Achse bildet die Intensität des Fluoreszenzsignals ab, welche mit der Expressionsmenge des jeweiligen Rezeptors korreliert. Die Y-Achse ist ein Maß für die Zellzahl. Die grau-hinterlegte Kurve stellt gefärbte Ba/F3_gp130-Zellen, welche als Negativkontrolle dienen, dar. Die schwarze Kurve bildet das gemessene Signal der untersuchten Zelllinie ab. Liegt die schwarze Kurve rechts der Negativkontrolle, weist das auf eine Bindung des Antikörpers (s.o.) an die Zelloberfläche und damit auf eine verstärkte Rezeptor-Oberflächenexpression hin. Die Zelllinie Ba/F3-gp130_hIL-12R β 1_hIL-23R diene als Positivkontrolle.

3.3.4 Die Deletion der intrazellulären Aminosäuren 476-629 des IL-23R resultiert in einer inaktiven Rezeptorvariante

Die HIL-6 und HIL-23 abhängige Zellproliferation der generierten Ba/F3-gp130-Zellen wurde mittels Proliferationsassay untersucht (s. Abb. 32).

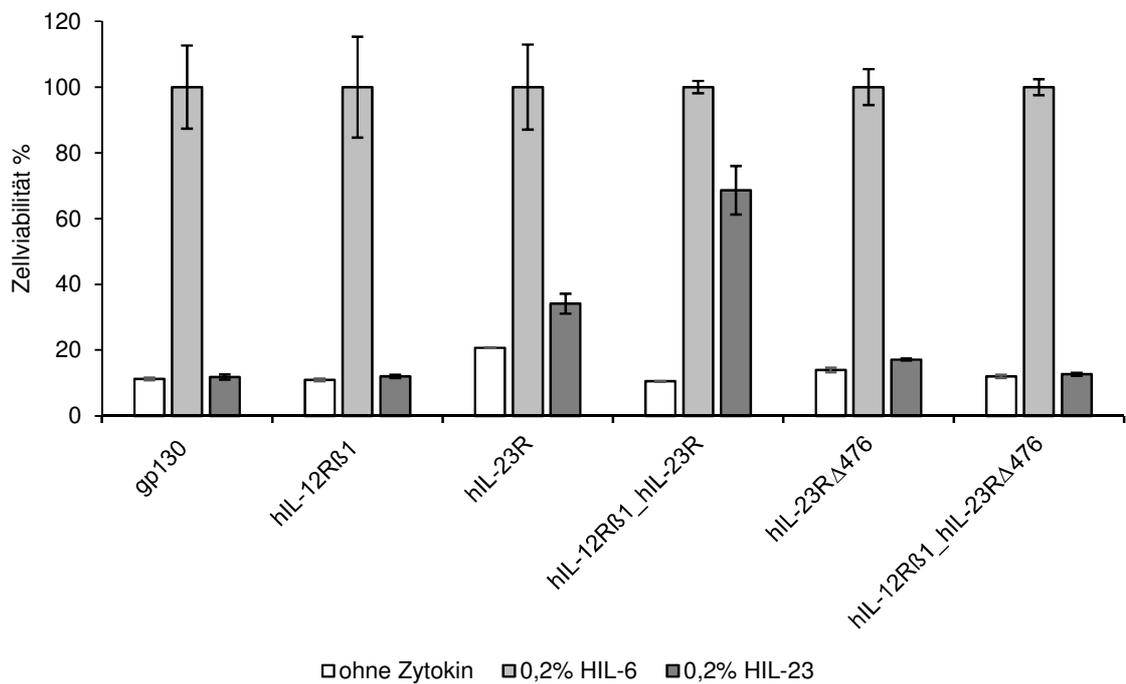


Abb. 32: Analyse der HIL-23 abhängigen Viabilität in den Zelllinien Ba/F3-gp130_hIL-23RΔ476 und Ba/F3-gp130_hIL-12Rβ1_hIL-23RΔ476. Die Zellen wurden dreimal mittels sterilem PBS gewaschen und für 72 Stunden mit 10 ng/ml HIL-6, 10 ng/ml HIL-23 oder ohne Zytokin inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit *CellTiter-Blue Cell Viability Assays*. Als Negativkontrollen dienten untransfizierte Ba/F3-gp130-Zellen. Potentielle Effekte aufgrund von Homodimerbildung wurden durch Zelllinien untersucht, die lediglich einen Bestandteil des Wildtyp- oder hIL-23RΔ476- Rezeptorkomplexes bildeten. Als Positivkontrolle dienten Ba/F3-gp130-Zelllinien, die beide Bestandteile des IL-23 Rezeptorkomplexes exprimieren. Die gemessenen Zellviabilitäten sind relativ zu dem gemessenen Wachstum unter HIL-6-Zugabe aufgetragen, die Fehlerbalken geben die jeweiligen Standardabweichungen an. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus n=2 unabhängigen Ergebnissen.

Alle untersuchten Zelllinien zeigten eine Erhöhung der Zellviabilität nach Gabe von 10 ng/ml HIL-6, was den proliferativen Status der Zellen belegte (s. Abb. 32). Das Zytokin-unabhängige *background*-Signal war bei allen Zelllinien niedrig. Die HIL-23-induzierte Viabilität war sowohl in hIL-23RΔ476- als auch in hIL-12Rβ1-koexprimierenden Zellen nicht erhöht. Entgegen den Erwartungen zeigte die erstellte Deletionsvariante kein HIL-23-responsives Verhalten. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die humane Deletionsvariante hIL-23RΔ476 im Gegensatz zur chimären Deletionsvariante aus der Arbeit von Floss *et. al.* 2013 keine IL-23-induzierte Proliferation aufweist.

3.4 hCIB2 spielt eine Rolle im IL-23-Signalweg

3.4.1 Wo bindet hCIB2 an den IL-23R?

Bisher unveröffentlichte Arbeiten der AG Scheller wiesen eine mögliche Interaktion des weitestgehend unerforschten Proteins hCIB2 mit dem IL-23R nach. Aus diesem Grund wurde die Rolle von hCIB2 im IL-23-Signalweg näher untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Interaktion von hCIB2 mit dem hIL-23R mittels Immunokopräzipitation nachgewiesen. Anschließend folgte die Analyse der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Deletionsvariante hIL-23R Δ 476. In einem letzten Schritt wurde mittels RT-PCR-Verfahren gezielt versucht, die Expression von hCIB2 in unterschiedlichen Zelllinien nachzuweisen.

3.4.2 hCIB2 interagiert mit dem hIL-23R

Im Folgenden wurde die Interaktion zwischen dem Protein hCIB2 und dem hIL-23R Wildtyp sowie der Deletionsvariante hIL-23R Δ 476 mittels Immunokopräzipitation untersucht. Im ersten Schritt wurden dafür CHO-K1-Zellen mit einem dreifach-FLAG-markierten hCIB2-Molekül (hCIB2-3xFLAG) sowie einem putativen Bindungspartner kotransfiziert und 48 Stunden später lysiert. Im nächsten Schritt wurde mittels eines FLAG-Antikörper-gekoppelten Affinitätsgels hCIB2 inklusive aller Interaktionspartner aus dem Lysat präzipitiert. Aus dem Präzipitat wurde dann mittels eines hIL-23R-Antikörpers auf die Interaktion zwischen hCIB2 und dem hIL-23R/hIL-23R Δ 476 geschlossen. Eine schematische Übersicht der Immunokopräzipitation sowie die Ergebnisse der Versuchsreihe sind der folgenden Abbildung 33 zu entnehmen.

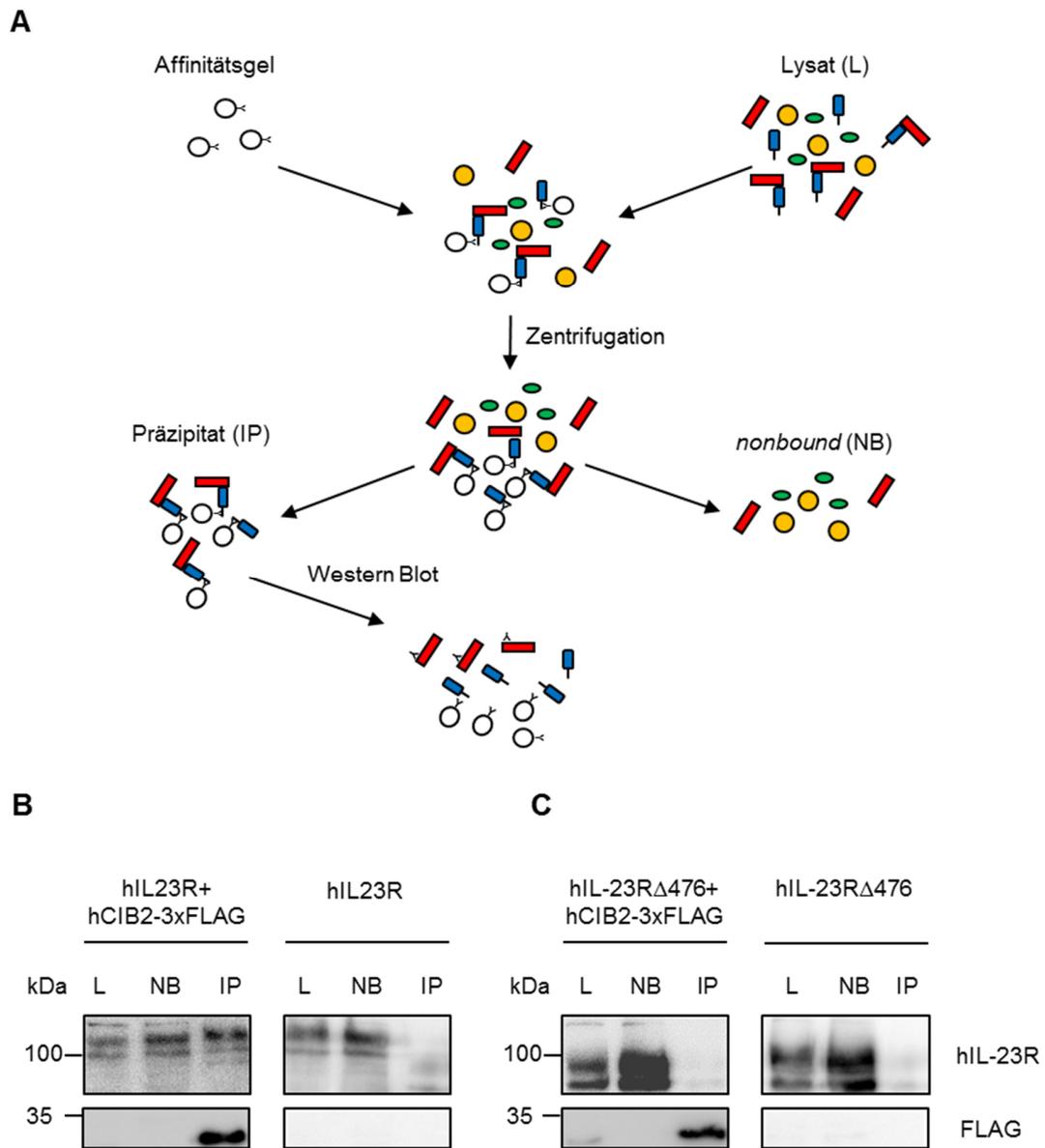


Abb. 33: Immunokopräzipitation von hCIB2-3xFlag sowie den putativen Interaktionspartnern hIL-23R und hIL-23R Δ 476 in transient-transfizierten CHO-K1-Zellen. (A) Prinzip der der FLAG-Immunokopräzipitation. Zellen, die mittels FLAG-markierter Proteine transfiziert wurden, wurden lysiert. Das Lysat (L) wurde mit einem FLAG-Antikörper-gebundenen Affinitätsgel versetzt und für 24 Stunden inkubiert. Der gemeinsame Ansatz wurde anschließend mehrmals mittels sterilem PBS gewaschen und herunterzentrifugiert. Die leichte Phase (*nonbound*, NB) wurde von der schweren Phase (Präzipitat, IP) getrennt und beide wurden mit *Lämmli*-Puffer versetzt. Das Präzipitat konnte nun in einem Western-Blot-Verfahren mittels spezifischer Antikörper hinsichtlich einer Kopräzipitation von möglichen Interaktionspartnern untersucht werden. Untersucht wurden CHO-K1-Zellen die mittels pcDNA_hCIB2-3xFLAG und p409_hIL-23R(E444K)-p310 Δ 476 (C) sowie mittels pcDNA_hCIB2-3xFLAG und p409_hIL-23R(E444K)-p310 (B) kotransfiziert wurden. Die Ergebnisse der Immunpräzipitation wurden mittels spezifischem FLAG- sowie hIL-23R-Antikörper visualisiert. Als Negativkontrollen dienten CHO-K1-Zellen, die lediglich den jeweiligen Rezeptor exprimierten. Abgebildet sind repräsentative Ergebnisse aus n=2 unabhängigen Ergebnissen. Als Größenstandard diente der Proteinmarker *PageRuler Prestained Protein Ladder*.

Aus Abbildung 33 geht hervor, dass alle Transfektionen erfolgreich waren, da in den Lysaten die jeweiligen erwarteten Proteine (hCIB2-3xFlag bei 21 kDa, hIL-23R bei 68 kDa, hIL-23R Δ 476 bei 50,2 kDa) visualisiert wurden. Die *nonbound* Ansätze der hCIB2-3xFLAG-transfizierten Zelllinien wiesen im Gegensatz zu den Präzipitaten kein hCIB2-3xFLAG auf, was auf den Erfolg der Präzipitation hinwies. Wichtig ist, dass im Präzipitat hIL-23R-hCIB2-3xFLAG-kotransfizierter Zellen, nicht jedoch im Präzipitat hIL-23R Δ 476-hCIB2-3xFLAG-kontransfizierter Zellen ein hIL-23R-Signal detektierbar war. Folglich fand eine Interaktion zwischen hCIB2-3xFLAG und dem Rezeptor-Wildtyp, nicht jedoch der Deletionsvariante statt. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die voraussichtliche Bindestelle auf dem deletierten Abschnitt des hIL-23R liegt.

3.4.3 Die Transkriptanalyse von hCIB2 in verschiedenen Zelllinien ist nicht möglich

Abschließend wurde mithilfe eines RT-PCR-Verfahren versucht, die Expression von hCIB2 in den humanen Zelllinien A549, U4C, HeLa, HEK293, in der von Hamstern stammenden Zelllinie CHO-K1 und in der von Affen stammenden Zelllinie COS7 nachzuweisen. Dafür wurden die Zellen zunächst mittels *NucleoSpin RNA II-Kits* lysiert. Anschließend wurde die mRNA extrahiert und mithilfe eines Oligo-dT-Primers in cDNA umgeschrieben. Ein PCR-Verfahren mit spezifischen hCIB2-Primern (DF483 und -484) folgte. Als Kontrolle wurde eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-PCR mittels der Primer DF97 und -98 (s. Tabelle 8) mit der synthetisierten cDNA durchgeführt. Als Negativkontrolle diente eine H₂O-Probe, als Positivkontrolle die Plasmid-DNA p409_hCIB2-3xFLAG.

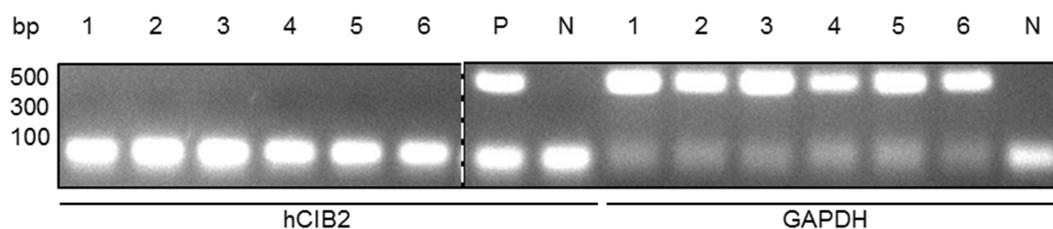


Abb. 34: Analyse der Expression von hCIB2 mittels RT-PCR in verschiedenen Zelllinien. RNA wurde mittels des *NucleoSpin RNA II-Kits* isoliert und mithilfe eines Oligo-dT-Primers in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde mit spezifischen Primern hinsichtlich der Expression von hCIB2 untersucht. Als Positivkontrolle wurde eine GAPDH-PCR durchgeführt. Zelllinien: 1=A549, 2=U4C, 3=HeLa, 4=CHO-K1, 5=HEK293, 6=COS7. „P“ bezeichnet das Plasmid p409_hCIB2-3xFLAG, welches als Positivkontrolle diente. Als Negativkontrolle (N) diente Wasser. Abgebildet sind repräsentative Ergebnisse aus n=2 unabhängigen Ergebnissen. Die Ergebnisse sind außerdem konsistent mit der nicht abgebildeten Analyse weiterer Zelllinien.

Wie aus Abbildung 34 ersichtlich, konnte kein Nachweis von hCIB2 *in vitro* mittels RT-PCR erzielt werden. Die positiven Ergebnisse der GAPDH-PCR zeigen, dass die verwendete cDNA intakt war. Der Nachweis von hCIB2 aus dem Plasmid p409_hCIB2-3xFlag zeigt auch, dass das Primer-Paar grundsätzlich in der Lage war, ein entsprechendes Transkript des hCIB2-Gens zu detektieren.

4 Diskussion

4.1 In IL-23R-gp130-Chimären erfolgt eine Suppression der STAT3-Aktivierung

IL-6 übernimmt im Körper zahlreiche pro-, aber auch antiinflammatorische Funktionen (s. Tabelle 2). Mithilfe des alpha-Rezeptors IL-6R und des β -Rezeptors gp130 bildet es tetramere oder hexamere Komplexe aus (33, 34). Anschließend kommt es zur *Transphosphorylierung* von JAK1, JAK2 sowie TYK2 und konsekutiv zur Aktivierung von STAT3 und in geringerem Ausmaß STAT1 (42). Infolge dessen werden STAT3-responsive Gene exprimiert, darunter *Socs3* (1). Das Protein SOCS3 bildet mit JAK2 und gp130 einen trimeren Komplex, der zur Ubiquitinierung von JAK2 und gp130 führt (92, 95). SOCS3 ist über eine Kinase-inhibierende Region weiterhin in der Lage, Glycin-Glutamin-Methionin (GQM)-Motive von JAK2 zu binden und konsekutiv direkt inhibitorisch zu wirken (89). SOCS3 ist mutmaßlich über ähnliche Mechanismen in der Lage, weitere JAKs (JAK1, TYK2) zu inhibieren (95). Die spezifische SOCS3-Bindestelle am intrazellulären Abschnitt von murinem gp130 liegt in einem Valin-Glutamat-Tyrosin-Serin-Threonin-Valin-Valin-Histidin (VEYSTVVH)-Motiv um das Tyrosinmolekül an der Stelle 757 (67). In humanem gp130 liegt das Bindemotiv um das Tyrosinmolekül an der Stelle 759 und enthält die Aminosäure Glutamin statt Glutamat (VQYSTVVH) (31, 67).

Das p19/p40-heterodimere Zytokin IL-23 ist im Körper an zahlreichen proinflammatorischen Prozessen beteiligt und insbesondere aufgrund seiner zentralen Rolle in der TH17-Bildung in den wissenschaftlichen Fokus gerückt (114). IL-23 bindet an einen Rezeptorkomplex aus IL-12R β 1 und IL-23R, woraufhin über eine JAK2- und TYK2-*Transphosphorylierung* STAT1/4/5 und vor allem STAT3 aktiviert werden (114, 122). Konsekutiv werden STAT3-responsive Gene exprimiert, darunter *Socs3* (47). Bislang wurde kein SOCS3-Bindemotiv am IL-23R beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war es, eine SOCS3-Supprimierbarkeit im IL-23-Signalweg über die Insertion des SOCS3-Bindemotivs zu induzieren. Franz Christian Horstmeier konnte im Rahmen seiner bislang unveröffentlichten Dissertation am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II der Heinrich-Heine-Universität durch alleinige Insertion des VQYSTVVH-Motivs in den hIL-23R keine SOCS3-Suppression erreichen. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei humane Fusionsproteine aus dem hL-23R und gp130 hergestellt, um eine SOCS3-Supprimierbarkeit des IL-23-Signalweges zu induzieren.

Die pSTAT3-Assays aus Abbildung 4 belegen, dass nach HIL-23-Stimulation von hIL-23R-Komplex-exprimierenden Ba/F3-gp130-Zellen, im Gegensatz zur Stimulation mit HIL-6, keine inverse Korrelation zwischen pSTAT3- und SOCS3-Signal zu beobachten ist. Diese Beobachtung deckt sich mit vorhergehenden Arbeiten in der AG Scheller (47, 196). Nach HIL-23-Simulation resultiert eine starke, langandauernde STAT3-Aktivierung, welche die proinflammatorischen Funktionen von IL-23 erklären könnte (47, 196). Ein regulativer Einfluss von SOCS3 im HIL-23-Signalweg *in vitro* erscheint auf Grundlage dieser Ergebnisse eher unwahrscheinlich.

Hingegen wurde 2006 in murinen CD4⁺ T-Zellen demonstriert, dass ein *Socs3-knock-out* zu einer deutlichen Verstärkung der STAT3-Aktivierung nach IL-23-Stimulation führt (163). Außerdem konnte in *in vitro* polarisierten TH17-Zellen nach HIL-23-Stimulation mittels Chromatin-Immunokopräzipitation eine verstärkte Bindung von pSTAT3 an die IL-17A- und die IL-7F-Promoterregion demonstriert werden, woraus auf einen regulativen Einfluss von SOCS3 auf den IL-23-Signalweg im Rahmen der TH17-Polarisierung geschlossen werden kann (163). 2018 konnten Chen *et al.* weiterhin in einem murinen IL-23 abhängigen Modell der ankylosierenden Spondyloarthritis Hinweise auf eine mögliche, protektive Rolle von SOCS3 in murinen IL-23 abhängigen Krankheiten beobachten. Mittels *mini circle DNA* wurde IL-23 in SOCS3-*knock-down*- und Wildtyp-Mäusen überexprimiert. Western-Blot-Analysen zeigten anschließend eine erhöhte STAT3-vermittelte Aktivierung von *smad mothers against decapentaplegic 1/5/9* (SMAD 1/5/9) in Osteoblasten der *knock-down*-Mäuse, die mit einem schwereren Krankheitsverlauf korrelierte (203). Diese Ergebnisse sprechen für eine Rolle von SOCS3 in der IL-23-vermittelten Signaltransduktion *in vivo*.

Verschiedenartige, konzentrationsabhängige Mechanismen der SOCS3-vermittelten pSTAT3-Suppression könnten diesen scheinbaren Widerspruch erklären. 2014 haben Kershaw *et al.* postuliert, dass bei niedrigen SOCS3-Konzentrationen ein tertiärer SOCS3-JAK-gp130-Komplex pSTAT3-suppressiv wirkt, während bei höheren SOCS3-Konzentrationen ein dimerer SOCS3-JAK-Komplex für eine pSTAT3-Suppression ausreichen könnte (92). Eine Hypothese wäre, dass die pSTAT3-suppressiven Effekte in den Arbeiten von Chen *et al.* auf hohe SOCS3-Konzentrationen und einen dimeren SOCS3-JAK-Komplex zurückzuführen waren, während in Ba/F3-gp130-Zellen nicht ausreichend SOCS3 exprimiert wurde, so dass dort lediglich der trimere SOCS3-JAK-gp130-Komplex nach HIL-6-Stimulation pSTAT3-suppressiv wirkte.

Eine methodologische Erklärung für die Diskrepanz der SOCS3-vermittelten pSTAT3-Suppression im IL-23-Signalweg wäre, dass die in den Arbeiten von Chen *et al.* verwendeten

primären Zellen durch genetisches *imprinting* über andere intrazelluläre Signalwege verfügen, als die in dieser Arbeit verwendeten Ba/F3-gp130-Zellen. So konnte bereits der Einfluss von genetischem *imprinting* auf den JAK-STAT3-Signalweg am Einfluss der DNA-Methyltransferase 1 (DMT1) auf die STAT3-Aktivierung *in vivo* demonstriert werden (204). Weiterhin sollte erwähnt werden, dass in dieser und den vorhergehenden Arbeiten der AG Scheller IL-23R-Überexpressionsmodelle verwendet wurden, weswegen die gesammelten Erkenntnisse nur bedingt auf *in vivo* Modelle übertragen werden können (47).

Ein letzter erwähnenswerter Aspekt ist, dass im IL-23-Signalweg grundsätzlich ein anderer, langsamerer, SOCS3 abhängiger *feedback*-Mechanismus vorliegen könnte. So konnte Sofie Beier 2017 in Ihrer Masterarbeit zeigen, dass die pSTAT3-Aktivität 12-24 Stunden nach hIL-23-Stimulation absinkt (198). Dies könnte an einem späteren, negativen *feedback loop* liegen, der in dieser Arbeit nicht näher untersucht wurde, aber beispielsweise mit einer verspäteten, KIR-dominierten JAK-Inhibition ohne Rezeptorbindung vereinbar wäre (s. oben).

Zwei hIL-23R-gp130 Rezeptorchimären wurden in dieser Arbeit hergestellt, namentlich hIL-23R-gp130 und hIL-23R-gp130_N642-S765 (s. Abschnitt 3.1.2 und 3.1.5). Erstere Rezeptorchimäre besteht aus dem extrazellulären und transmembranären Abschnitt des hIL-23R sowie der intrazellulären Domäne von humanem gp130. In letzterer Rezeptorvariante wurden lediglich die membrannahen, intrazellulären 106 Aminosäuren des hIL-23R durch die Aminosäuren 642-765 des humanen gp130 ersetzt. Ba/F3-gp130-Zellen wurden stabil mit beiden Rezeptorchimären transduziert und mittels Durchflusszytometrie wurde nachgewiesen, dass beide Rezeptorchimären an der Zelloberfläche exprimiert und nicht in intrazellulären Kompartimenten retiniert werden (s. Abb. 11 und 19).

Der Rezeptorkomplex aus hIL-23R-gp130 und hIL-12R β 1 zeigte in Zellviabilitätsassays eine hIL-23 abhängige Zellviabilitätserhöhung ähnlich dem Wildtyp Rezeptorkomplex (s. Abb. 12). Das *background* Signal zeigte sich in Ba/F3-gp130_hIL-12R β 1_hIL-23R-gp130 jedoch leicht erhöht, was auf einen Zytokin-unabhängigen, proliferativen Status hinweist. Dies könnte darin begründet sein, dass die Zelllinie zu dicht kultiviert wurde oder dass nach der retroviralen Transduktion eine vorübergehend erhöhte Teilungsbereitschaft bestand. Auch eine partielle konstitutive Aktivität über heterodimere Rezeptorkomplexe wäre als Erklärung nicht ausgeschlossen (205). Nichtsdestotrotz erzielte der Komplex aus den intrazellulären Domänen des hIL-12R β 1 und gp130 nach hIL-23-Stimulation eindeutig einen proliferativen Reiz auf Ba/F3-gp130-Zellen. Dies bestätigt vorangegangene Untersuchung des murinen Rezeptorpendants von Floss *et al.* aus dem

Jahr 2017, die mit derselben murinen Zelllinie auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnten (s. Abb. 12) (187).

Der Komplex aus IL-12R β 1 und gp130 gilt als möglicher Signaltransduktor für das postulierte Heterodimer p28/p40, welches auch als IL-Y bezeichnet wird (187). IL-Y ist von wissenschaftlichem Interesse, als dass ihm antiinflammatorische Effekte im *experimental-autoimmune-uveitis*-Modell und eine antidiabetogene Wirkung im murinen Prädiabetes-Modell nachgewiesen wurden (206, 207). Eine schematische Darstellung der Signaltransduktion von IL-Y verglichen mit der Rezeptorvariante IL-23R-gp130 ist der Abbildung 35 zu entnehmen.

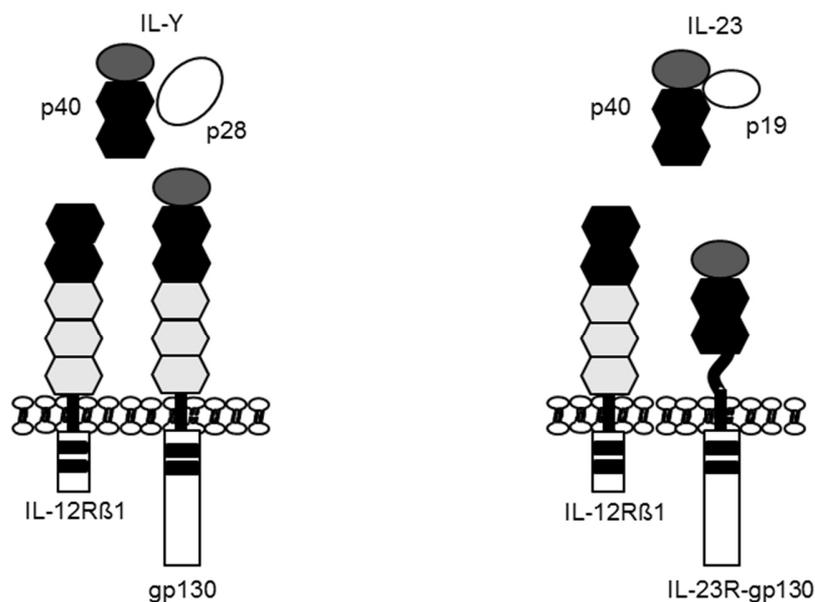


Abb. 35: Vergleich des postulierten IL-Y Rezeptorkomplexes mit dem Komplex aus IL12R β 1 und IL-23R-gp130. Nach Floss *et al.* 2017 (187). Dunkelgrau dargestellt sind Immunglobulin-ähnliche Domänen. Zytokinbindende Domänen sind schwarz dargestellt, wobei die typischen Cystein-Motive und WSXWX-Motive nicht hervorgehoben wurden. Hellgrau dargestellt sind Fibronectin-Typ-III-Domänen. Die intrazellulären Motive BOX1 und BOX2 sind als schwarze Linien hervorgehoben. Intrazelluläre Domänen sind weiß dargestellt.

Auch die HIL-23-Stimulation von Ba/F3-gp130_hIL12R β 1_hIL-23R-gp130_N642-S765-Zellen führte zu einem Viabilitätsanstieg, vergleichbar mit dem Wildtyp Rezeptorkomplex (s. Abb. 20). Die Rezeptorchimäre hIL-23R-gp130_N642-S765 ist somit ebenfalls funktionell aktiv und bildet einen unbeschriebenen Signaltransduktionskomplex mit dem hIL-12R β 1 aus.

Ba/F3-gp130-Zellen, die den hIL-23R-gp130 oder den hIL-23R-gp130_N642-S765, nicht jedoch den hIL-12R β 1 exprimieren, zeigten eine, mit hIL-23R-monotransfizierten Zellen vergleichbare, partielle HIL-23-Responsivität (s. Abb. 12 und 20). Diese Ergebnisse sind kongruent zu vorherigen

Arbeiten der AG Scheller und suggerieren, dass HIL-23 in der Lage ist, hIL-23R- aber auch hIL-23R-gp130- und hIL-23R-gp130_N642-S765-Homodimere zu rekrutieren (196).

Ba/F3-gp130_hIL-12R β 1_hIL-23R-gp130-Zellen zeigten nach HIL-23-Stimulation ein pSTAT3-Signal, das nach 60 Minuten invers korrelierend mit dem SOCS3-Signal abfiel (s. Abb. 13). Die pSTAT3-Kinetik ähnelte dabei der HIL-6-Stimulation, wenn der pSTAT3-Abfall auch etwas schwächer und verzögert imponierte. Auch die Ba/F3-gp130-Zelllinie, welche den murinen Rezeptorkomplex exprimiert, zeigte ähnliche Effekte (s. Abb. 13) Dabei trat die inverse Korrelation zwischen pSTAT3- und SOCS3-Signal nach circa 180 Minuten, also deutlich später auf. Die HIL-23-Stimulation der Zelllinie Ba/F3-gp130_hIL-12R β 1_hIL-23R-gp130_N642-S765 führte ebenfalls zu einer pSTAT3 abhängigen Signaltransduktion mit einem Abfall des pSTAT3-Signals nach 120-180 Minuten (s. Abb. 21).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Varianten hIL-23R-gp130, mL-23R-gp130 und hIL-23R-gp130_N642-S765 nach HIL-23-Stimulation eine SOCS3-vermittelte pSTAT3-Suppression aufweisen. Die beobachteten Effekte unterscheiden sich untereinander und auch von der HIL-6-vermittelten pSTAT3-Suppression quantitativ sowie zeitlich. Stark und früh ausgeprägt ist die pSTAT3-Suppression nach HIL-6-Stimulation. Etwas schwächer ausgeprägt ist sie nach HIL-23-Stimulation der Variante hIL-23R-gp130, zusätzlich deutlich verzögert bei der Variante mL-23R-gp130. Bei der Variante hIL-23R-gp130_N642-S765 ist die HIL-23-induzierte pSTAT3-Suppression sowohl schwach ausgeprägt, als auch zeitlich verzögert.

Die beobachteten Unterschiede des pSTAT3-Abfalls nach HIL-23-Stimulation verglichen mit dem pSTAT3-Abfall nach HIL-6-Stimulation, können durch verschiedene Hypothesen erklärt werden. Ein Ansatz wäre, dass im HIL-23/IL-12R β 1/IL-23R-gp130-Komplex im Gegensatz zum HIL-6/gp130/gp130-Komplex nur ein und nicht zwei Rezeptoren von SOCS3 supprimiert werden, da keine Interaktion zwischen SOCS3 und dem IL-12R β 1 bekannt ist. Dies würde eine schwächere SOCS3-Responsivität des ersteren Komplexes erklären. Weiterhin könnte auch die extrazelluläre Konfiguration der Rezeptorchimären dafür verantwortlich sein, dass die beobachtete pSTAT3-Suppression schwächer ausfällt als beim gp130-Wildtyp. So wurde der Einfluss der extrazellulären Domäne auf intrazelluläre Signalwege bereits an anderen Zytokinrezeptoren beobachtet. 2017 haben Floss *et al.* am Beispiel der IL-39-Signaltransduktion demonstriert, dass chimäre Rezeptorkomplexe in ihrer intrazellulären Signaltransduktion von dem Aufbau der extrazellulären Domäne abhängen. So zeigte sich der IL-23-induzierte IL-39-Signalweg mit gleicher STAT3-, aber unterschiedlicher STAT1-Aktivierung, verglichen mit dem IL-12-induzierten IL-39-

Signalweg(187). Auch am Erythropoetin Rezeptor konnte der Einfluss der extrazellulären Domäne auf den JAK/STAT-Signalweg gezeigt werden (208). Eine mögliche Begründung für die Relevanz der extrazellulären Domäne für die intrazelluläre Signaltransduktion ist ihr Einfluss auf die Stabilität des Signaltransduktionskomplexes (209). Die veränderte Transmembrandomäne könnte ebenfalls für die beobachteten Unterschiede der pSTAT3-Kinetik von gp130 und der Chimären IL-23R-gp130 sowie hIL-23R-gp130_N642-S765 verantwortlich sein. So konnte beispielsweise am Thrombopetin Rezeptor die Relevanz der Transmembrandomäne für die räumliche Orientierung und damit die Aktivierbarkeit des Rezeptors demonstriert werden (210).

Dass die hIL-23-vermittelte pSTAT3-Suppression der Rezeptorvariante hIL-23R-gp130_N642-S765 schwächer und langsamer ausfällt als bei der Variante hIL-23R-gp130, könnte darauf hinweisen, dass Ausmaß und Geschwindigkeit der pSTAT3-Suppression von der Größe des eingesetzten gp130-Abschnitts abhängen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass zusätzliche Aminosäuremotive des gp130 die Funktion von SOCS3 modulieren. Vergleichbare Entdeckungen wurden beispielsweise hinsichtlich der Interaktion von JAK1 mit gp130 gemacht. So ist mit dem Tryptophanmolekül an der Stelle 652 ein Motiv bekannt, dass für die JAK1-Aktivierung grundlegend ist, ohne dabei die Bindung zu beeinflussen (61). Dennoch müssen graduelle Unterschiede hinsichtlich einer pSTAT3-Suppression kritisch vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass verschiedenste Faktoren, darunter Alter und die aktuelle Zellzyklusphase untersuchter Zelllinien, Einfluss auf intrazelluläre Signalwege nehmen könnten. Folglich könnten die beobachteten, kleineren Unterschiede inzidentell bedingt sein.

Die SOCS3-Bindestelle an gp130 dient ebenfalls als Bindestelle für SHP2 (64, 211). SHP2 wirkt über eine Aktivierung des MEK/ERK sowie des PI3K/AKT-Signalweges mitogen (211, 212). Durch diesen Mechanismus kann SOCS3 möglicherweise ebenfalls als kompetitiver Inhibitor des MEK/ERK1/2- sowie des PI3K/AKT-Signalweges wirken (94, 211). Daher erscheint die Analyse dieser Signalwege mithilfe der Rezeptorvarianten hIL-23R-gp130 und hIL-23R-gp130_N642-S765 sinnvoll.

In Zukunft wäre die Nutzung der Chimäre IL-23R-gp130 in murinen Modellen zwecks Evaluation der Wirkung von IL-Y, aber auch der SOCS3-Supprimierbarkeit im IL-23-Signalweg, möglich. Erschwert würde dies allerdings dadurch, dass die Zytokine der IL-6/12-Familie über ein hohes Interaktionspotential verfügen (s. Abschnitt 1.2.1 und 1.4.1), wodurch spezifische Analysen *in vivo* deutlich erschwert werden. Synthetische Zytokinrezeptoren, die auf artifizielle, körperfremde Liganden reagieren, könnten eine spezifischere Möglichkeit in der Erforschung eines möglichen

IL-12R β 1/gp130 Rezeptorkomplexes darstellen und diese Schwachstelle von Rezeptorchimären *in vivo* umgehen (196).

Zusammengefasst ergänzt die funktionelle Aktivität von IL-23R-gp130 Rezeptorchimären den seit über 20 Jahren bestehenden Ansatz, Zytokinsysteme mittels Rezeptorchimären zu untersuchen. Bereits 1997 haben Zou *et al.* anhand von chimären Proteinen bestehend aus der extrazellulären Domäne des EGFR und der Transmembrandomäne sowie intrazellulären Domäne des IL-12R β 1-Komplexes gezeigt, dass Stimulation mit EGFR eine typische IL-12-Signalkaskade auslöst (213). Wie oben dargestellt haben Floss *et al.* 2017 die Funktionsfähigkeit multipler Rezeptorchimären der IL-6/12-Familie untersucht und dabei bestätigt, dass IL-6/12 Rezeptoren aus einzelnen funktionellen Modulen bestehen, die untereinander kombiniert werden können (187). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten unterstützen die Erkenntnisse über den modularen Charakter der IL-6R-IL-12R-Familie, in der keine Konformationsänderung, sondern die räumliche Positionierung und spezifische Aminosäuremotive die Signaltransduktion vermitteln.

Mit dem Ziel, einen möglichst effektiven SOCS3-Schalter an den IL-23R zu konstruieren, sollten in Zukunft neuartige Fusionsproteine aus dem hIL-23R und kleineren Anteilen von gp130 hergestellt werden. Bei der Konstruktion einer SOCS3-responsiven hIL-23R-Variante sollte ein Fokus auf die Orientierung der intrazellulären Domäne gelegt werden: So konnte an gp130 bereits gezeigt werden, dass die juxtramembranöse Addition von Alaninmolekülen über eine Rotation von circa 110° pro Alaninmolekül die pSTAT3-Aktivität modulieren kann (214). Die Rotation des Rezeptors könnte folglich für die SOCS3-Wirkung von Relevanz sein und erklären, weshalb die alleinige Insertion eines SOCS3-Bindemotivs bis jetzt nicht erfolgreich zu einer SOCS3-Supprimierbarkeit im hIL-23R geführt hat. Ein weiterer relevanter Aspekt der Konstruktion einer SOCS3-responsiven hIL-23R-Variante sollte sein, dass die exakte räumliche Beziehung von gp130, JAKs und SOCS3 von großer Relevanz für die SOCS3-Wirkung sein könnte (92, 95). Während gp130 mit dem BOX1-Motiv über eine definierte, membranernahe Bindestelle für JAK1 verfügt, ist die JAK2-Bindung wahrscheinlich über ein SH2-Adaptermolekül vermittelt (59, 60, 215). Am IL-23R hingegen existiert ein membranfernes und atypisches JAK2-Bindemotiv (136). Folglich ist denkbar, dass die unterschiedlichen räumlichen Positionen verschiedener JAKs Einfluss auf die SOCS3-Wirkung haben.

Letztlich könnten *in vivo* Untersuchungen einer Wildtyp-ähnlichen IL-23R-Version mit SOCS3-Schalter in Zukunft zahlreiche neue Erkenntnisse bieten. Einem Modell der TH17-Differenzierung zufolge induziert IL-6 gemeinsam mit TGF β in TH-Vorläuferzellen IL-21, welches sich selbst in

einem autokrinen *loop*, aber auch die IL-23R-Expression induziert (216, 217). IL-23 stabilisiert anschließend einen speziellen, pathologischen TH17-Zelltypen, der statt dem antiinflammatorischen IL-10 das proinflammatorische IFN- γ produziert (159). Es ergibt sich die Frage, weswegen IL-6, IL-23 und IL-10 trotz gemeinsamer Nutzung von pSTAT3 abhängigen Signalwegen *in vivo* so unterschiedliche Funktionen erfüllen. Unterschiede hinsichtlich einer SOCS3-Suppression wären ein möglicher Erklärungsansatz und könnten mittels einer SOCS3-supprimierbaren IL-23R-Variante näher untersucht werden. Eine Arbeitshypothese könnte zum Beispiel sein, dass die überwiegend pathologischen Effekte von IL-23 auf die fehlende, schnelle, SOCS3-vermittelte pSTAT3-Suppression zurückzuführen ist.

4.2 hIL-23R-mCherry ist funktionell aktiv

mCherry ist ein rot-fluoreszierendes (587 nm Exzitation, 610 nm Emission), monomeres Protein, das 2004 erstmals von Shaner *et al.* hergestellt wurde und von einem Protein der Pilzanemone (*Discosoma sp.*) abgeleitet ist (197). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde untersucht, ob die Addition von mCherry an den intrazellulären C-Terminus des hIL-23R einen Einfluss auf die IL-23-Signaltransduktion hat.

In Zellviabilitätsassays zeigte der Komplex aus hIL-23R-mCherry und hIL-12R β 1 eine mit dem Wildtyp Rezeptorkomplex vergleichbare HIL-23-induzierte Proliferation (s. Abb. 24). Auch hIL-23R-mCherry-monotransfizierte Zellen zeigten eine vergleichbare HIL-23-Responsivität wie hIL-23R-monotransfizierte Zellen. Die HIL-23-Stimulation hIL-12R β 1/hIL-23R-mCherry-exprimierender Ba/F3-gp130-Zellen führte darüber hinaus in ähnlichem Ausmaß wie die Stimulation Wildtyp Rezeptorkomplex-exprimierender Ba/F3-gp130-Zellen zu einer pSTAT3-Signaltransduktion (Abb. 26).

Es ist ersichtlich, dass die intrazelluläre Addition von mCherry weder die über hIL-23R/hIL-12R β 1-Heterodimere, noch die über hIL-23R-Homodimere vermittelte Signaltransduktion negativ beeinflusst. Toxische Effekte, die bei fluoreszierenden Proteinen aufgrund der Licht-induzierten Bildung von freien Radikalen auftreten können, wurden nicht beobachtet (218).

In konzentrationsabhängigen Proliferationsassays wurde der Einfluss unterschiedlicher HIL-23-Konzentrationen auf die Zellviabilität hIL-12R β 1/hIL-23R-mCherry-exprimierender Ba/F3-gp130-Zellen mit der Wildtyp Rezeptorkomplex-vermittelten Zellviabilität verglichen (s. Abb. 25). Dabei wurde nach Aktivierung beider Rezeptorkomplexe mit unphysiologisch hohen HIL-23-Konzentrationen ein vergleichbarer Rückgang der Zellviabilität gemessen. Die intrazelluläre Addition von mCherry hatte folglich keine Auswirkungen auf die beobachtete konzentrationsabhängige Toxizität des humanen IL-23-Signalweges.

Das toxische Verhalten hoher HIL-23-Konzentrationen ist bereits aus vorangegangenen Arbeiten der AG Scheller bekannt: Sofie Beier konnte in ihrer Masterarbeit zeigen, dass ab einer Konzentration von circa 10 ng/ml HIL-23 die Viabilität von Ba/F3-gp130_hIL-12R β 1_hIL-23R-Zellen massiv sank (198). Mittels *live cell imaging* konnte sie zudem nachweisen, dass die toxische Wirkung mit der Ausbildung von kugelähnlichen, zellulären Verbänden einhergeht und resistent gegenüber dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh war, was für einen Caspase-unabhängigen zytotoxischen Mechanismus spricht.

4.3 Die Deletionsvariante hIL-23R Δ 476 ist funktionell inaktiv

Der Rezeptorkomplex aus dem mIL-12R β 1 und der Rezeptorchimäre mIL-23R-hIL-23R Δ 476, bestehend aus dem extrazellulären Teil des murinen IL-23R und dem transmembranären sowie an der Aminosäure 476 deletierten intrazellulären Teil des humanen IL-23R, vermittelt nach HIL-23-Stimulation eine Zellviabilitätserhöhung (47). Diese Rezeptorchimäre verfügt über keine pSTAT3-Bindemotive, dafür jedoch über ein SHP2 bindendes YEDI-Motiv an der Stelle 397, weswegen 2013 von Floss *et al.* auf ein pSTAT3-unabhängiges, MEK/ERK1/2 und PI3K/AKT-vermitteltes Wachstum geschlossen wurde (47). Diese Hypothese wird weiterhin dadurch verstärkt, dass die Mutation des YEDI-Motivs zu einem Abbruch der HIL-23-induzierten Viabilitätserhöhung führt und ähnliche Beobachtungen in einem rein murinen Rezeptorkomplex bestätigt wurden (47). Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde der nicht chimäre Rezeptorkomplex aus hIL-23R Δ 476 und hIL-12R β 1 hergestellt und auf seine HIL-23 abhängige Proliferation untersucht, mit dem Ziel, eine HIL-23-induzierte Viabilitätserhöhung zu demonstrieren.

Die HIL-23-Stimulation hIL-23R Δ 476-exprimierender Ba/F3-gp130-Zellen führte zu keiner Zellviabilitätserhöhung (s. Abb. 32). Dies deutet daraufhin, dass das von Floss *et al.* 2013 beobachtete pSTAT3-unabhängige Wachstum lediglich in einem chimären, nicht jedoch in einem humanen IL-23R Δ 476-Rezeptorkomplex auftritt (47).

Eine mögliche Erklärung könnte in einem grundsätzlich unterschiedlichen Verhalten chimärer Rezeptorkomplexe verglichen mit nicht-chimären Rezeptorkomplexen liegen. So zeigten human-murine Rezeptorkomplexe generell eine abgeschwächte HIL-23-induzierte Viabilität verglichen mit dem murinen Wildtyp Rezeptorkomplex (47). Weiterhin wurde der Einfluss der extrazellulären Domänen auf die Stabilität des Signaltransduktionskomplexes und damit die intrazelluläre Signaltransduktion bereits in Abschnitt 4.1 thematisiert und könnte auch hier als mögliche Erklärung dienen (10). Eine alternative Erklärung könnte sein, dass die Deletion der intrazellulären Domäne den hIL-23R sensibler für die in Franz Christian Horstmeiers Dissertation (bislang unveröffentlicht) sowie in Sofie Beier Masterarbeit diskutierte toxische Wirkung hoher HIL-23-Konzentrationen macht, sodass möglicherweise bei geringerer HIL-23-Konzentration eine Proliferation stattfinden könnte (198).

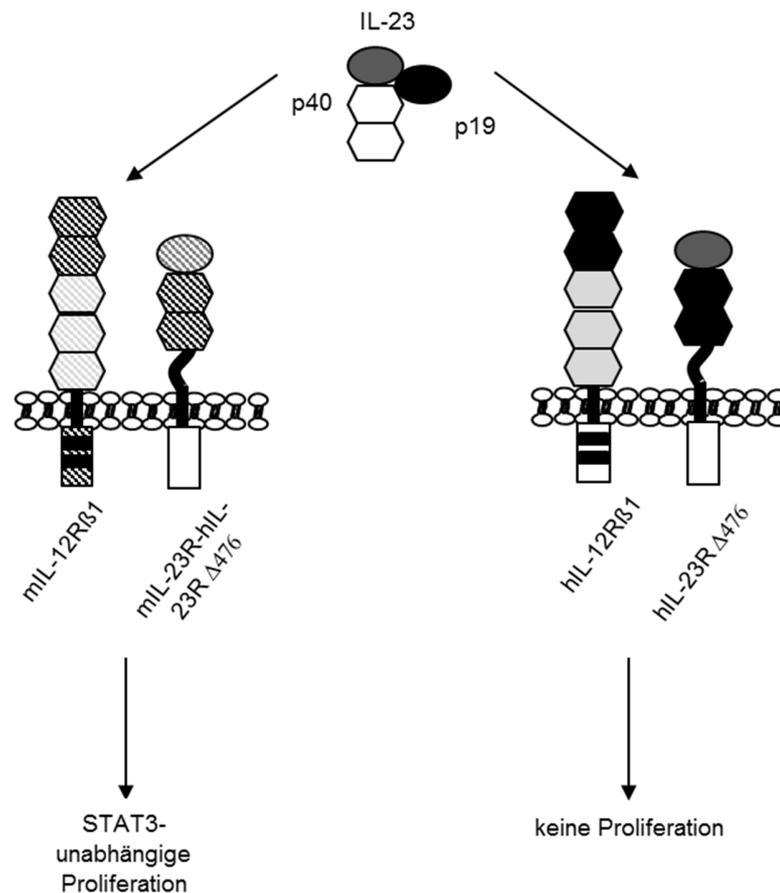


Abb. 36: Vergleich zwischen dem chimären Rezeptorkomplex und dem hIL-12Rβ1/hIL-23RΔ476-Komplex. Nach Floss *et al.* 2013 (47). Der Rezeptorkomplex aus mIL-12Rβ1 und der chimären Deletionsvariante mIL-23R-hIL-23RΔ476 führt wahrscheinlich über MEK/ERK und PI3K/AKT zur Proliferation von Ba/F3_gp130-Zellen. Der in dieser Arbeit hergestellte Komplex aus hIL-12Rβ1 und hIL-23RΔ476 hingegen zeigt kein proliferatives Verhalten nach HIL-23-Stimulation. Dunkelgrau dargestellt sind Immunglobulin-ähnliche Domänen. Zytokinbindende Domänen sind schwarz dargestellt, wobei die typischen Cystein-Motive und WSXWX-Motive nicht hervorgehoben wurden. Hellgrau dargestellt sind Fibronectin-Typ-III-Domänen. Die intrazellulären Motive BOX1 und BOX2 sind als schwarze Linien hervorgehoben. Intrazelluläre Domänen sind weiß dargestellt. Murine Rezeptorbestandteile sind schraffiert dargestellt.

Aus Abbildung 36 ist eine strukturelle Übersicht des chimären Rezeptorkomplexes und dem Rezeptorkomplex aus dieser Doktorarbeit mitsamt des beobachteten Unterschieds ersichtlich.

Aus den vorliegenden Ergebnissen und der Arbeit von Floss *et al.* aus dem Jahr 2013 kann hypothetisch geschlossen werden, dass zwei verschiedene Faktoren für die damals beobachtete HIL-23-induzierte Zellviabilitätserhöhung verantwortlich sind. Ein wichtiger Faktor scheint eindeutig das YEDI-Motiv ab der Aminosäure 397 (human, murin 416) des IL-23R zu sein. Der zweite Faktor scheint der murine, nicht jedoch humane IL-12Rβ1 zu sein. Gemeinsam scheinen diese Faktoren für eine Zellviabilitätserhöhung verantwortlich zu sein, wobei möglicherweise MEK/ERK1/2-, PI3K/AKT- oder andere Signalwege eine Rolle spielen (47, 139). Eine Erklärung

dafür, dass mutmaßlich der murine, nicht jedoch der humane IL-12R β 1 eine pSTAT3-unabhängige Proliferation von IL-23R Δ 476-Varianten vermittelt, könnte in dem Umstand liegen, dass der murine IL-12R β 1 im Gegensatz zu seinem humanen Pendant über ein einzelnes Tyrosin-Motiv ohne STAT3 bindende Eigenschaften an der Stelle 635 verfügt (114, 137, 138). Jenes Motiv könnte für die Aktivierung von MEK/ERK1/2 und PI3K/AKT notwendig sein. Zur Vervollständigung des Verständnisses der Deletionsvariante hIL-23R Δ 476 sollte zukünftig in jedem Falle die Aktivierung dieser Signalwege, beispielsweise mittels Western Blot überprüft werden.

4.4 hCIB2 interagiert mit dem IL-23R

hCIB2 ist ein 21 kDa großes, Ca^{2+} - und Mg^{2+} bindendes Protein, das aus 4 EF-Domänen besteht (199, 219). In seiner bislang unveröffentlichten Dissertation konnte Franz Christian Horstmeier zeigen, dass hCIB2 an den hIL-23R bindet. Außerdem konnte er in HIL-23-Stimulationsassays darstellen, dass die hCIB2-Koexpression in IL-23 Rezeptorkomplex-exprimierenden Zellen zu einem verminderten pSTAT3-Signal führt. Beide Ergebnisse deuten einen Einfluss von hCIB2 auf den IL-23-Signalweg an.

Zahlreiche Signalwege werden durch hCIB2 moduliert. So ist bekannt, dass hCIB2 die Integrin-Untereinheiten $\alpha 7\beta$ sowie $\alpha 2\beta$ bindet und dadurch den Integrin-Signalweg moduliert (199). hCIB2 ist außerdem über eine Interaktion mit Ankyrin und den *transmembrane channel like proteins 1/2* (TMC1/2) essentiell für die Mechanotransduktion des Innenohrs (220–222). In Ovarialkarzinomzellen wurde zudem beschrieben, dass hCIB2 den Transport der Sphingosin-Kinase 1 (SK1) zur Zellmembran hemmt und so regulativen Einfluss auf zahlreiche onkogene Signalkaskaden, darunter wahrscheinlich den TNF- α -Signalweg, nimmt (200, 201). Über die Funktion von hCIB2 in Signalwegen der IL-6/IL-12-Großfamilie ist bis heute keine umfassende Arbeit veröffentlicht worden, sodass die Relevanz und Funktion von hCIB2 im IL-23-Signalweg unklar bleiben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindung zwischen dem hIL-23R und hCIB2 mithilfe von Immunokopräzipitationsanalysen näher untersucht. Dabei wurde neben dem hIL-23R-Wildtyp die bereits oben beschriebene humane Deletionsvariante hIL-23R Δ 476 verwendet. Die in Abbildung 33 dargestellte Koimmunopräzipitation von hCIB2 und dem hIL-23R zeigt, dass eine sterische Interaktion zwischen dem hIL-23R und hCIB2 besteht. Im Gegensatz dazu wurde keine Interaktion von hCIB2 und hIL-23R Δ 476 nachgewiesen. Daraufhin kann angenommen werden, dass für die Interaktion mit hCIB2 der intrazelluläre Abschnitt zwischen den Aminosäuren 477 und 629 des hIL-23R grundlegend ist.

Wenn auch bis heute kein konserviertes hCIB2-Bindemotiv charakterisiert wurde, ist die Interaktion von hCIB2 mit der Kinase SK1 näher beschrieben worden (201). So konnte gezeigt werden, dass das Motiv um die Aminosäuren Phenylalanin und Leucin an den Stellen 198 und 199 von SK1 für die hCIB2-Bindung essentiell ist (201). Der intrazelluläre Abschnitt des hIL-23R hingegen enthält zwei Phenylalanin-Leucin-Motive an den Stellen 541 und 595. Bei der Bewertung

der vorliegenden Daten kann die Hypothese in Betracht gezogen werden, dass eines oder beide Phenylalanin-Leucin-Motive des hIL-23R an der hCIB2-Interaktion beteiligt sein könnten.

Methodologisch sollte berücksichtigt werden, dass die FLAG-Markierung einen Einfluss auf die Interaktion zwischen zwei Bindungspartnern haben könnte. Um dies auszuschließen, könnten weitere Koimmunopräzipitationen unter Nutzung anderer Markierungspeptide durchgeführt werden. Auch verschiedenartige Systeme könnten genutzt werden, beispielsweise das Förster-Resonanzenergietransfer-System (FRET) (223). Mittels Gluthation-S-Transferase *pull-down* Assay könnte darüber hinaus geprüft werden, ob eine direkte oder indirekte Interaktion vorliegt (224).

Franz Christian Horstmeier konnte im Rahmen seiner bislang unveröffentlichten Dissertation den mIL-23R und verschiedene Deletionsvarianten mittels eines GFP-Antikörper-gekoppelten Affinitätsgels und eines GFP-markierten hCIB2-Moleküls kopräzipitieren. Da die Addition von GFP jedoch möglicherweise eine unphysiologische Di- oder Oligomerisierung von hCIB2 induziert, bietet das in dieser Arbeit etablierte System einen alternativen Ansatz (219).

In Zukunft könnte bei exakter Charakterisierung eines hCIB2-Bindemotivs am mIL-23R eine Rezeptorvariante konstruiert werden, die kein hCIB2 bindet, sich aber sonst nicht vom Wildtyp unterscheidet. Die Funktion einer solchen Rezeptorvariante könnte dann *in vivo* genutzt werden, um die Relevanz von hCIB2 in IL-23 abhängigen Krankheitsbildern zu untersuchen.

Wie bereits geschildert, ist hCIB2 über seinen negativen Einfluss auf den Membrantransport der Kinase SK1 in der Lage, intrazelluläre Signalwege zu beeinflussen (201). Es liegt nahe, dass die von Franz Christian Horstmeier beobachtete und in dieser Arbeit bestätigte Interaktion von hCIB2 mit dem IL-23R ebenfalls einen Einfluss auf den sekretorischen Weg des IL-23R hat. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde das rot-fluoreszierende Fusionsprotein mIL-23R-mCherry und das grün-fluoreszierende Fusionsprotein hCIB2-GFP in HeLa-Zellen konfokalmikroskopisch dargestellt. Dadurch sollte untersucht werden, ob hCIB2 den Transport des mIL-23R an die Zellmembran hemmt.

Aus Abbildung 27 ist ersichtlich, dass mIL-23R-mCherry und hCIB2-GFP wie erwartet Fluoreszenzsignale emittieren. mIL-23R-mCherry liegt hauptsächlich im zentralen Bereich um den Zellkern lokalisiert vor und scheint sowohl gruppiert, als auch in Teilen homogen verteilt zu sein. hCIB2-GFP liegt primär im Bereich des Zellkerns vor. Durch hCIB2-GFP-induzierte Unterschiede hinsichtlich der mIL-23R-mCherry-Lokalisation konnten nicht dargestellt werden.

Die vorliegenden Daten belegen, dass sowohl das addierte mCherry-Molekül als auch das GFP-Molekül adäquat gefaltet wurden. Neben dem Zellkern konnten jedoch keine mIL-23R-mCherry-haltigen, intrazellulären Kompartimente visualisiert werden. Das könnte auf eine zu geringe Fluoreszenz oder die mangelnde Stabilität des angehängten mCherry-Moleküls hinweisen (218). Ursächlich dafür, dass keine funktionellen Effekte von hCIB2-GFP auf die Lokalisation des mIL-23R beobachtet wurden, könnte die wahrgenommene, geringe Transfektionsrate sein, beispielsweise aufgrund von deutlichen Größenunterschieden zwischen hCIB2-GFP und mIL-23R-mCherry. Eine mögliche Lösung für dieses Problem wäre die Verwendung anderer Transfektionsverfahren, beispielsweise durch die Nutzung von kationischen Mizellen (225). Auch fototoxische Effekte der fluoreszierenden Substanzen könnten für den Mangel doppelt-transfizierter Zellen ursächlich sein (226). Ebenfalls verantwortlich dafür, dass keine Effekte von hCIB2-GFP auf die mIL-23R-mCherry-Lokalisation beobachtet wurden, könnte eine artifizielle, GFP-induzierte Dimerbildung sein, die die physiologischen Funktionen von hCIB2 unterdrückt (219).

Eine Optimierung der genutzten fluoreszierenden Proteine könnte in Zukunft die Visualisierung des mIL-23R und von hCIB2 verbessern. Neben mCherry und GFP wurden zahlreiche weitere, teils deutlich stärker-fluoreszierende, Proteine beschrieben (227). 2017 konnten Shen *et al.* verschiedene mCherry-Derivate erzeugen, die bei geringer Zytotoxizität gleichzeitig über verbesserte Exzitations-Emissionsprofile verfügen (228). Ein Fusionsprotein aus dem IL-23R und diesen neuartigen mCherry-Derivaten könnte in Zukunft eine präzisere und stabilere Lokalisation des IL-23R erlauben und dabei Hinweise auf intrazelluläre Transportprozesse geben.

Unabhängig vom Transfektionserfolg kann mangels vorliegender Daten nicht ausgeschlossen werden, dass die Addition von mCherry an den IL-23R und/oder von GFP an hCIB2 die Interaktion beider Substrate behindert. Daher sollte zwecks Vervollständigung der Versuchsreihe die Interaktion zwischen mIL-23R-mCherry und hCIB2-3xFlag beispielsweise mittels Immunokopräzipitation nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 2.4.5).

Die weitergehende Erforschung des Rezeptor *trafficking* erscheint vor dem Hintergrund sinnvoll, dass Rezeptortransportvorgänge wesentlich in intrazelluläre Signalwege involviert sind. So können Rezeptoren Clathrin abhängig oder –unabhängig von der Zellmembran in die sogenannten frühen Endosomen gelangen (229–232). Dort werden Ubiquitin-markierte Rezeptoren dem endosomalen Abbau in sogenannten *multiple vesicular bodies* (MVBs) zugeführt (231). Nicht-markierte

Rezeptoren hingegen können in den frühen Endosomen wahrscheinlich als intrazelluläre Signalplattform dienen oder zurück an die Membran transportiert werden (230).

Die Transportvorgänge des hIL-23R wurden kürzlich näher untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach IL-23-Stimulation eine Clathrin abhängige Aufnahme des hIL-23R in die frühen Endosomen stattfindet (233). Dort findet ein *ras-related in brain 11* (RAB-11)-mediertes Rezeptorrecycling statt, das wahrscheinlich eine Verstärkung der hIL-23R-Signalkaskade zur Folge hat (233). Der gegenüber chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen protektive Rezeptorhaplotyp R381Q scheint verglichen mit dem Hapolytpe R381 ein vermindertes Rezeptorrecycling und eine verminderte Aktivierung hIL-23R abhängiger Signalwege zur Folge zu haben (233). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl die Oberflächenexpression als auch das Ausmaß der Bindung signaltransduzierender Interaktionspartner (hIL-12R β 1, JAK2, TYK2, STAT3) nach IL-23-Stimulation schwanken, mit Maxima nach 15 und 60 Minuten (233). Diese Ergebnisse demonstrieren die Relevanz des IL-23R *trafficking* für den IL-23R-Signalweg und unterstreichen den Nutzen einer zukünftigen Konfokalmikroskopischen Analyse jener Prozesse unter Einbezug einer möglichen hCIB2-Wirkung.

4.5 Schlussfolgerungen

Zellen befinden sich in einem lebenslangen Gespräch. Statt Worten bedienen sie sich dabei Zytokinen und anderen Botenstoffen. So wie grammatikalische Regeln, kultureller Konsens und persönliche Erfahrungen den Effekt eines Wortes bei seinem Empfänger bestimmen, entscheidet der molekulare Kontext über die Wirkung eines Zytokins auf seine Zielzelle. Die vorliegende Arbeit untersucht verschiedene kontextuelle Einflüsse auf den IL-23-Signalweg und trägt damit zu einem tieferen Verständnis und einer zukünftigen, medizinischen Nutzbarkeit bei.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde demonstriert, dass der Einbau eines SOCS3-Schalters in den IL-23R möglich ist. Dieser Schalter besitzt einen partiell-modularen Charakter und kann in Zukunft zur Erforschung der SOCS3-, aber auch der IL-23-Wirkung *in vivo* genutzt werden.

Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit eine fluoreszierende IL-23R-Variante gezeigt werden, die über eine Wildtyp-ähnliche IL-23-Responsivität verfügt. Diese Rezeptorvariante ermöglicht in Zukunft die Analyse von IL-23R-Transportvorgängen zwischen intrazellulären Kompartimenten und der Zellmembran.

Ebenfalls demonstriert werden konnte, dass der Rezeptorkomplex aus humanem IL-12R β 1 und der Deletionsvariante hIL-23R Δ 476 trotz SHP2-Bindestelle keine IL-23-induzierte Viabilitäts-erhöhung vermittelt. Dies zeigt, dass die in vorhergehenden Analysen des Komplexes aus murinem IL-12R β 1 und der chimären Deletionsvariante mIL-23R-hIL-23R Δ 476 sowie der murinen Deletionsvariante mIL-23R Δ 503 beobachtete, IL-23-induzierte Viabilitätserhöhung durch funktionelle Besonderheiten des murinen IL-12R β 1 und/oder der extrazellulären Domäne des murinen IL-23R erklärt werden kann.

Zuletzt konnte die Interaktion von hCIB2 mit dem IL-23R bestätigt und näher charakterisiert werden. hCIB2 bindet den hIL-23R membranfern der Aminosäure 476, was der Aminosäure 496 des mIL-23R entspricht. In Zukunft kann auf diesen Ergebnissen und der in dieser Arbeit etablierten Methodik aufbauend eine nähere Charakterisierung des hCIB2-Bindemotivs stattfinden (234).

Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2018; 10(2).
2. Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W, Karlson P. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. 15. Aufl.: Thieme; 2005.
3. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R, Duan S, Eiwegger T, Eljaszewicz A, Ferstl R, Frei R, Garbani M, Globinska A, Hess L, Huitema C, Kubo T, Komlosi Z, Konieczna P, Kovacs N, Kucuksezer UC, Meyer N, Morita H, Olzhausen J, O'Mahony L, Pezer M, Prati M, Rebane A, Rhyner C, Rinaldi A, Sokolowska M, Stanic B, Sugita K, Treis A, van de Veen W, Wanke K, Wawrzyniak M, Wawrzyniak P, Wirz OF, Zakzuk JS, Akdis CA. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2016; 138(4):984–1010.
4. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & Development* 2008; 22(10):1276–312.
5. Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunology and Cell Biology* 2011; 89(2):207–15.
6. Sabbah DA, Hajjo R, Sweidan K. Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2020; 20(10):815–34.
7. Galdiero MR, Marone G, Mantovani A. Cancer Inflammation and Cytokines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10; 2017(8):a028662.
8. Moudgil KD, Choubey D. Cytokines in autoimmunity: role in induction, regulation, and treatment. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2011; 31(10):695–703.
9. Zhang J-M, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics* 2007; 45(2):27–37.
10. Spangler JB, Moraga I, Mendoza JL, Garcia KC. Insights into Cytokine–Receptor Interactions from Cytokine Engineering. *Annual Review of Immunology* 2015; (33):139–67.

11. Gadina M, Le MT, Schwartz DM, Silvennoinen O, Nakayamada S, Yamaoka K, O'Shea JJ. Janus kinases to jakinibs: from basic insights to clinical practice. *Rheumatology* 2019; (58(Suppl 1)):i4-i16.
12. Morris R, Kershaw NJ, Babon JJ. The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. *Protein Science* 2018; 27(12):1984–2009.
13. Villarino AV, Kanno Y, Ferdinand JR, O'Shea JJ. Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease. *The Journal of Immunology* 2015; 194(1):21–7.
14. Darnell JE, JR, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994; 264(5164):1415–21.
15. Fu X-Y. A transcription factor with SH2 and SH3 domains is directly activated by an interferon α -induced cytoplasmic protein tyrosine kinase(s). *Cell* 1992; 70(2):323–35.
16. Takahashi-Tezuka M, Hibi M, Fujitani Y, Fukada T, Yamaguchi T, Hirano T. Tec tyrosine kinase links the cytokine receptors to PI-3 kinase probably through JAK. *Oncogene* 1997; 14(19):2273–82.
17. Pompura SL, Dominguez-Villar M. The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function. *Journal of Leukocyte Biology* 2018; 103(6):1065–76.
18. Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, Yasukawa H, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2011; (5):980–5.
19. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2014; 6(10):a016295.
20. Amarasekara DS, Yun H, Kim S, Lee N, Kim H, Rho J. Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. *Immune Network* 2018; 18(1):1-8.
21. Dann SM, Spehlmann ME, Hammond DC, Iimura M, Hase K, Choi LJ, Hanson E, Eckmann L. IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens. *Journal of Immunology* 2008; 180(10):6816–26.

22. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986; 324(6092):73–6.
23. Somers W, Stahl M, Seehra JS. 1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *The EMBO Journal* 1997; 16(5):989–97.
24. Brakenhoff JP, Hon FD de, Fontaine V, Boekel E ten, Schooltink H, Rose-John S, Heinrich PC, Content J, Aarden LA. Development of a human interleukin-6 receptor antagonist. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269(1):86–93.
25. Ehlers M, Grötzinger J, deHon FD, Müllberg J, Brakenhoff JP, Liu J, Wollmer A, Rose-John S. Identification of two novel regions of human IL-6 responsible for receptor binding and signal transduction. *Journal of Immunology* 1994; 153(4):1744–53.
26. Savino R, Lahm A, Giorgio M, Cabibbo A, Tramontano A, Ciliberto G. Saturation mutagenesis of the human interleukin 6 receptor-binding site: implications for its three-dimensional structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90(9):4067–71.
27. Kass DJ. Cytokine-like factor 1 (CLF1): life after development? *Cytokine* 2011; 55(3):325–9.
28. López-Yoldi M, Moreno-Aliaga MJ, Bustos M. Cardiotrophin-1: A multifaceted cytokine. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2015; 26(5):523–32.
29. Kang S, Narazaki M, Metwally H, Kishimoto T. Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. *The Journal of Experimental Medicine* 2020; 217(5):e20190347.
30. Garbers C, Scheller J. Interleukin-6 and interleukin-11: same same but different. *Biological Chemistry* 2013; 394(9):1145–61.
31. Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 1990; 63(6):1149–57.
32. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 1989; 58(3):573–81.

33. Boulanger MJ, Chow D, Brevnova EE, Garcia KC. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* 2003; 300(5628):2101–4.
34. Grötzinger J, Kernebeck T, Kallen KJ, Rose-John S. IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both? *Biological Chemistry* 1999; 380(7-8):803–13.
35. Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T, Kishimoto T. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* 1988; 241(4867):825–8.
36. Rose-John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochemical Journal* 1994; 300(2):281–90.
37. Scheller J, Garbers C, Rose-John S. Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Seminars in Immunology* 2014; 26(1):2–12.
38. Lust JA, Donovan KA, Kline MP, Greipp PR, Kyle RA, Maihle NJ. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* 1992; 4(2):96–100.
39. Mullberg J, Schooltink H, Stoyan T, Gunther M, Graeve L, Buse G, Mackiewicz A, Heinrich PC, Rose-John S. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *European Journal of Immunology* 1993; 23(2):473–80.
40. Heink S, Yogev N, Garbers C, Herwerth M, Aly L, Gasperi C, Husterer V, Croxford AL, Möller-Hackbarth K, Bartsch HS, Sotlar K, Krebs S, Regen T, Blum H, Hemmer B, Misgeld T, Wunderlich TF, Hidalgo J, Oukka M, Rose-John S, Schmidt-Suppran M, Waisman A, Korn T. Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells. *Nature Immunology* 2017; 18(1):74–85.
41. Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff JP, Kallen KJ, Wollmer A, Grotzinger J, Rose-John S. I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nature Biotechnology* 1997; 15(2):142–5.
42. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 2011; 1813(5):878–88.
43. Guschin D, Rogers N, Briscoe J, Witthuhn B, Watling D, Horn F, Pellegrini S, Yasukawa K, Heinrich P, Stark GR. A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT

- signal transduction pathway in response to interleukin-6. *The EMBO Journal* 1995; 14(7):1421–9.
44. Hirahara K, Onodera A, Villarino AV, Bonelli M, Sciumè G, Laurence A, Sun H-W, Brooks SR, Vahedi G, Shih H-Y, Gutierrez-Cruz G, Iwata S, Suzuki R, Mikami Y, Okamoto Y, Nakayama T, Holland SM, Hunter CA, Kanno Y, O'Shea JJ. Asymmetric Action of STAT Transcription Factors Drives Transcriptional Outputs and Cytokine Specificity. *Immunity* 2015; 42(5):877–89.
 45. Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, GRAEVE L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochemical Journal* 1998; 334(2):297–314.
 46. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical Journal* 2003; 374(1):1–20.
 47. Floss DM, Mrotzek S, Klöcker T, Schröder J, Grötzinger J, Rose-John S, Scheller J. Identification of canonical tyrosine-dependent and non-canonical tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor. *Journal of Biological Chemistry* 2013; 288(27):19386–400.
 48. Taniguchi K, Wu L-W, Grivennikov SI, Jong PR de, Lian I, Yu F-X, Wang K, Ho SB, Boland BS, Chang JT, Sandborn WJ, Hardiman G, Raz E, Maehara Y, Yoshimura A, Zucman-Rossi J, Guan K-L, Karin M. A gp130-Src-YAP module links inflammation to epithelial regeneration. *Nature* 2015; 519(7541):57–62.
 49. Hirota H, Chen J, Betz UA, Rajewsky K, Gu Y, Ross J, JR, Muller W, Chien KR. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* 1999; 97(2):189–98.
 50. Betz UA, Bloch W, van den Broek M, Yoshida K, Taga T, Kishimoto T, Addicks K, Rajewsky K, Muller W. Postnatally induced inactivation of gp130 in mice results in neurological, cardiac, hematopoietic, immunological, hepatic, and pulmonary defects. *The Journal of Experimental Medicine* 1998; 188(10):1955–65.
 51. Yoshida K, Taga T, Saito M, Suematsu S, Kumanogoh A, Tanaka T, Fujiwara H, Hirata M, Yamagami T, Nakahata T, Hirabayashi T, Yoneda Y, Tanaka K, Wang WZ, Mori C, Shiota

- K, Yoshida N, Kishimoto T. Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93(1):407–11.
52. Andersson LC, Gahmberg CG, Kimura AK, Wigzell H. Activated human T lymphocytes display new surface glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1978; 75(7):3455–8.
53. Liongue C, Sertori R, Ward AC. Evolution of Cytokine Receptor Signaling. *The Journal of Immunology* 2016; 197(1):11–8.
54. Xu Y, Kershaw NJ, Luo CS, Soo P, Pocock MJ, Czabotar PE, Hilton DJ, Nicola NA, Garrett TPJ, Zhang J-G. Crystal structure of the entire ectodomain of gp130: insights into the molecular assembly of the tall cytokine receptor complexes. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285(28):21214–8.
55. Saito M, Yoshida K, Hibi M, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *Journal of Immunology* 1992; 148(12):4066–71.
56. Bravo J, Staunton D, Heath JK, Jones EY. Crystal structure of a cytokine-binding region of gp130. *The EMBO Journal* 1998; 17(6):1665–74.
57. Chow D, Brevnova L, He X, Martick MM, Bankovich A, Garcia K. A structural template for gp130-cytokine signaling assemblies. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 2002; 1592(3):225–35.
58. Kurth I, Horsten U, Pflanz S, Timmermann A, Küster A, Dahmen H, Tacke I, Heinrich PC, Müller-Newen G. Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130. *Journal of Immunology* 2000; 164(1):273–82.
59. 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. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270(12):6523–30.
60. Murakami M, Narazaki M, Hibi M, Yawata H, Yasukawa K, Hamaguchi M, Taga T, Kishimoto T. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is

- conserved in the cytokine receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 88(24):11349–53.
61. 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. *Biochemical Journal* 2002; 361(1):105–11.
 62. Haan C, Is'harc H, Hermanns HM, Schmitz-Van De Leur H, Kerr IM, Heinrich PC, Grötzinger J, Behrmann I. Mapping of a region within the N terminus of Jak1 involved in cytokine receptor interaction. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(40):37451–8.
 63. Haan C, Hermanns HM, Heinrich PC, Behrmann I. A single amino acid substitution (Trp(666)-Ala) in the interbox1/2 region of the interleukin-6 signal transducer gp130 abrogates binding of JAK1, and dominantly impairs signal transduction. *Biochemical Journal* 2000; 349(Pt 1):261–6.
 64. Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE, Yancopoulos GD. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 1995; 267(5202):1349–53.
 65. Hemmann U, Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Kurapkat G, Grötzinger J, Wollmer A, Zhong Z, Darnell JE, GRAEVE L, Heinrich PC, Horn F. Differential Activation of Acute Phase Response Factor/Stat3 and Stat1 via the Cytoplasmic Domain of the Interleukin 6 Signal Transducer gp130 II. Src HOMOLOGY SH2 DOMAINS DEFINE THE SPECIFICITY OF STAT FACTOR ACTIVATION. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271(22):12999–3007. doi: 10.1074/jbc.271.22.12999.
 66. Schaper F, GENDO C, ECK M, SCHMITZ J, GRIMM C, ANHUF D, KERR IM, Heinrich PC. Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochemical Journal* 1998; 335(3):557–65.
 67. Nicholson SE, Souza D de, Fabri LJ, Corbin J, Willson TA, Zhang JG, Silva A, Asimakis M, Farley A, Nash AD, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M. Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97(12):6493–8.

68. Gibson RM, Schiemann WP, Prichard LB, Reno JM, Ericsson LH, Nathanson NM. Phosphorylation of human gp130 at Ser-782 adjacent to the Di-leucine internalization motif. Effects on expression and signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(29):22574–82.
69. Radtke S, Wüller S, Yang X, Lippok BE, Mütze B, Mais C, Leur HS-V de, Bode JG, Gaestel M, Heinrich PC, Behrmann I, Schaper F, Hermanns HM. Cross-regulation of cytokine signalling: pro-inflammatory cytokines restrict IL-6 signalling through receptor internalisation and degradation. *Journal of Cell Science* 2010; 123(6):947–59.
70. Gibson RM, Laszlo GS, Nathanson NM. Calmodulin-dependent protein kinases phosphorylate gp130 at the serine-based dileucine internalization motif. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1714(1):56–62.
71. Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, Yancopoulos GD, Taga T, Kishimoto T. Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood* 1993; 82(4):1120–6.
72. Schreiber S, Aden K, Bernardes JP, Conrad C, Tran F, Höper H, Volk V, Mishra N, Blase JI, Nikolaus S, Bethge J, Kühbacher T, Röcken C, Chen M, Cottingham I, Petri N, Rasmussen BB, Lokau J, Lenk L, Garbers C, Feuerhake F, Rose-John S, Waetzig GH, Rosenstiel P. Therapeutic Interleukin-6 Trans-signaling Inhibition by Olamkicept (sgp130Fc) in Patients With Active Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2021; 160(7):2354-2366.e11.
73. Yoshimura A, Ito M, Chikuma S, Akanuma T, Nakatsukasa H. Negative Regulation of Cytokine Signaling in Immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2018; 10(7):a028571.
74. Böhmer F-D, Friedrich K. Protein tyrosine phosphatases as wardens of STAT signaling. *JAK-STAT* 2014; 3(1):e28087.
75. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiya S, Yoshimura A. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 1997; 387(6636):921–4.

76. Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K, Akira S, Kishimoto T. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 1997; 387(6636):924–9.
77. Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJL, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997; 387(6636):917.
78. Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Hara T, Miyajima A. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *The EMBO Journal* 1995; 14(12):2816–26.
79. Masuhara M, Sakamoto H, Matsumoto A, Suzuki R, Yasukawa H, Mitsui K, Wakioka T, Tanimura S, Sasaki A, Misawa H, Yokouchi M, Ohtsubo M, Yoshimura A. Cloning and characterization of novel CIS family genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 239(2):439–46.
80. Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K, Yokouchi M, Ohtsubo M, Misawa H, Miyajima A, Yoshimura A. CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* 1997; 89(9):3148–54.
81. Starr R, Metcalf D, Elefanty AG, Brysha M, Willson TA, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS. Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95(24):14395–9.
82. Metcalf D, Greenhalgh CJ, Viney E, Willson TA, Starr R, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS. Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature* 2000; 405(6790):1069–73.
83. Marine JC, McKay C, Wang D, Topham DJ, Parganas E, Nakajima H, Pendeville H, Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A, Ihle JN. SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell* 1999; 98(5):617–27.
84. Roberts AW, Robb L, Rakar S, Hartley L, Cluse L, Nicola NA, Metcalf D, Hilton DJ, Alexander WS. Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of

- cytokine signaling 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98(16):9324–9.
85. Zhang L, Badgwell DB, Bevers JJ, Schlessinger K, Murray PJ, Levy DE, Watowich SS. IL-6 signaling via the STAT3/SOCS3 pathway: Functional analysis of the conserved STAT3 N-domain. *Mol Cell Biochem* 2006; 288(1-2):179–89.
86. Babon JJ, McManus EJ, Yao S, DeSouza DP, Mielke LA, Sprigg NS, Willson TA, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M, Nicholson SE, Norton RS. The Structure of SOCS3 Reveals the Basis of the Extended SH2 Domain Function and Identifies an Unstructured Insertion That Regulates Stability. *Molecular Cell* 2006; 22(2):205–16.
87. Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Sprigg NS, Starr R, Nicholson SE, Metcalf D, Nicola NA. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95(1):114–9.
88. Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, Ohtsuka S, Imaizumi T, Matsuda T, Ihle JN, Yoshimura A. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *The EMBO Journal* 1999; 18(5):1309–20.
89. Sasaki A, Yasukawa H, Suzuki A, Kamizono S, Syoda T, Kinjyo I, Sasaki M, Johnston JA, Yoshimura A. 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 to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 1999; 4(6):339–51.
90. Kamura T, Maenaka K, Kotoshiba S, Matsumoto M, Kohda D, Conaway RC, Conaway JW, Nakayama KI. VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes & Development* 2004; 18(24):3055–65.
91. Croker BA, Krebs DL, Zhang J-G, Wormald S, Willson TA, Stanley EG, Robb L, Greenhalgh CJ, Forster I, Clausen BE, Nicola NA, Metcalf D, Hilton DJ, Roberts AW, Alexander WS. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nature Immunology* 2003; 4(6):540–5.
92. Kershaw NJ, Laktyushin A, Nicola NA, Babon JJ. Reconstruction of an active SOCS3-based E3 ubiquitin ligase complex in vitro: identification of the active components and JAK2 and gp130 as substrates. *Growth Factors* 2014; 32(1):1–10.

93. Babon JJ, Kershaw NJ, Murphy JM, Varghese LN, Laktyushin A, Young SN, Lucet IS, Norton RS, Nicola NA. Suppression of cytokine signaling by SOCS3: characterization of the mode of inhibition and the basis of its specificity. *Immunity* 2012; 36(2):239–50.
94. White CA, Nicola NA. SOCS3: An essential physiological inhibitor of signaling by interleukin-6 and G-CSF family cytokines. *JAK-STAT* 2013; 2(4):e25045.
95. Carow B, Rottenberg ME. SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation. *Frontiers in Immunology* 2014; 58(5):58.
96. Babon JJ, Varghese LN, Nicola NA. Inhibition of IL-6 family cytokines by SOCS3. *Seminars in Immunology* 2014; 26(1):13–9.
97. Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, Hanada T, Takeda K, Akira S, Hoshijima M, Hirano T, Chien KR, Yoshimura A. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nature Immunology* 2003; 4(6):551–6.
98. Lang R, Pauleau A-L, Parganas E, Takahashi Y, Mages J, Ihle JN, Rutschman R, Murray PJ. SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling. *Nature Immunology* 2003; 4(6):546–50.
99. Inagaki-Ohara K, Kondo T, Ito M, Yoshimura A. SOCS, inflammation, and cancer. *JAK-STAT* 2013; 2(3):e24053.
100. Chen Z, Laurence A, Kanno Y, Pacher-Zavisin M, Zhu B-M, Tato C, Yoshimura A, Hennighausen L, O'Shea JJ. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103(21):8137–42.
101. Seki Y, Inoue H, Nagata N, Hayashi K, Fukuyama S, Matsumoto K, Komine O, Hamano S, Himeno K, Inagaki-Ohara K, Cacalano N, O'Garra A, Oshida T, Saito H, Johnston JA, Yoshimura A, Kubo M. SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses. *Nature Medicine* 2003; 9(8):1047–54.
102. Babon J, Nicola NA. The biology and mechanism of action of Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3). *Growth Factors* 2012; 30(4):207–19.
103. Matsumura Y, Kobayashi T, Ichiyama K, Yoshida R, Hashimoto M, Takimoto T, Tanaka K, Chinen T, Shichita T, Wyss-Coray T, Sato K, Yoshimura A. Selective expansion of foxp3-positive regulatory T cells and immunosuppression by suppressors of cytokine signaling 3-deficient dendritic cells. *Journal of Immunology* 2007; 179(4):2170–9.

104. Taleb S, Romain M, Ramkhelawon B, Uyttenhove C, Pasterkamp G, Herbin O, Esposito B, Perez N, Yasukawa H, van Snick J, Yoshimura A, Tedgui A, Mallat Z. Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. *The Journal of Experimental Medicine* 2009; 206(10):2067–77.
105. Kievit P, Howard JK, Badman MK, Balthasar N, Coppari R, Mori H, Lee CE, Elmquist JK, Yoshimura A, Flier JS. Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMC-expressing cells. *Cell Metabolism* 2006; 4(2):123–32.
106. Smith PD, Sun F, Park KK, Cai B, Wang C, Kuwako K, Martinez-Carrasco I, Connolly L, He Z. SOCS3 deletion promotes optic nerve regeneration in vivo. *Neuron* 2009; 64(5):617–23.
107. Torisu T, Sato N, Yoshiga D, Kobayashi T, Yoshioka T, Mori H, Iida M, Yoshimura A. The dual function of hepatic SOCS3 in insulin resistance in vivo. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 2007; 12(2):143–54.
108. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 1989; 170(3):827–45.
109. Stern AS, Podlaski FJ, Hulmes JD, Pan YC, Quinn PM, Wolitzky AG, Familletti PC, Stremlo DL, Truitt T, Chizzonite R. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; 87(17):6808–12.
110. Gubler U, Chua AO, Schoenhaut DS, Dwyer CM, McComas W, Motyka R, Nabavi N, Wolitzky AG, Quinn PM, Familletti PC. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 88(10):4143–7.
111. Tait Wojno ED, Hunter CA, Stumhofer JS. The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery. *Immunity* 2019; 50(4):851–70.
112. Zundler S, Neurath MF. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2015; 26(5):559–68.

113. Catalan-Dibene J, McIntyre LL, Zlotnik A. Interleukin 30 to Interleukin 40. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2018; 38(10):423–39.
114. Floss DM, Moll JM, Scheller J. IL-12 and IL-23-Close Relatives with Structural Homologies but Distinct Immunological Functions. *Cells* 2020; 9(10):2184.
115. 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 Reviews* 2015; 26(5):471–4.
116. Russell TD, Yan Q, Fan G, Khalifah AP, Bishop DK, Brody SL, Walter MJ. IL-12 p40 homodimer-dependent macrophage chemotaxis and respiratory viral inflammation are mediated through IL-12 receptor beta 1. *Journal of Immunology* 2003; 171(12):6866–74.
117. Ha SJ, Lee CH, Lee SB, Kim CM, Jang KL, Shin HS, Sung YC. A novel function of IL-12p40 as a chemotactic molecule for macrophages. *Journal of Immunology* 1999; 163(5):2902–8.
118. Jana M, Dasgupta S, Saha RN, Liu X, Pahan K. Induction of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) by interleukin-12 p40 monomer and homodimer in microglia and macrophages. *Journal of Neurochemistry* 2003; 86(2):519–28.
119. Gillessen S, Carvajal D, Ling P, Podlaski FJ, Stremlo DL, Familletti PC, Gubler U, Presky DH, Stern AS, Gately MK. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *European Journal of Immunology* 1995; 25(1):200–6.
120. Stumhofer JS, Tait ED, Quinn WJ3, Hosken N, Spudy B, Goenka R, Fielding CA, O'Hara AC, Chen Y, Jones ML, Saris CJM, Rose-John S, Cua DJ, Jones SA, Elloso MM, Grotzinger J, Cancro MP, Levin SD, Hunter CA. A role for IL-27p28 as an antagonist of gp130-mediated signaling. *Nature Immunology* 2010; 11(12):1119–26.
121. Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu C-Y, Gately MK, Gubler U. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two β -type cytokine receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93(24):14002–7.
122. Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O'Farrell A-M, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, Waal Malefyt R de, Moore KW. A receptor for the

- heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *Journal of Immunology* 2002; 168(11):5699–708.
123. Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, Phillips JH, McClanahan TK, Waal Malefyt R de, Kastelein RA. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *Journal of Immunology* 2004; 172(4):2225–31.
 124. Collison LW, Delgoffe GM, Guy CS, Vignali KM, Chaturvedi V, Fairweather D, Satoskar AR, Garcia KC, Hunter CA, Drake CG, Murray PJ, Vignali DAA. The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nature Immunology* 2012; 13(3):290–9.
 125. Wang R-X, Yu C-R, Dambuza IM, Mahdi RM, Dolinska MB, Sergeev YV, Wingfield PT, Kim S-H, Egwuagu CE. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nature Medicine* 2014; 20(6):633–41.
 126. Gollob JA, Murphy EA, Mahajan S, Schnipper CP, Ritz J, Frank DA. Altered interleukin-12 responsiveness in Th1 and Th2 cells is associated with the differential activation of STAT5 and STAT1. *Blood* 1998; 91(4):1341–54.
 127. Jacobson NG, Szabo SJ, Weber-Nordt RM, Zhong Z, Schreiber RD, Darnell JE, Murphy KM. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *The Journal of Experimental Medicine* 1995; 181(5):1755–62.
 128. Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld GC, Ihle JN. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 1996; 382(6587):171–4.
 129. Hibbert L, Pflanz S, Waal Malefyt R de, Kastelein RA. IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2003; 23(9):513–22.
 130. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y-J, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, Waal-Malefyt Rd, Hannum C, Bazan J, Kastelein RA. Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities

Similar as Well as Distinct from IL-12. *Immunity* 2000; 13(5):715–25. doi: 10.1016/S1074-7613(00)00070-4.

131. Bohnacker S, Hildenbrand K, Aschenbrenner I, Müller SI, Bieren JE, Feige MJ. Influence of glycosylation on IL-12 family cytokine biogenesis and function. *Molecular Immunology* 2020; (126):120–8.
132. Lupardus PJ, Garcia KC. The Structure of Interleukin-23 Reveals the Molecular Basis of p40 Subunit Sharing with Interleukin-12. *Journal of Molecular Biology* 2008; 382(4):931–41.
133. Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpoor S, Danielsson A, Edlund K, Asplund A, Sjöstedt E, Lundberg E, Szigartyo CA-K, Skogs M, Takanen JO, Berling H, Tegel H, Mulder J, Nilsson P, Schwenk JM, Lindskog C, Danielsson F, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Feilitzén K von, Forsberg M, Zwaalen M, Olsson I, Navani S, Huss M, Nielsen J, Ponten F, Uhlén M. Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 2014; 13(2):397–406.
134. Bloch Y, Bouchareychas L, Merceron R, Składanowska K, van den Bossche L, Detry S, Govindarajan S, Elewaut D, Haerynck F, Dullaers M, Adamopoulos IE, Savvides SN. Structural Activation of Pro-inflammatory Human Cytokine IL-23 by Cognate IL-23 Receptor Enables Recruitment of the Shared Receptor IL-12R β 1. *Immunity* 2018; 48(1):45-58.e6.
135. Hummel TM, Ackfeld T, Schonberg M, Ciupka G, Schulz F, Oberdoerster A, Grotzinger J, Scheller J, Floss DM. Synthetic Deletion of the Interleukin 23 Receptor (IL-23R) Stalk Region Led to Autonomous IL-23R Homodimerization and Activation. *Mol Cell Biol* 2017; 37(17):e00014-17.
136. Floss DM, Klöcker T, Schröder J, Lamertz L, Mrotzek S, Strobl B, Hermanns H, Scheller J. Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor β 1 and interleukin 23 receptor to Janus kinases. *Molecular Biology of the Cell* 2016; 27(14):2301–16.
137. Chua AO, Chizzonite R, Desai BB, Truitt TP, Nunes P, Minetti LJ, Warriar RR, Presky DH, Levine JF, Gately MK. Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *Journal of Immunology* 1994; 153(1):128–36.

138. Chua AO, Wilkinson VL, Presky DH, Gubler U. Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component. *Journal of Immunology* 1995; 155(9):4286–94.
139. Pastor-Fernández G, Mariblanca IR, Navarro MN. Decoding IL-23 Signaling Cascade for New Therapeutic Opportunities. *Cells* 2020; 9(9):2044.
140. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 2015; 74(1):5–17.
141. Taniuchi I. CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annual Review of Immunology* 2018; (36):579–601.
142. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology* 1986; 136(7):2348–57.
143. Pearce EJ, M Kane C, Sun J, J Taylor J, McKee AS, Cervi L. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunological Reviews* 2004; (201):117–26.
144. Mogue T, Goodrich ME, Ryan L, LaCourse R, North RJ. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *The Journal of Experimental Medicine* 2001; 193(3):271–80.
145. Lyadova IV, Pantelev AV. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers. *Mediators of Inflammation* 2015; (854507).
146. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* 2005; 6(11):1123–32.
147. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *The Journal of Experimental Medicine* 1996; 183(6):2593–603.
148. Patel DD, Kuchroo VK. Th17 Cell Pathway in Human Immunity: Lessons from Genetics and Therapeutic Interventions. *Immunity* 2015; 43(6):1040–51.

149. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lotvall J, Sjostrand M, Gruenert DC, Skoogh BE, Linden A. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *Journal of Immunology* 1999; 162(4):2347–52.
150. Schwarzenberger P, La Russa V, Miller A, Ye P, Huang W, Zieske A, Nelson S, Bagby GJ, Stoltz D, Mynatt RL, Spriggs M, Kolls JK. IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines. *Journal of Immunology* 1998; 161(11):6383–9.
151. Rangel-Moreno J, Carragher DM, La Luz Garcia-Hernandez M de, Hwang JY, Kusser K, Hartson L, Kolls JK, Khader SA, Randall TD. The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17. *Nature Immunology* 2011; 12(7):639–46.
152. Mitsdoerffer M, Lee Y, Jäger A, Kim H-J, Korn T, Kolls JK, Cantor H, Bettelli E, Kuchroo VK. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107(32):14292–7.
153. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *The Journal of Infectious Diseases* 2004; 190(3):624–31.
154. Wu Q, Martin RJ, Rino JG, Breed R, Torres RM, Chu HW. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Microbes and Infection* 2007; 9(1):78–86.
155. Purvis HA, Stoop JN, Mann J, Woods S, Kozijn AE, Hambleton S, Robinson JH, Isaacs JD, Anderson AE, Hilkens CMU. Low-strength T-cell activation promotes Th17 responses. *Blood* 2010; 116(23):4829–37.
156. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; 441(7090):231–4.
157. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature Immunology* 2007; 8(9):967–74.

158. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature Immunology* 2007; (8(9)):942–9.
159. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, McClanahan TK, O'Shea JJ, Cua DJ. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nature Immunology* 2009; 10(3):314–24.
160. Durant L, Watford WT, Ramos HL, Laurence A, Vahedi G, Wei L, Takahashi H, Sun H-W, Kanno Y, Powrie F, O'Shea JJ. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity* 2010; 32(5):605–15.
161. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nature Immunology* 2007; 8(12):1390–7.
162. Matusiewicz D, Kivisakk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 1999; 5(2):101–4.
163. Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer JS, McClanahan T, Blumenschein W, Churakovsa T, Low J, Presta L, Hunter CA, Kastelein RA, Cua DJ. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Clinical Investigation* 2006; 116(5):1317–26.
164. Lewis BJ, Rajpara S, Haggart AM, Wilson HM, Barker RN, Ormerod AD. Predominance of activated, clonally expanded T helper type 17 cells within the CD4+ T cell population in psoriatic lesions. *Clinical and Experimental Immunology* 2013; 173(1):38–46.
165. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP, Matsunami N, Ardlie KG, Civello D, Catanese JJ, Leong DU, Panko JM, McAllister LB, Hansen CB, Papenfuss J, Prescott SM, White TJ, Leppert MF, Krueger GG, Begovich AB. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *American Journal of Human Genetics* 2007; 80(2):273–90.
166. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick

- D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *The Journal of Clinical Investigation* 2006; 116(5):1310–6.
167. Momozawa Y, Mni M, Nakamura K, Coppieters W, Almer S, Amininejad L, Cleynen I, Colombel J-F, Rijk P de, Dewit O, Finkel Y, Gassull MA, Goossens D, Laukens D, Lémann M, Libioulle C, O'Morain C, Reenaers C, Rutgeerts P, Tysk C, Zelenika D, Lathrop M, Del-Favero J, Hugot J-P, Vos M de, Franchimont D, Vermeire S, Louis E, Georges M. Resequencing of positional candidates identifies low frequency IL23R coding variants protecting against inflammatory bowel disease. *Nature Genetics* 2011; 43(1):43–7.
168. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006; 314(5804):1461–3.
169. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* 2003; 198(12):1951–7.
170. Du J, Wang X, Tan G, Liang Z, Zhang Z, Yu H. The association between genetic polymorphisms of interleukin 23 receptor gene and the risk of rheumatoid arthritis: An updated meta-analysis. *Clinical Immunology* 2020; 210(108250).
171. Papp KA, Langley RG, Lebwohl M, Krueger GG, Szapary P, Yeilding N, Guzzo C, Hsu M-C, Wang Y, Li S, Dooley LT, Reich K. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2). *Lancet* 2008; 371(9625):1675–84.
172. Leonardi CL, Kimball AB, Papp KA, Yeilding N, Guzzo C, Wang Y, Li S, Dooley LT, Gordon KB. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1). *Lancet* 2008; (9625):1665–74.
173. Feagan BG, Sandborn WJ, Gasink C, Jacobstein D, Lang Y, Friedman JR, Blank MA, Johanns J, Gao L-L, Miao Y, Adedokun OJ, Sands BE, Hanauer SB, Vermeire S, Targan S, Ghosh S, Villiers WJ de, Colombel J-F, Tulassay Z, Seidler U, Salzberg BA, Desreumaux P,

- Lee SD, Loftus EV, Dieleman LA, Katz S, Rutgeerts P. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *The New England Journal of Medicine* 2016; 375(20):1946–60.
174. Mease PJ, Rahman P, Gottlieb AB, Kollmeier AP, Hsia EC, Xu XL, Sheng S, Agarwal P, Zhou B, Zhuang Y, van der Heijde D, McInnes IB. Guselkumab in biologic-naive patients with active psoriatic arthritis (DISCOVER-2): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2020; 395(10230):1126–36.
175. Deodhar A, Helliwell PS, Boehncke W-H, Kollmeier AP, Hsia EC, Subramanian RA, Xu XL, Sheng S, Agarwal P, Zhou B, Zhuang Y, Ritchlin CT. Guselkumab in patients with active psoriatic arthritis who were biologic-naive or had previously received TNF α inhibitor treatment (DISCOVER-1): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2020; 395(10230):1115–25.
176. Reich K, Papp KA, Blauvelt A, Tying SK, Sinclair R, Thaçi D, Nograles K, Mehta A, Cichanowitz N, Li Q, Liu K, La Rosa C, Green S, Kimball AB. 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(10091):276–88.
177. Gordon KB, Strober B, Lebwohl M, Augustin M, Blauvelt A, Poulin Y, Papp KA, Sofen H, Puig L, Foley P, Ohtsuki M, Flack M, Geng Z, Gu Y, Valdes JM, Thompson EH, Bachelez H. Efficacy and safety of risankizumab in moderate-to-severe plaque psoriasis (UltIMMa-1 and UltIMMa-2): results from two double-blind, randomised, placebo-controlled and ustekinumab-controlled phase 3 trials. *Lancet* 2018; 392(10148):650–61.
178. Gadina M, Johnson C, Schwartz D, Bonelli M, Hasni S, Kanno Y, Changelian P, Laurence A, O'Shea JJ. Translational and clinical advances in JAK-STAT biology: The present and future of jakinibs. *Journal of Leukocyte Biology* 2018; 104(3):499–514.
179. Panés J, Vermeire S, Lindsay JO, Sands BE, Su C, Friedman G, Zhang H, Yarlas A, Bayliss M, Maher S, Cappelleri JC, Bushmakina AG, Rubin DT. Tofacitinib in Patients with Ulcerative Colitis: Health-Related Quality of Life in Phase 3 Randomised Controlled Induction and Maintenance Studies. *Journal of Crohn's & Colitis* 2019; 13(1):139–40.
180. Strand V, Kremer JM, Gruben D, Krishnaswami S, Zwillich SH, Wallenstein GV. Tofacitinib in Combination With Conventional Disease-Modifying Antirheumatic Drugs in

- Patients With Active Rheumatoid Arthritis: Patient-Reported Outcomes From a Phase III Randomized Controlled Trial. *Arthritis Care & Research* 2017; 69(4):592–8.
181. Gladman D, Rigby W, Azevedo VF, Behrens F, Blanco R, Kaszuba A, Kudlacz E, Wang C, Menon S, Hendrikx T, Kanik KS. Tofacitinib for Psoriatic Arthritis in Patients with an Inadequate Response to TNF Inhibitors. *The New England Journal of Medicine* 2017; 377(16):1525–36.
182. Althoff K, Mullberg J, Aasland D, Voltz N, Kallen K, Grotzinger J, Rose-John S. Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins. *Biochemical Journal* 2001; 353(3):663–72.
183. Ketteler R, Glaser S, Sandra O, Martens UM, Klingmuller U. Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Therapy* 2002; 9(8):477–87.
184. Suthaus J, Tillmann A, Lorenzen I, Bulanova E, Rose-John S, Scheller J. Forced Homo- and Heterodimerization of All gp130-Type Receptor Complexes Leads to Constitutive Ligand-independent Signaling and Cytokine-independent Growth. *Molecular Biology of the Cell* 2010; 21(15):2797–807.
185. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 1973; 51(5):1417–23.
186. Franke M, Schröder J, Monhasery N, Ackfeld T, Hummel TM, Rabe B, Garbers C, Becker-Pauly C, Floss DM, Scheller J. Human and Murine Interleukin 23 Receptors Are Novel Substrates for A Disintegrin and Metalloproteases ADAM10 and ADAM17. *Journal of Biological Chemistry* 2016; 291(20):10551–61.
187. Floss DM, Schönberg M, Franke M, Horstmeier FC, Engelowski E, Schneider A, Rosenfeldt EM, Scheller J. IL-6/IL-12 Cytokine Receptor Shuffling of Extra- and Intracellular Domains Reveals Canonical STAT Activation via Synthetic IL-35 and IL-39 Signaling. *Scientific Reports* 2017; 7(1):15172.
188. Gluzman Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 1981; 23(1):175–82.

189. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology* 1977; 36(1):59–74.
190. SCHERER WF, SYVERTON JT, GEY GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *The Journal of Experimental Medicine* 1953; 97(5):695–710.
191. Behrmann I, Smyczek T, Heinrich PC, Schmitz-Van de Leur H, Komyod W, Giese B, Müller-Newen G, Haan S, Haan C. Janus kinase (Jak) subcellular localization revisited: the exclusive membrane localization of endogenous Janus kinase 1 by cytokine receptor interaction uncovers the Jak.receptor complex to be equivalent to a receptor tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(34):35486–93.
192. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732):1350–4.
193. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 1975; 94(3):441–8. doi: 10.1016/0022-2836(75)90213-2.
194. Hopp TP, Prickett KS, Price VL, Libby RT, March CJ, Pat Cerretti D, Urdal DL, Conlon PJ. A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Nature Biotechnology* 1988; 6(10):1204–10.
195. Watanabe S, Mui AL, Muto A, Chen JX, Hayashida K, Yokota T, Miyajima A, Arai K. Reconstituted human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor transduces growth-promoting signals in mouse NIH 3T3 cells: comparison with signalling in BA/F3 pro-B cells. *Mol Cell Biol* 1993; 13(3):1440–8.
196. Engelowski E, Schneider A, Franke M, Xu H, Clemen R, Lang A, Baran P, Binsch C, Knebel B, Al-Hasani H, Moll JM, Floß DM, Lang PA, Scheller J. Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands. *Nature Communications* 2018; 9(1):2034.

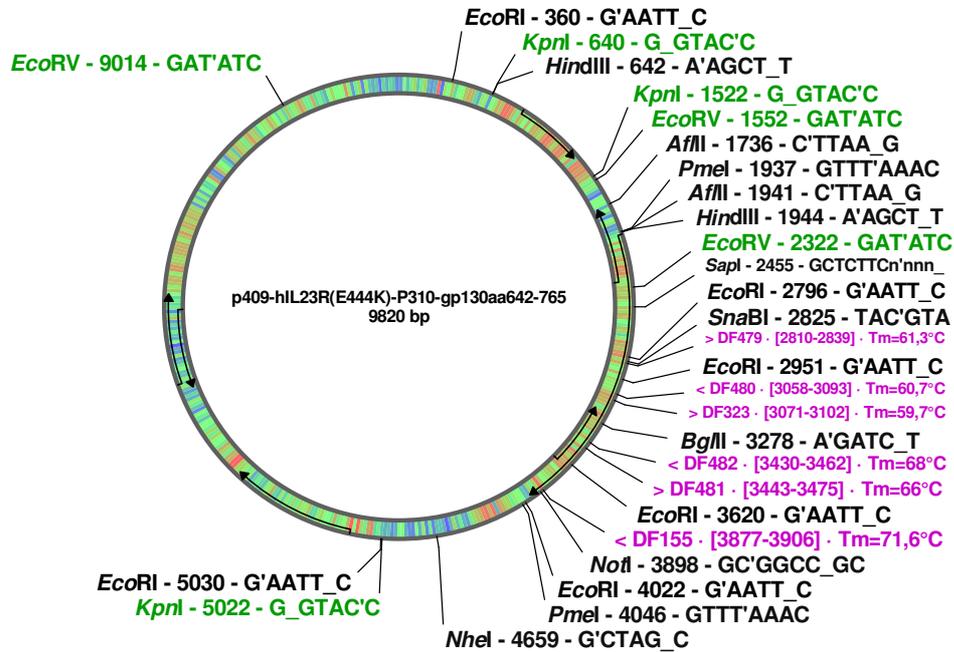
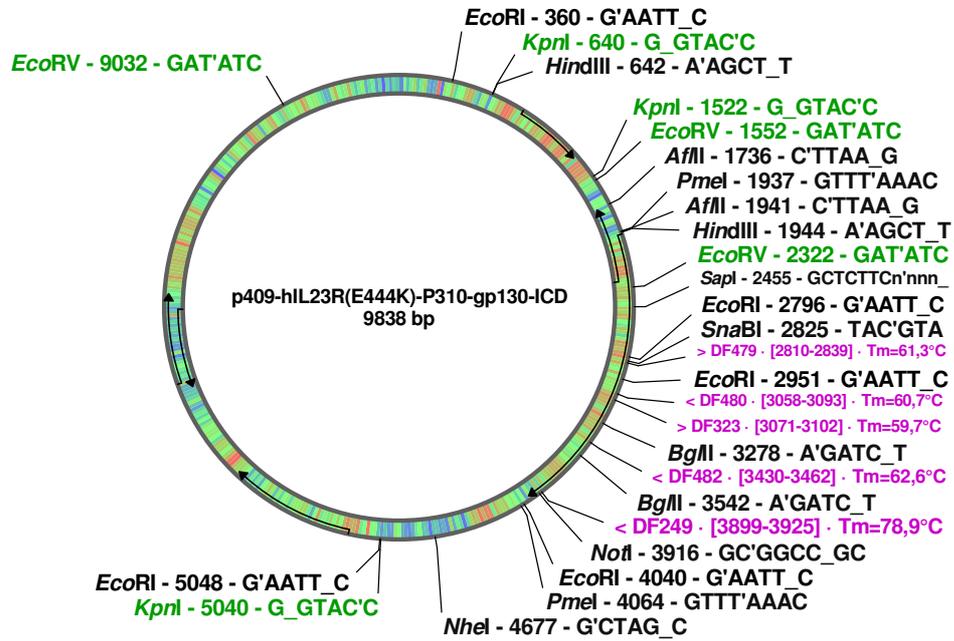
197. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 2004; 22(12):1567–72.
198. Sofie Beier. Konzentrationsabhängige Effekte der Interleukin-23 Signaltransduktion in Ba/F3 Zellen; 2017.
199. 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. *Biochemistry and Cell Biology* 2012; 90(5):646–56.
200. Wang X, Yang Y, Cai W-Q, Lu Y. The Relationship of Sphingosine Kinase 1 With Pyroptosis Provides a New Strategy for Tumor Therapy. *Frontiers in Immunology* 2020:574990.
201. Zhu W, Jarman KE, Lokman NA, Neubauer HA, Davies LT, Gliddon BL, Taing H, Moretti PAB, Oehler MK, Pitman MR, Pitson SM. CIB2 Negatively Regulates Oncogenic Signaling in Ovarian Cancer via Sphingosine Kinase 1. *Cancer Research* 2017; 77(18):4823–34.
202. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994; 263(5148):802–5.
203. Chen Y, Ouyang J, Yan R, Maarouf MH, Wang X, Chen B, Liu S, Hu J, Guo G, Zhang J, Dai S-M, Xu H, Chen J-L. Silencing SOCS3 Markedly Deteriorates Spondyloarthritis in Mice Induced by Minicircle DNA Expressing IL23. *Front Immunol* 2018; 9:385. doi: 10.3389/fimmu.2018.02641.
204. Fan G, Martinowich K, Chin MH, He F, Fouse SD, Hutnick L, Hattori D, Ge W, Shen Y, Wu H, Hoeve J ten, Shuai K, Sun YE. DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development* 2005; 132(15):3345–56.
205. Floss DM, Scheller J. Naturally occurring and synthetic constitutive-active cytokine receptors in disease and therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2019; (47):1–20.
206. Flores RR, Kim E, Zhou L, Yang C, Zhao J, Gambotto A, Robbins PD. IL-Y, a synthetic member of the IL-12 cytokine family, suppresses the development of type 1 diabetes in NOD mice. *European Journal of Immunology* 2015; 45(11):3114–25.
207. Wang R-X, Yu C-R, Mahdi RM, Egwuagu CE. Novel IL27p28/IL12p40 cytokine suppressed experimental autoimmune uveitis by inhibiting autoreactive Th1/Th17 cells and

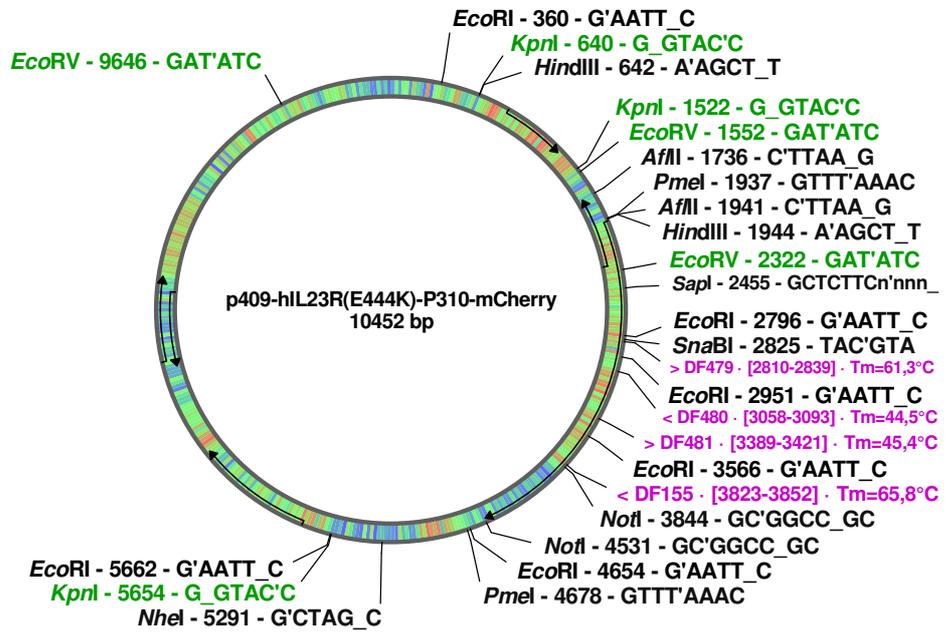
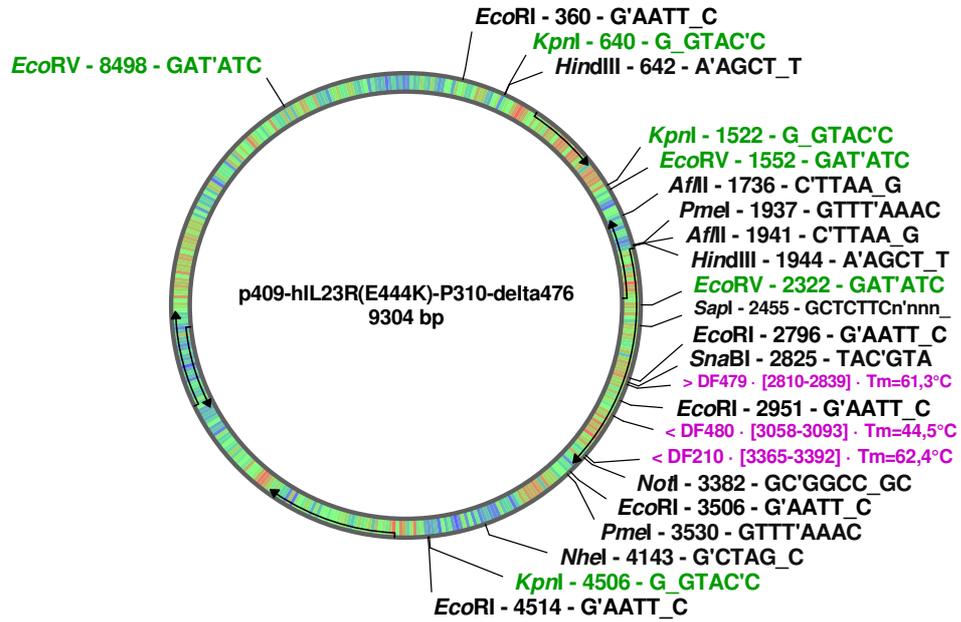
- promoting expansion of regulatory T cells. *Journal of Biological Chemistry* 2012; 287(43):36012–21.
208. Kim AR, Ulirsch JC, Wilmes S, Unal E, Moraga I, Karakukcu M, Yuan D, Kazerounian S, Abdulhay NJ, King DS, Gupta N, Gabriel SB, Lander ES, Patiroglu T, Ozcan A, Ozdemir MA, Garcia KC, Piehler J, Gazda HT, Klein DE, Sankaran VG. Functional Selectivity in Cytokine Signaling Revealed Through a Pathogenic EPO Mutation. *Cell* 2017; 168(6):1053-1064.e15.
209. Gorby C, Martinez-Fabregas J, Wilmes S, Moraga I. Mapping Determinants of Cytokine Signaling via Protein Engineering. *Frontiers in Immunology* 2018; 9:2143.
210. Matthews EE, Thévenin D, Rogers JM, Gotow L, Lira PD, Reiter LA, Brissette WH, Engelman DM. Thrombopoietin receptor activation: transmembrane helix dimerization, rotation, and allosteric modulation. *FASEB journal* 2011; 25(7):2234–44.
211. Fukada T, Hibi M, Yamanaka Y, Takahashi-Tezuka M, Fujitani Y, Yamaguchi T, Nakajima K, Hirano T. Two Signals Are Necessary for Cell Proliferation Induced by a Cytokine Receptor gp130: Involvement of STAT3 in Anti-Apoptosis. *Immunity* 1996; 5(5):449–60.
212. Niogret C, Birchmeier W, Guarda G. SHP-2 in Lymphocytes' Cytokine and Inhibitory Receptor Signaling. *Frontiers in Immunology* 2019; 10(2468).
213. Zou J, Presky DH, Wu CY, Gubler U. Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(9):6073–7.
214. Greiser JS, Stross C, Heinrich PC, Behrmann I, Hermanns HM. Orientational constraints of the gp130 intracellular juxtamembrane domain for signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(30):26959–65.
215. Giordano V, Falco G de, Chiari R, Quinto I, Pelicci PG, Bartholomew L, Delmastro P, Gadina M, Scala G. Shc mediates IL-6 signaling by interacting with gp130 and Jak2 kinase. *Journal of Immunology* 1997; 158(9):4097–103.
216. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007; 448(7152):484–7.

217. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24(2):179–89.
218. Ettinger A, Wittmann T. Fluorescence live cell imaging. *Methods in Cell Biology* 2014; (123):77–94.
219. Dal Cortivo G, Marino V, Iacobucci C, Vallone R, Arlt C, Rehkamp A, Sinz A, Dell'Orco D. Oligomeric state, hydrodynamic properties and target recognition of human Calcium and Integrin Binding protein 2 (CIB2). *Scientific Reports* 2019; 9(1):15058.
220. Giese APJ, Tang Y-Q, Sinha GP, Bowl MR, Goldring AC, Parker A, Freeman MJ, Brown SDM, Riazuddin S, Fettiplace R, Schafer WR, Frolenkov GI, Ahmed ZM. CIB2 interacts with TMC1 and TMC2 and is essential for mechanotransduction in auditory hair cells. *Nature Communications* 2017; 8(1):43.
221. Corey DP, Akyuz N, Holt JR. Function and Dysfunction of TMC Channels in Inner Ear Hair Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2019; 9(10):a033506.
222. Riazuddin S, Belyantseva IA, Giese APJ, Lee K, Indzhukulian AA, Nandamuri SP, Yousaf R, Sinha GP, Lee S, Terrell D, Hegde RS, Ali RA, Anwar S, Andrade-Elizondo PB, Sirmaci A, Parise LV, Basit S, Wali A, Ayub M, Ansar M, Ahmad W, Khan SN, Akram J, Tekin M, Riazuddin S, Cook T, Buschbeck EK, Frolenkov GI, Leal SM, Friedman TB, Ahmed ZM. Alterations of the CIB2 calcium- and integrin-binding protein cause Usher syndrome type 1J and nonsyndromic deafness DFNB48. *Nature Genetics* 2012; 44(11):1265–71.
223. Piston DW, Kremers G-J. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in Biochemical Sciences* 2007; 32(9):407–14.
224. Kim S-Y, Hakoshima T. GST Pull-Down Assay to Measure Complex Formations. *Methods in Molecular Biology* 2019; (1893):273–80.
225. Wang H, Ding S, Zhang Z, Wang L, You Y. Cationic micelle: A promising nanocarrier for gene delivery with high transfection efficiency. *The Journal of Gene Medicine* 2019; 21(7):e3101.
226. Hanazono Y, Yu JM, Dunbar CE, Emmons RV. Green fluorescent protein retroviral vectors: low titer and high recombination frequency suggest a selective disadvantage. *Human Gene Therapy* 1997; 20(11):1313–9.

227. Shcherbo D, Murphy CS, Ermakova GV, Solovieva EA, Chepurnykh TV, Shcheglov AS, Verkhusha VV, Pletnev VZ, Hazelwood KL, Roche PM, Lukyanov S, Zaraisky AG, Davidson MW, Chudakov DM. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochemical Journal* 2009; 418(3):567–74.
228. Shen Y, Chen Y, Wu J, Shaner NC, Campbell RE. Engineering of mCherry variants with long Stokes shift, red-shifted fluorescence, and low cytotoxicity. *PLOS One* 2017; 12(2):e0171257.
229. Kirchhausen T, Owen D, Harrison SC. Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2014; 6(5):a016725.
230. Cendrowski J, Mamińska A, Miaczynska M. Endocytic regulation of cytokine receptor signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2016; (32):63–73.
231. Elkin SR, Lakoduk AM, Schmid SL. Endocytic pathways and endosomal trafficking: a primer. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 2016; 166((7-8):196–204.
232. Mayor S, Parton RG, Donaldson JG. Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2014; 8(6):603–12.
233. Sun R, Hedl M, Abraham C. IL23 induces IL23R recycling and amplifies innate receptor-induced signalling and cytokines in human macrophages, and the IBD-protective IL23R R381Q variant modulates these outcomes. *Gut* 2020; 69(2):264–73.
234. Bixler SL, Sandler NG, Douek DC, Mattapallil JJ. Suppressed Th17 levels correlate with elevated PIAS3, SHP2, and SOCS3 expression in CD4 T cells during acute simian immunodeficiency virus infection. *Journal of Virology* 2013; 87(12):7093–101.

Anhang





Danksagung

Meine tiefe Dankbarkeit gebührt zunächst meinem Doktorvater Professor Dr. Jürgen Scheller. Durch sein umfangreiches biochemisches Wissen, seine scharfsinnigen Schlussfolgerungen sowie seine exzellente Leitung der Arbeitsgruppe Scheller hat er dieses Projekt ermöglicht.

Weiterhin bedanke ich mich aus tiefem Herzen bei meiner Betreuerin Frau Privatdozentin Dr. Manuela Floß. Ohne ihre fortwährende Supervision, ihre zuverlässige Betreuung und ihre bewundernswerten wissenschaftlichen Fähigkeiten wäre dieses Projekt nicht möglich gewesen.

Außerordentlich dankbar bin ich auch Frau Dr. Erika Engelowski. Ihre Bereitschaft dafür, ihre wissenschaftliche Erfahrung in freundlicher und geduldiger Weise mit mir zu teilen, hat diese Arbeit mitermöglicht.

Tiefer Dank gebührt zudem Herr Dr. Alexander Lang für seine ruhige, besonnene und kompetente Unterstützung. Dankeschön ebenfalls für das Buch „Haben und Sein“, über das ich noch heute gerne nachdenke!

Mein herzlicher Dank gilt weiterhin Frau Dr. Sofie Moßner. Auf ihre höfliche und kollegiale Art hat sie meine Augen für zahlreiche wissenschaftlich-technische Aspekte geöffnet und mir in vielerlei Hinsicht geholfen.

Ferner gilt mein Dank den weiteren, teils ehemaligen Mitgliedern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II, darunter Herrn Dr. Robin Polz, Herrn Dr. Manuel Franke, Frau Dr. Larissa Lamertz, Frau Dr. Nastaran Fazel Modares und Herrn Dr. Paul Baran für die kollegiale und gute Zusammenarbeit. Ebenfalls außerordentlich dankbar bin ich Frau Petra Oprée-Jeremic für ihr stets offenes Ohr und die freundliche Unterstützung, die sie so oft und gerne geleistet hat.

Mein Dank gilt weiterhin meinen Eltern Sofia und Volker Thives-Kurenbach. Ihre unerschütterliche Unterstützung hat mein Leben bis zu diesem Punkt ermöglicht. Dafür gebührt Ihnen meine tiefe und ehrliche Dankbarkeit. Genauso gilt mein Dank Celina Nüchel, die mit einem präzisen Blick diese Arbeit Korrektur gelesen hat und immer für mich da war. Auch den weiteren Mitgliedern meiner Familie, darunter meinen drei Schwestern, meinen Großeltern, meiner Tante und meinem Cousin, möchte ich meine Dankbarkeit für ihre Unterstützung aussprechen.