

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

Die funktionelle Homodimerisierung des IL-23R sowie weiterer Rezeptoren der
IL-12 Familie

Dissertation

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

vorgelegt von
Maximilian Mück
2023

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

gez.: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker, Dekan

Erstgutachter/in: Prof. Dr. Jürgen Scheller

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Marc Jacobsen

Wenn du nicht mehr weißt, wohin du gehen sollst, halte inne und schaue zurück, woher du gekommen bist.

-unbekannter Autor

Zusammenfassung dt.

Interleukine (IL) zählen zur Familie der Zytokine und vermitteln essenzielle immunomodulatorische Prozesse. Eine Fehlregulation der Interleukinspiegel kann zu Autoimmun- oder onkologischen Erkrankungen führen. IL-23 ist ein Interleukin der IL-12 Familie, welches aus den heterodimeren Untereinheiten p19 und p40 besteht und im Falle einer Fehlregulation unter anderem zu Erkrankungen wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Psoriasis oder Rheumatoider Arthritis führen kann. Die Bindung von IL-23 an den, ebenfalls durch IL-23R und IL-12R β 1 heterodimeren, IL-23 Rezeptorkomplex führt zu einer JAK/STAT-, MAPK/ERK- und PI3K/Akt-vermittelten Signaltransduktion.

Mitarbeiter der AG Scheller beobachteten bereits, dass der IL-23R neben der beschriebenen Heterodimerisierung mit IL-12R β 1 auch als Homodimer funktionelle Aktivität aufweist. Die vorliegende Arbeit baut auf diesen Beobachtungen auf und prüft in mehreren Ansätzen die Funktionalität solcher IL-23R Homodimere, welche die Beschreibung eines neuartigen Rezeptorkomplexes innerhalb der IL-12 Familie bedeuten würde. Hierfür wurden einerseits verschiedene synthetische Zytokinrezeptorvarianten generiert, in Ba/F3-gp130 Zellen eingebracht und analysiert. In diesen Rezeptoren wurden Anteile der extrazellulären Domäne des entsprechenden physiologischen Zytokinrezeptors durch GFP- oder mCherry-spezifische Einzeldomänenantikörper (VHH, *nanobodies*) ausgetauscht. Somit konnte mittels der entsprechenden synthetischen Liganden die Rezeptordimerisierung induziert und analysiert werden. Diese Analysen wurden zusätzlich auf den humanen IL-12R β 1 und IL-12R β 2 sowie den murinen IL-12R β 2 ausgeweitet. Andererseits wurden im Rahmen dieser Arbeit chimäre Rezeptorvarianten des IL-23R analysiert. Diese entsprachen extrazellulär dem IL-12R β 1 sowie intrazellulär dem IL-23R und vermittelten somit eine durch Homodimerisierung intrazellulärer Anteile des IL-23R induzierte Signaltransduktion.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die vorangegangenen Beobachtungen der Mitarbeiter der AG Scheller. Sowohl durch Analysen der synthetischen als auch der chimären Zytokinrezeptorvarianten konnte die funktionelle Aktivität von IL-23R Homodimeren nachgewiesen werden und somit dieser neuartige Rezeptorkomplex innerhalb der IL-12 Familie beschrieben werden. Ferner konnten für den humanen sowie murinen IL-12R β 2, durch Stimulation mit IL-12 oder dem entsprechenden synthetischen Liganden, ebenfalls funktionelle Homodimere nachgewiesen werden.

Summary

Interleukins belong to the cytokine family and mediate essential immunomodulatory processes. Therefore, dysregulations within interleukin signaling lead to autoimmune or oncological diseases. IL-23, a member of the IL-12 family, consists of the heterodimeric subunits p19 and p40. In case of misregulation, IL-23 can lead to diseases such as chronic inflammatory disease, psoriasis or rheumatoid arthritis. Binding of IL-23 to its heterodimeric receptor complex, consisting of IL-23R and IL-12R β 1, leads to JAK/STAT-, MAPK/ERK- and PI3K/Akt-signal transduction.

Collaborators from AG Scheller previously observed that IL-23R exhibits functional activity as a homodimer in addition to the described heterodimerization with IL-12R β 1. The present thesis examines the biological activity of such IL-23R homodimers in different experimental approaches. Thus, a new receptor complex within the IL-12 family could be confirmed.

Therefore, different synthetic cytokine receptors were generated, introduced into Ba/F3-gp130 cells and subsequently analyzed. In these receptors, portions of the extracellular domain of the corresponding physiological cytokine receptor were replaced by GFP- or mCherry-specific single domain antibodies. Consequently, a possible receptor dimerization could be analyzed using the corresponding synthetic ligands. These analyses were additionally extended to human IL-12R β 1 and IL-12R β 2 as well as murine IL-12R β 2. Apart from that chimeric IL-23R variants have been investigated. These corresponded extracellularly to IL-12R β 1 and intracellularly to IL-23R and thus mediated signal transduction induced by homodimerization of intracellular portions of IL-23R.

The results of this thesis confirm the previously mentioned observations of collaborators from AG Scheller. Analyses of both synthetic and chimeric cytokine receptor variants demonstrated the functional activity of IL-23R homodimers and thus described this novel receptor complex within the IL-12 family. Besides functional homodimers of human and murine IL-12R β 2 could also be detected for human as well as murine IL-12R β 2 by stimulation with IL-12 or the corresponding synthetic ligand.

Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen und Bezeichnungen von chemischen Molekülen, Elementen, Enzymen und Aminosäuren entsprechen den Nomenklaturen der IUBMB und IUPAC und werden daher nicht explizit genannt. Ebenfalls werden weder international gängige SI-Einheiten als auch gebräuchliche Nicht-SI-Einheiten explizit aufgeführt.

Abb.	Abbildung	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ad	bis zu einem Endvolumen von	EAE	<i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
AG	Arbeitsgruppe	EBI3	<i>Epstein-Barr virus induced gene 3</i>
AK	Antikörper	ECD	extrazelluläre Domäne
AKT	Proteinkinase B	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Amp	Ampicillin	eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
AP	Alkalische Phosphatase	ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
APC	antigenpräsentierende Zelle	Epo(R)	Erythropoetin (Rezeptor)
APS	Ammoniumpersulfat	ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
AS	Aminosäure(n)	et al.	<i>et aliae/ et alii</i>
BCA	Bicinchoninsäure	FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
bp	Basenpaar(e)	FasR	Fas-Rezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin	FCS	Fetales Kälberserum
bzw.	beziehungsweise	FN (III)	Fibronektin (Typ III)
ca.	circa	Fp	Fusionsprotein
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>	fwd	<i>forward</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>	GFP	<i>green fluorescent protein</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung	GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>	gp 130	Glykoprotein 130
CSF	<i>colony stimulating factor</i>	G_{vHH}	GFP-nanobody
CU	<i>Colitis ulcerosa</i>	h	human
C_{vHH}	mCherry nanobody	H₂O_{dd}	Zweifach destilliertes Wasser
D 1/2/3	Domäne 1/2/3	HEK293	<i>human embryonic kidney cell line</i>
DC	<i>dendritic cell</i>	HEK293T	<i>human embryonic kidney cell line; mit Expression des SV40 large T-antigen</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	HhIL-12	humanes Hyper-Interleukin 12
DNA	Desoxyribonukleinsäure	HmIL-12	murines Hyper-Interleukin 12
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	HmIL-23	murines Hyper-Interleukin 23

Abkürzungsverzeichnis

HIL-6	Hyper-Interleukin 6	pSTAT3	<i>phospho</i> -STAT3
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>	puro	Puromycin
hygro	Hygromycin B	PVDF	Polyvinylidenfluorid
ICD	intrazelluläre Domäne	R	Rezeptor
IFNγ	Interferon gamma	RA	Rheumatoide Arthritis
Ig	Immunglobulin	rev	<i>reverse</i>
IL	Interleukin	RNA	Ribonukleinsäure
IL-12Rβ1	Interleukin-12-Rezeptor beta 1	RNase	Ribonuklease
IL-12Rβ2	Interleukin-12-Rezeptor beta 2	rpm	<i>rounds per minute</i>
IL-23R	Interleukin-23-Rezeptor	RT	Raumtemperatur
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor	s.o.	siehe oben
<i>in vivo</i>	am lebenden Objekt (beobachtet oder durchgeführt)	s.u.	siehe unten
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>	SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
JAK	Januskinase	SI	<i>Système international d'unités</i>
k.A.	keine Angabe	SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
Kan	Kanamycin	SP	Signalpeptid
kb	Kilobase(n)	STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
kDa	Kilodalton	SyCyR	<i>synthetic cytokine receptor</i>
kond.	konditioniert	TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA</i>
LB	Luria-Bertani	TBS	<i>Tris buffered saline</i>
m	murin	TBS-T	<i>Tris buffered saline with Tween[®] 20</i>
mAb	monoklonaler Antikörper	TEMED	Tetramethylethylendiamin
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>	T_H-Zellen	T-Helferzellen
MC	<i>Morbus Crohn</i>	TMD	Transmembrandomäne
MS	Multiple Sklerose	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
nb	<i>nanobody</i>	TTP	thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura
NK-Zelle	natürliche Killerzelle	Tyk	Tyrosinkinase
PAA	Polyacrylamid	U	Units: Enzymeinheit oder Internationale Einheit
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>	UV	ultraviolett
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion	VHH	Einzelomänenantikörper, <i>nanobody</i>
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>	<i>well</i>	Vertiefung einer 6/96- <i>well</i> -Zellkulturschale
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	WSX-1	<i>WSXWS type I cytokine receptor</i>
POD	Peroxidase	WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 DIE ROLLE VON INTERLEUKINEN IM IMMUNSYSTEM.....	1
1.1.1 Die IL-12 Zytokinfamilie.....	1
1.1.2 Struktur und Funktion von IL-12 und IL-23.....	3
1.2 SYNTHETISCHE ZYTOKINREZEPTOREN.....	6
1.2.1 Synthetische Biologie.....	6
1.2.2 Nanobodies in der synthetischen Biologie.....	6
1.2.3 Chimäre Zytokinrezeptoren.....	8
1.3 ZIELE DER ARBEIT.....	10
2 MATERIAL UND METHODEN	12
2.1 MATERIAL.....	12
2.1.1 Antibiotika.....	12
2.1.2 Antikörper.....	12
2.1.3 Chemikalien.....	14
2.1.4 Geräte und Kits.....	15
2.1.5 Kulturmedien.....	17
2.1.6 Plasmide und Oligonukleotide.....	17
2.1.7 Puffer und Lösungen.....	18
2.1.8 Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.9 Zelllinien und Bakterienstämme.....	21
2.1.10 Zytokine und rekombinante Proteine.....	21
2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	23
2.2.1 Bakterientransformation.....	23
2.2.2 Präparation der Plasmid-DNA.....	23
2.2.3 Restriktive Spaltung von Plasmid-DNA.....	24
2.2.4 Agarosegelelektrophorese und -extraktion.....	25
2.2.5 Dephosphorylierung der 5'-Enden von Plasmid-DNA-Vektoren.....	25
2.2.6 Phosphorylierung von DNA.....	26
2.2.7 Klenow-Behandlung von pMOWS-Vektoren.....	26
2.2.8 Ligation der Plasmid-DNA.....	26
2.2.9 Polymerasekettenreaktion.....	27
2.2.10 Sequenzierung der Plasmid-DNA.....	29
2.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	29

2.3.1 Zellkultivierung.....	29
2.3.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	29
2.3.3 Retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen.....	30
2.3.4 Durchflusszytometrie.....	30
2.3.5 Analyse der Zellviabilität.....	31
2.3.6 Stimulationsassay.....	32
2.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	32
2.4.1 Herstellung von Zelllysaten.....	32
2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten.....	33
2.4.3 Western Blot.....	33
3 ERGEBNISSE.....	36
3.1 DER HUMANE IL-23R BILDET FUNKTIONELL AKTIVE HOMODIMERE.....	36
3.2 SYNTHETISCHE ZYTOKINREZEPTOREN INDUZIEREN DIE HOMODIMERISIERUNG VON REZEPTOREN DER IL-12 ZYTOKINFAMILIE.....	37
3.2.1 Generierung der SyCyRs.....	37
3.2.2 Erzeugung stabiler Ba/F3-gp130-SyCyR Zelllinien.....	47
3.2.3 Ba/F3-gp130 Zellen mit den synthetischen Zytokinrezeptoren sind funktionell aktiv	51
3.3 CHIMÄRE ZYTOKINREZEPTOREN VERDEUTLICHEN DIE HOMODIMERISIERUNG DES IL-23R	65
3.3.1 Expressionsanalyse chimärer Rezeptorvarianten mittels Durchflusszytometrie	66
3.3.2 Chimäre mIL-23-Rezeptoren sind funktionell aktiv.....	68
4 DISKUSSION.....	72
4.1 SYNTHETISCHE ZYTOKINREZEPTOREN SIND FUNKTIONELL AKTIV.....	72
4.2 DER IL-23R BILDET FUNKTIONELL AKTIVE HOMODIMERE.....	73
4.3 DER IL-12R β 2 BILDET FUNKTIONELL AKTIVE HOMODIMERE.....	77
4.4 DER IL-12R β 1 BILDET KEINE FUNKTIONELL AKTIVEN HOMODIMERE.....	79
4.5 SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	82
5 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS.....	84
6 ANHANG.....	94
6.1 VEKTORKARTEN.....	94

1 Einleitung

1.1 Die Rolle von Interleukinen im Immunsystem

Interleukine zählen zu der Familie der Zytokine und sind Proteine, welche Zelldifferenzierung und -proliferation sowie Immunomodulation vermitteln und im Gegensatz zu Hormonen statt von einem spezifischen von unterschiedlichen Zelltypen sezerniert werden (1,2). Sie wirken vorrangig lokal auto-, para- und juxtakrin, können allerdings auch systemisch über endokrine Signalweiterleitung ihre Wirkung entfalten (3–5). Im Krankheitsfall werden vermehrt Zytokine ausgeschüttet und führen so zu meist proinflammatorischen, immunomodulatorischen Effekten (6). Pathologisch erhöhte Interleukinspiegel können zu Autoimmunerkrankungen führen, welche wiederum durch Einsatz von zytokinspezifischen Therapeutika behandelt werden können (7). Gegenstand aktueller Forschung ist daher die Weiterentwicklung vorhandener spezifischer Therapeutika sowie das Etablieren neuer therapeutischer Ansatzmöglichkeiten.

1.1.1 Die IL-12 Zytokinfamilie

Die Interleukin-12 Familie setzt sich aus verschiedenen Heterodimeren (IL-12, IL-23, IL-27, IL-35, IL-39) zusammen, die allesamt aus einer, den Zytokinen der IL-6 Familie entsprechenden, α - und einer, den löslichen Klasse-I Zytokinrezeptoren (Hämatopoetin-Familie) ähnlichen, β -Untereinheit bestehen. Die α -Untereinheiten werden von IL-12p35, IL-23p19 oder IL-27p28 gebildet, während als β -Untereinheiten p40 oder das *Epstein-Barr virus induced gene 3* (EBI3) fungieren (8). Die Rezeptoren der IL-12 Familie sind ebenfalls heterodimer aufgebaut und umfassen den Interleukin-12 Rezeptor beta 1 (IL-12R β 1), Interleukin-12 Rezeptor beta 2 (IL-12R β 2), Interleukin-23 Rezeptor (IL-23R), *WSXWS type I cytokine receptor* (WSX-1) und das Glykoprotein 130 (gp130) (9). Die Ligandenbindung erfolgt entsprechend dem „*site 1-2-3 model*“, wobei *site 1* der Interaktion der α - und β -Untereinheit des jeweiligen Zytokins entspricht. *Site 2* beschreibt die Bindung der sogenannten *cytokine-binding homology region* (CHR) des hochaffin bindenden, keine N-terminale Ig-Domäne aufweisenden, Rezeptors mit der β -Zytokinuntereinheit. *Site 3* hingegen spiegelt die Bindungsstelle des niederaffinen Rezeptors, welcher eine N-terminale Ig-Domäne aufweist, mit der α -Untereinheit des Zytokins wider (10). Die nach Ligandenbindung erfolgende Signaltransduktion wird durch Januskinasen- (JAKs), *signal transducers and activators of transcription*- (STAT), *mitogen-activated protein kinase*- (MAPK) sowie *phosphoinositide 3 kinase*- (PI3K) *protein kinase b*- (Akt) Signalwege vermittelt, da die Rezeptoren der IL-12 Familie keine eigenständige

intrinsische Aktivität besitzen (8,11). In Abb. 1 erfolgt eine schematische Darstellung von IL-12 und IL-23 mit ihrem jeweiligen Rezeptorkomplex.

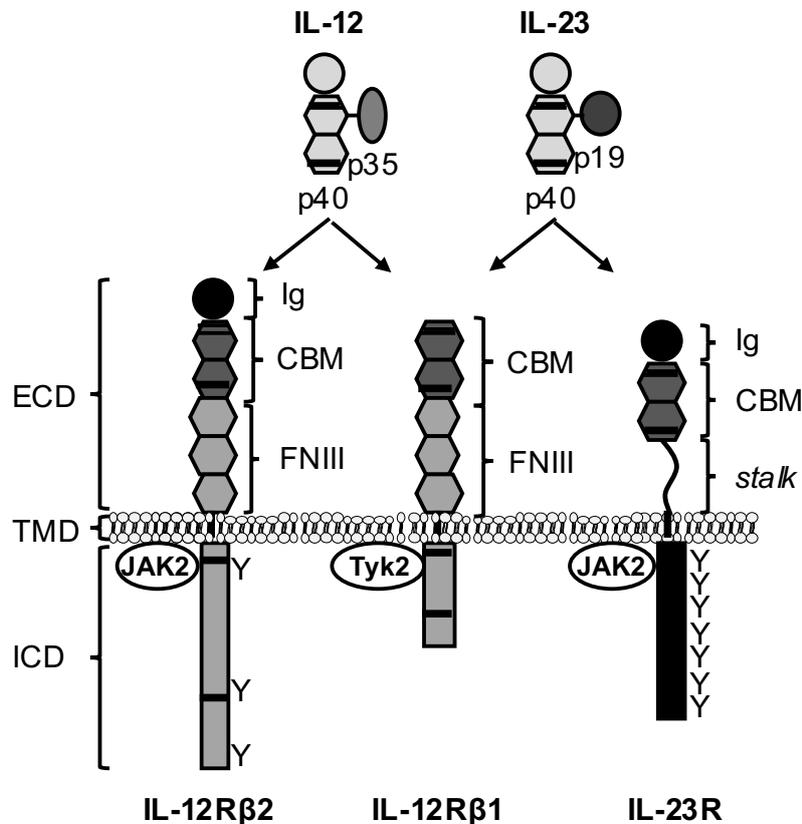


Abb. 1: Schematische Darstellung der humanen IL-12 und IL-23 Rezeptorkomplexe. IL-12 und IL-23 sind heterodimere Proteine bestehend aus IL-12p40 und IL-12p35 (IL-12) sowie IL-12p40 und IL-23p19 (IL-23). Die jeweiligen Untereinheiten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Der humane IL-12 Rezeptorkomplex wird durch den IL-12Rβ1 und IL-12Rβ2, der humane IL-23 Rezeptorkomplex hingegen durch den IL-12Rβ1 und IL-23R gebildet. Jeder der drei verschiedenen Rezeptoren besteht aus einer intrazellulären Domäne (ICD) und einer für die Ligandenbindung verantwortlichen extrazellulären Domäne (ECD), welche über eine Transmembrandomäne (TMD) verbunden sind. Die ICD des IL-12Rβ2 ist mit der Januskinase 2 (JAK2) assoziiert, weist Box1/2-Motive (schwarze Querstriche) auf und besitzt 3 Tyrosinreste (Y), welche die Signaltransduktion vermitteln. Über die TMD ist sie mit der ECD verbunden, welche beim IL-23R aus einer *cytokine binding modules*-Region (CBM) und einer Immunglobulin- (Ig) ähnlichen Domäne aufgebaut ist. Beim IL-12Rβ2 liegt hier zusätzlich eine aus 5 Fibronectin Typ III (FNIII) aufgebaute Region vor. Die ECD des IL-12Rβ1 ähnelt der des IL-12Rβ2 bis auf die fehlende Ig-Domäne. Die ICD des IL-12Rβ1 weist ebenfalls Box1/2-Motive auf und ist mit der Tyrosinkinase 2 (Tyk2) assoziiert. Die ICD des IL-23R ist, der des IL-12Rβ2 entsprechend, mit der JAK2 assoziiert und weist 7, zum Teil für das *signaling* relevante, Tyrosinreste auf. Die ECD des IL-23R wird durch die *stalk*-Region, zwei FNIII- sowie einer Ig-ähnlichen Domäne gebildet. Modifiziert nach Floss *et al.* 2020 (12).

Interleukine spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese verschiedener immunologisch vermittelter Erkrankungen wie beispielsweise Allergien, Asthma und Autoimmunerkrankungen sowie in der Entstehung maligner Neoplasien (13). Innerhalb der IL-12 Familie lassen sich große funktionelle Unterschiede erkennen. IL-12 sowie IL-23 wirken mittels Stimulation der T-Helfer (T_H-) -1 bzw. -17 Zelldifferenzierung proinflammatorisch, wohingegen IL-35 und IL-39 antiinflammatorische Wirkungen nach Sekretion durch B- (bzw. für IL-35 zusätzlichen durch T-) Zellen entfaltet. Interleukin-27 weist sowohl

immunsuppressive als auch proinflammatorische Wirkungen auf (14). Ferner wurden in Tiermodellen antitumoröse Effekte von IL-27 beschrieben (15).

Die Etablierung neuartiger interleukinspezifischer Therapiemöglichkeiten ist anspruchsvoll, da bei starker immunomodulatorischer Wirkung weiterhin ein ausreichender Schutz gegen pathogene Erreger und maligne Neoplasien gewährleistet bleiben muss (16).

1.1.2 Struktur und Funktion von IL-12 und IL-23

Interleukin 12

IL-12 ist ein Heterodimer bestehend aus einer p35- (α -Untereinheit; 35 kDa) und einer p40-Untereinheit (β -Untereinheit; 40 kDa) (13). Durch Koexpression der beiden auf unterschiedlichen Chromosomen liegenden Untereinheiten entsteht, mittels Disulfidbrückenbindung, das funktionell aktive Heterodimer IL-12p70 (8,9). Der IL-12-Rezeptorkomplex ist ebenfalls heterodimer aufgebaut und besteht aus dem IL-12R β 1 sowie dem IL-12R β 2 (17). Beide Rezeptoranteile weisen extrazellulär 5 Fibronectin-Typ-III (FNIII) Domänen auf, von denen jeweils 2 die *cytokine-binding homology region* bilden (18). Die p35-Untereinheit bindet den, für die Signaltransduktion verantwortlichen IL-12R β 2, während die p40-Untereinheit mit dem IL-12R β 1 interagiert, welcher hauptsächlich für die Ligandenbindung eine entscheidende Rolle spielt (19,20). Hierbei kommt es an der *site 2* Interaktionsstelle interessanterweise, anders als bei der IL-6R Familie, zur direkten und ausschließlichen Interaktion zwischen einem negativ geladenen Anteil des IL-12R β 1 und einem positiv geladenen Anteil von p40. Der IL-12R β 1 interagiert somit nicht mit der α -Untereinheit des Zytokins (21).

Erst die Affinitätssteigerung durch Bildung des aktiven Heterodimers IL-12p70 ermöglicht die Interaktion von IL-12 mit seinem Rezeptorkomplex (22). Diese führt mittels Transphosphorylierung der, mit dem IL-12R β 2 assoziierten, Januskinase 2 (JAK2) zur STAT- (vorrangig STAT4) vermittelten Signaltransduktion, welche unter anderem eine ausgeprägte Interferon gamma- ($\text{IFN}\gamma$) Sekretion induziert (23,24). Dieser Anstieg der $\text{IFN}\gamma$ -Spiegel aktiviert zusätzlich den MAPK/ERK Signalweg, der zu einer Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren ERK1/2 führt (25).

IL-12 wird in Phasen erhöhter Inflammation unter anderem durch verschiedene phagozytische Zellen sowie B-Zellen und andere Antigen präsentierende Zellen (APCs) sezerniert. Dies führt wiederum über die Stimulation der Proliferation von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und CD4^+ - $\text{T}_{\text{H}}1$ -Zellen zu erhöhten $\text{IFN}\gamma$ -Konzentrationen. $\text{IFN}\gamma$

induziert im Sinne eines positiven Feedbackloops eine vermehrte IL-12-Sekretion, welche wiederum die Differenzierung von naiven T- zu T_H1-Zellen entscheidend steigert (26).

Wichtige Funktionen von IL-12 stellen die indirekte antimikrobielle, antiparasitäre sowie antitumoröse Aktivität dar, die unter anderem auf die IL-12 vermittelte Stimulation von Makrophagen und erhöhte IFN-Spiegel zurückzuführen ist (13,27). Im Rahmen einer Studie wurden sogenannte IL-12 *knockout*-Mäuse generiert, welche entweder kein IL-12p35, IL-12p40 oder IL-12Rβ1 aufwiesen. Die daraus resultierende, verminderte T_H1-Zelldifferenzierung und Aktivität der NK-Zellen sowie die verminderten IFNγ- und IL-12-Konzentrationen führten zu einer nachweislich erhöhten Anfälligkeit gegenüber intrazellulären und gering pathogenen mikrobiellen Erregern sowie der *experimental autoimmune encephalomyelitis* (EAE), die als experimentelles Modell zur Erforschung der Encephalomyelitis disseminata bzw. Multiple Sklerose (MS) dient (1,13). Eine IL-12-Dysregulation kann außerdem für das Auftreten von Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) verantwortlich sein, welche zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) zählen (28). Zu weiteren IL-12 bedingten Autoimmunerkrankungen zählen noch die Psoriasis sowie die Rheumatoide Arthritis (RA) (29,30).

Interleukin 23

IL-23 ist ein Heterodimer bestehend aus der bereits genannten p40- (β) und einer p19-Untereinheit (α; 19 kDa), die ebenfalls mittels Disulfidbrückenbindung miteinander verbunden sind (31). Aufgrund der strukturellen Homologie zu IL-12 enthält der IL-23 Rezeptorkomplex ebenfalls den p40-spezifischen IL-12Rβ1. Dieser bildet zusammen mit dem IL-23R, welcher mit der p19-Untereinheit interagiert, den funktionell aktiven, heterodimeren IL-23 Rezeptorkomplex (32). Ein Alleinstellungsmerkmal des IL-23R im Vergleich zu den übrigen Rezeptoren der IL-12 Familie stellt die beim humanen IL-23R aus 37 Aminosäuren (AS) und beim murinen IL-23R aus 36 AS bestehende *stalk region* dar, welche anstelle der drei membrannahen FNIII-Domänen vorliegt. Diese dient dem Rezeptor als Abstandshalter, um die optimale Entfernung der *cytokine-binding homology region* des IL-23R zur Membran zu gewährleisten (33). Analog zum IL-12Rβ2 besitzt der IL-23R eine N-terminale Ig-ähnliche Domäne und vermittelt somit die *site 3* Zytokinrezeptorbindung (12). Nach Ligandenbindung erfolgt die Signalweiterleitung vorrangig durch Phosphorylierung der IL-23R assoziierten und obligaten JAK2 und der daraus resultierenden STAT-Phosphorylierung (vorrangig STAT3) (34). Zur Signaltransduktion wird jedoch eine weitere Kinase, Tyk2, benötigt. Diese konnte in

verschiedenen Funktionsanalysen jedoch, anders als die obligate JAK2, gegen andere Kinasen ausgetauscht werden (35).

Als negative Regulatoren der IL-23 induzierten Signaltransduktion dienen sogenannte *suppressor of cytokine signaling* (SOCS), wobei für den IL-23R insbesondere SOCS3 die Regulation vermittelt. SOCS3 vermindert die STAT3-Phosphorylierung und somit die weitere intrazelluläre Signaltransduktion (36). Interessanterweise wurde allerdings in einzelnen, neueren Studien am IL-23R keine negative Regulation der Signaltransduktion durch SOCS3 beobachtet (37,38). Zukünftig sind weitere spezifische Analysen zur Klärung dieser Fragestellung nötig.

IL-23 wird nach Kontakt mit pathogenen Erregern unter anderem von B-Zellen, dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen, kurzum *antigen presenting cells* (APCs), sezerniert (39). Anders als IL-12 ist IL-23 vorrangig an der CD4⁺-T_H17-Zelldifferenzierung beteiligt. Hierbei ist es wichtig, zwischen physiologisch und pathogen wirkenden T_H17-Zellen zu unterscheiden, da IL-23 vermehrt die Reifung und Aufrechterhaltung des pathogenen Zelltyps induziert, welcher unter anderem mit erhöhten IL-17-, Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierenden Faktor- (GM-CSF) und IFN γ -Spiegeln einhergeht (40). Durch IL-23 wird ferner die antiinflammatorisch wirkende IL-10-Sekretion der T_H17-Zellen vermindert, sodass die zuvor beschriebenen pro-inflammatorischen Wirkungen umso stärker überwiegen (41).

Der Einsatz von IL-17 blockierenden monoklonalen Antikörpern (Secukinumab und Ixekizumab als direkte IL-17-Antagonisten und Brodalumab als IL-17R-Antagonist) führte im Rahmen von Studien zu positiven gesundheitlichen Effekten bei an RA, Psoriasis oder der ankylosierenden Spondylarthritis erkrankten Patienten. Durch die so erfolgte Immunsuppression kam es allerdings ebenfalls zu vermehrter Anfälligkeit gegenüber Mykosen (42). Dies verdeutlicht die Komplexität der Regulation der IL-23/T_H17-Immunachse, welche durch fortschreitende Forschung besser verstanden werden kann.

Im Falle einer Dysregulation der IL-23-Sekretion können vermehrte Inflammationsreaktionen in IL-23 produzierenden Geweben zu Autoimmunerkrankungen wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, RA, Psoriasis oder MS führen (12). Weiterhin weist IL-23 interessanterweise sowohl pro- (vorrangig in inflammationsinduzierten Neoplasien) als auch antitumoröse Wirkungen auf und unterscheidet sich diesbezüglich klar von IL-12 (27).

Therapeutische Möglichkeiten für IL-23 induzierte Erkrankungen stellen unter anderem monoklonale Antikörper dar. Da Antikörper, wie beispielsweise der humane monoklonale Antikörper Ustekinumab, der gegen die p40-Untereinheit gerichtet ist, sowohl hemmend auf IL-12 als auch IL-23 wirken, werden aktuell spezifischere Therapeutika und deren

Wirkungsweise bei Kombination untereinander erforscht (43,44). Dies ist zudem notwendig, da Patienten oftmals entweder initial nicht auf die Therapie mit monoklonalen Antikörpern ansprechen oder nach deren primär erfolgreichem Einsatz einen Wirkverlust entwickeln (45). Wichtige anti-IL-23p19 und somit IL-23-spezifische monoklonale Antikörper sind beispielsweise Guselkumab und Tildrakizumab, welche gute Wirksamkeiten bei fortgeschrittener Psoriasis aufweisen (46). Weitere Therapiemöglichkeiten stellen unter anderem intrazellulär ansetzende Therapeutika wie beispielsweise Januskinaseinhibitoren dar, die vor allem in der Therapie der fortgeschrittenen RA erfolgreich eingesetzt werden (47). Die Kombination aus extra- und intrazellulär ansetzenden Therapeutika verspricht noch größere Therapieerfolge. Ein tiefgreifenderes Verständnis der strukturellen Zusammenhänge innerhalb der Signaltransduktion der Interleukine ermöglicht außerdem die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten und ist Gegenstand aktueller Forschung (12).

1.2 Synthetische Zytokinrezeptoren

1.2.1 Synthetische Biologie

Die synthetische Biologie basiert auf der Kombination von Zell- und Molekularbiologie und ermöglicht neuartige Analysemethoden verschiedener zellulärer Prozesse sowie eine gezielte Generierung und Beeinflussung zellulärer Strukturen und Stoffwechselprozesse (48,49). Bereits seit den 90er Jahren wurden synthetische Zytokinrezeptoren generiert, welche vorerst allerdings nur *in vitro* eingesetzt werden konnten (50). Heutzutage sind synthetische Rezeptoren, beispielsweise sogenannte *chimeric antigen receptors* (CAR) bereits als Therapiemöglichkeit gegen bestimmte maligne B-Zell-Neoplasien zugelassen (51). Hierbei werden CARs mit dem für die jeweilige Neoplasie spezifischen Antikörper in T-Zellen eingebracht, sodass die so generierten CAR-T-Zellen maligne Neoplasien, Neoantigene oder tumorassoziierte Antigene detektieren und eliminieren können (52).

1.2.2 Nanobodies in der synthetischen Biologie

Camelide und Haie besitzen spezifische Antikörper, die ausschließlich aus schweren Ketten bestehen. Die variablen, Antigen-bindenden Domänen dieser spezifischen Antikörper bestehen ausschließlich aus einer Einzeldomäne und werden als *nanobodies* (nbs) bezeichnet. Im Falle der Cameliden handelt es sich hierbei um die *antigen-binding variable domain of camelid heavy-chain antibodies* (VHHs) und im Falle der Haie um die *antigen-binding variable domain of shark new antigen receptor* (VNARs) (53,54). *Nanobodies* besitzen vielfältige

Einsatzmöglichkeiten und zeichnen sich, trotz der geringen Molekülmasse, durch eine hohe Spezifität und Stabilität aus (55). Diese kann durch das Anbringen weiterer *tags* an die VHHs zusätzlich verbessert werden (56). Ferner weisen sie im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern eine bessere Gewebegängigkeit auf und unterstreichen so zusätzlich ihr großes Potential hinsichtlich hochspezifischer Therapiemöglichkeiten (53,57).

VHHs wurden unter anderem in der Grundlagenforschung als Teil von synthetischen Zytokinrezeptoren zur besseren Analyse der Signaltransduktion eingesetzt. Hierfür wurden die extrazellulären Domänen von Zytokinrezeptoren gegen VHHs ausgetauscht (siehe Abb. 2) und anschließend die Zytokin-spezifische Signalweiterleitung nach Stimulation mit den entsprechenden synthetischen Liganden untersucht (37). Wie in Abb. 2 dargestellt, wurden bei den erzeugten synthetischen Zytokinrezeptoren (SyCyRs) Teile der extrazellulären Domänen entweder gegen GFP_{VHH} oder mCherry_{VHH} ausgetauscht. Eine Signaltransduktion der intrazellulär unveränderten Zytokinrezeptoren kann auf diese Weise durch spezifische synthetische Liganden stimuliert und anschließend untersucht werden. Das 2xGFP-Fusionsprotein (Dimer des *green fluorescent protein*) wurde als Ligand für GFP_{VHH} und das 2xmCherry-Fusionsprotein (Dimer des fluoreszenten mCherry-Proteins) als Ligand für mCherry_{VHH} eingesetzt.

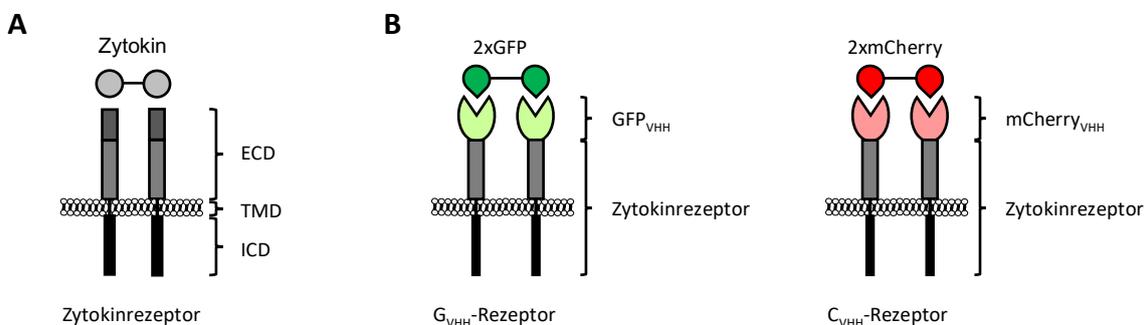


Abb. 2: Schematische Darstellung von synthetischen Zytokinrezeptoren am Beispiel eines Klasse-I Zytokinrezeptors. **A** Ein Klasse-I Zytokinrezeptor besteht aus einer intrazellulären Domäne (ICD), einer Transmembrandomäne (TMD) sowie einer extrazellulären Domäne (ECD). Die Bindung des Zytokins erfolgt über Anteile der extrazellulären Domäne und induziert die intrazelluläre Signaltransduktion. **B** Es kommen sowohl der mit GFP_{VHH} modifizierte Zytokinrezeptor (G_{VHH}-Rezeptor) samt spezifischem Liganden (2xGFP-Fusionsprotein), als auch der mit mCherry_{VHH} modifizierte Zytokinrezeptor (C_{VHH}-Rezeptor) samt spezifischem Liganden (2xmCherry-Fusionsprotein) zur Darstellung. In beiden Rezeptorvarianten wurden sowohl die intrazelluläre Domäne und die Transmembrandomäne als auch 15 Aminosäuren der extrazellulären Domäne des entsprechenden physiologischen Zytokinrezeptors unverändert belassen. Der restliche Teil des Rezeptors wurde jeweils durch den spezifischen *nanobody* ausgetauscht. Modifiziert nach Engelowski *et al.* 2018 (37).

Ein heutzutage gängiges diagnostisches Verfahren in der Onkologie, die Bestimmung des *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) bei Brustkrebspatienten, beruht bereits auf dem Einsatz von *nanobodies* und ermöglicht spezifischere, personalisierte Therapieschemata (58,59). Ein weiteres therapeutisches Einsatzgebiet von VHHs stellt die Behandlung der

thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP) mit dem *nanobody* Caplacizumab dar (60). Im Rahmen von Studien werden derzeit mittels *nanobodies* unter anderem auch in der Behandlung der Arteriosklerose vielversprechende Ergebnisse erzielt (61).

Im Laufe der Zeit wurden *nanobodies* mit hoher Affinität zu fluoreszierenden Proteinen wie dem *green fluorescent protein* (GFP) oder dem rot fluoreszierenden Protein mCherry generiert (62). Als Biosensor genutzte fluoreszierende Proteine werden in spezifische Bereiche der Erbinformation bestimmter Zellen eingebracht, sodass ein Einblick in die biochemischen Prozesse von Zellen und ganzer Organismen möglich wird (63). GFP wurde bereits in den frühen 60er Jahren entdeckt und vor allem für die Untersuchung der Genexpression genutzt (64). Durch den Einsatz von GFP-spezifischen *nanobodies* (GFP_{VHH}) lassen sich mittlerweile in zahlreichen verschiedenen Zelltypen und Organismen zuverlässig Protein-Protein Interaktionen nachweisen (65). Ferner werden therapeutisch einsetzbare, vollständig synthetische GFP_{VHH}-Zytokinrezeptoren untersucht. Der synthetische Notch Rezeptor (synNotch), mit einer gegen GFP_{VHH} ausgetauschten extrazellulären Domäne, ist eines der nennenswerten Beispiele hierfür (66). In murinen Modellen konnte der synNotch immunologische Prozesse wie vermehrte T-Zelldifferenzierung und -toxizität sowie die Sekretion verschiedener Immunregulatoren wie beispielsweise Interleukine induzieren (67). Ein entscheidender Vorteil therapeutisch genutzter synthetischer Rezeptoren begründet sich in deren hochspezifischer Aktivierung. Da nicht-physiologisch vorkommende Liganden wie beispielsweise fluoreszierende Proteine hierfür genutzt werden, können unerwünschte Nebenwirkungen vermindert werden (68). Gleichzeitig können die genutzten Liganden, wie beispielsweise GFP, selbst allerdings auch unerwünschte immunologische Reaktion hervorrufen (69). Fortschreitende Forschung auf diesem Gebiet verbessert die Generierung sicherer und effizienter therapeutischer Ansätze.

1.2.3 Chimäre Zytokinrezeptoren

Als chimär werden Organismen bezeichnet, welche aus genetisch verschiedenen Anteilen bestehen. Chimäre Mäuse, in die artifiziell humangenetische Eigenschaften eingebracht wurden, sind fest etablierte Bestandteile moderner biomedizinischer Forschung (70). Durch Anwendung dieses Prinzips auf Rezeptorebene wurden bereits 1996 chimäre gp130 Zytokinrezeptoren erzeugt, die in ihrem extrazellulären Anteil durch Erythropoetin- (EPO) Rezeptoren (EpoR) ausgetauscht wurden. Somit konnte eine gp130-vermittelte Signaltransduktion durch Stimulation mit EPO induziert werden (71). Eine Erweiterung dieses Systems stellt die Verbindung der extrazellulären Domäne solcher Rezeptoren mit

Bindungsstellen für synthetische Liganden dar, um genauere Analysen, beispielsweise ohne Beeinflussung durch endogene EPO-Sekretion, zu gewährleisten (72). Auf diesem Prinzip basieren die in Abschnitt 1.2.2 beschriebenen synthetischen Zytokinrezeptoren. Ferner ermöglicht dies einen Einblick in das therapeutische Potential solcher artifiziell steuerbaren Systeme.

Die analytischen Möglichkeiten von chimären Zytokinrezeptoren sind vielfältig. Floss *et al.* konnten beispielsweise durch chimäre Zytokinrezeptoren der IL-12 Familie unter anderem die funktionelle Aktivität zuvor postulierter möglicher IL-35 und IL-39 Rezeptorkomplexe nachweisen ohne durch die Problematik der generell verminderten biologischen Aktivität von rekombinantem IL-35 und IL-39 eingeschränkt zu werden (73).

In Abb. 3 wird der strukturelle Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten chimären Zytokinrezeptors IL-12R β 1_{EZ}-IL-23R_{IZ} dargestellt, welcher extrazellulär durch den IL-12R β 1 gebildet wird, bei intrazellulär ausschließlich vorkommenden IL-23R Anteilen, die bei Rezeptorinteraktion homodimerisieren (73).

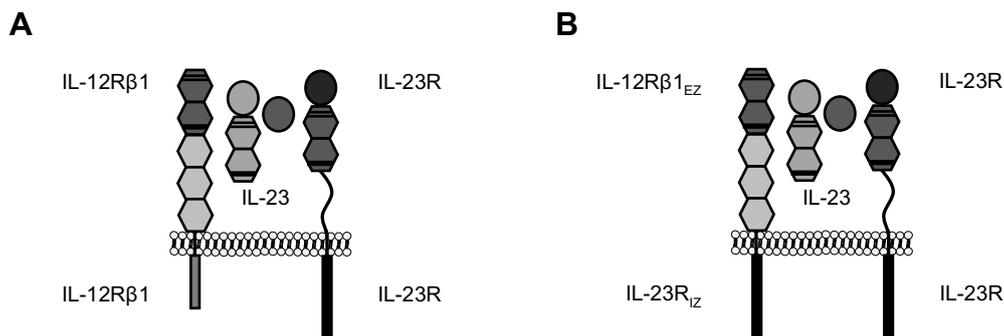


Abb. 3: Schematische Darstellung des physiologischen IL-23 Rezeptorkomplexes (A) und des chimären Zytokinrezeptors IL-12R β 1_{EZ}-IL-23R_{IZ} (B). A IL-12R β 1 und IL-23R, die den physiologischen IL-23 Rezeptorkomplex bilden, binden über ihre extrazellulären Anteile IL-23. Die Dimerisierung der Rezeptoren führt zu einer, durch die intrazellulären Rezeptoranteile vermittelten Signalweiterleitung. B Zur Herstellung des chimären Zytokinrezeptors IL-12R β 1_{EZ}-IL-23R_{IZ} durch Floss und Mitarbeiter wurde der intrazelluläre Anteil des IL-12R β 1 gegen den des IL-23R ausgetauscht (73). Die IL-23 Ligandenbindung des generierten chimären Rezeptors IL-12R β 1_{EZ}-IL-23R_{IZ} und des IL-23R entspricht der des physiologischen IL-23 Rezeptorkomplexes bei extrazellulär unveränderten Rezeptoranteilen. Im Gegensatz zum Wildtyp IL-23 Rezeptorkomplex liegen in der chimären Rezeptorvariante intrazellulär ausschließlich IL-23R-Anteile vor, welche die Signaltransduktion vermitteln. Modifiziert nach Floss *et al.* 2017 (73).

1.3 Ziele der Arbeit

Für viele Erkrankungen, die auf strukturelle oder funktionelle Pathologien der Rezeptorkomplexe der IL-12 Familie zurückzuführen sind, nimmt die Entwicklung hochspezifischer Therapeutika einen hohen Stellenwert ein. Das Identifizieren und Analysieren neuer Strukturen, wie beispielsweise neue mögliche Rezeptorkomplexe innerhalb der IL-12 Familie, stellt somit einen wichtigen Aspekt der aktuellen Forschung dar. Die Existenz von funktionell aktiven IL-23R Homodimeren ist derzeit noch nicht ausreichend beschrieben.

Bereits 2015 vermuteten Schröder *et al.* das Vorkommen aktiver IL-23R Homodimere. Anders als zuvor erwartet führte die Stimulation von Ba/F3-gp130-IL-23R Zellen mit dem p40_D2D3-p19-Fp Fusionsprotein zu einer Signaltransduktion der Zellen statt zu einer verminderten Aktivität dieser im Sinne einer Antagonisierung von IL-23. Dies führten Schröder *et al.* auf eine funktionell aktive Homodimerisierung des IL-23R zurück, da die Ba/F3-gp130-IL-23R Zellen keinen IL-12R β 1 trugen (74). Auch Engelowski *et al.* zeigten bereits eine IL-12R β 1 unabhängige Signaltransduktion vom murinen IL-23R durch die Verwendung von synthetischen Zytokinrezeptoren. Ba/F3-gp130 Zellen, die ausschließlich den synthetischen IL-23R trugen, proliferierten nach Stimulation mit dem entsprechenden synthetischen Liganden und wiesen zudem eine IL-23 entsprechende Signaltransduktion auf. Die Homodimerisierung des IL-23R wies in diesen Experimenten verglichen mit der Heterodimerisierung von IL-23R und IL-12R β 1 ausschließlich eine verminderte Anzahl an exprimierten Genen auf (37). Ferner wiesen Hummel *et al.*, durch Deletion der *stalk region*, eine autonome und ligandenunabhängige Aktivität von IL-23 Rezeptoren nach. Die funktionelle Aktivität dieser modulierten Zytokinrezeptoren begründete sich ebenfalls in der Homodimerisierung von IL-23 Rezeptoren (33).

Ziel dieser Arbeit ist der ausführliche Nachweis einer funktionell aktiven Homodimerisierung des humanen IL-23R. Hierfür sollen Analysen bezüglich der Rezeptorexpression, des Proliferationsverhaltens und der induzierten Signaltransduktion in stabilen Ba/F3-gp-130 Zelllinien durchgeführt werden. Ferner sollen synthetische IL-12R β 2-Rezeptoren generiert und analysiert werden, um so das System der synthetischen Zytokinrezeptoren auf weitere Vertreter der IL-12 Familie auszuweiten.

Zur Analyse der IL-23R Homodimerisierung wurden IL-23 Rezeptoren als Wildtyp-, synthetische und chimäre Rezeptorvarianten untersucht. Die chimären Rezeptorvarianten wurden in Ba/F3-gp130- beziehungsweise U4C- oder HEK293T-Zellen eingebracht und analysiert. Zur Generierung der SyCyRs wurden Anteile der extrazellulären Domänen der zu

analysierenden Interleukinrezeptoren durch GFP- und mCherry-spezifische *nanobodies* ausgetauscht. Anschließend sollen die synthetischen Zytokinrezeptoren in Ba/F3-gp130-Zellen transduziert und hinsichtlich der Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche, des Proliferationsverhaltens sowie der Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges untersucht werden. Die humanen IL-12R β 1, IL-23R und IL-12R β 2 sowie der murine IL-12R β 2 werden für die synthetischen Rezeptorvarianten verwendet.

Die durch diese Arbeit gewonnenen Einblicke könnten somit unter anderem zur Entwicklung von Medikamenten gegen IL-23, aber auch IL-12 assoziierte Erkrankungen beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

In Tabelle 1 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika aufgeführt.

Tabelle 1: Liste der verwendeten Antibiotika.

Antibiotika	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg/ml	Agarplatten 200 µg/ml; Flüssigmedium 100 µg/ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hygromycin B	100 mg/ml	1 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	100 mg/ml	100 µg/ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin	10000 U/ml	60 mg/l	Genaxxon, Ulm, Deutschland
Puromycin	1 mg/ml	1,5 µg/ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin	10 mg/ml	100 mg/l	Genaxxon, Ulm, Deutschland

2.1.2 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Primär- sowie Sekundärantikörper sind in Tabelle 2 sowohl für die Durchflusszytometrie als auch für den Western Blot aufgelistet.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Stammkonzentration	Verdünnung	Hersteller
Durchflusszytometrie			
α-hIL-23R biotin (BAF 1400), Ziege	0,2 mg/ml	1:40	Biotechne, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
α-hIL-12Rβ1 PE-konjugiert (FAB839P), Maus	k.A.	1:10	Biotechne, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
α-hIL-12Rβ2 (#550722, clone 2B6/12beta2)	k.A.	1:100	BD Pharming, Heidelberg, Deutschland
α-mIL-23R (MAB 1686), Ratte	0,2 mg/ml	1:20	Biotechne, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
α-mIL-12Rβ1 PE-konjugiert (FAB 1998P), Ziege	50 µg/ml	1:10	Biotechne, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
α-mIL-12Rβ2 (#552819, clone HAM 10B9)	k.A.	1:50	BD Pharming, Heidelberg, Deutschland
α-myc-Tag (71D10) Rabbit mAb (Biotinylated) #3946	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland

Tabelle 2: Liste der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Stammkonzentration	Verdünnung	Hersteller
α -HA-Tag (C29F4) Rabbit mAb #3724	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland
APC-Streptavidin (# 554067)	0,2 mg/ml	1:100	BD Pharming, Heidelberg, Deutschland
α -Hamster IgG, PE-konjugiert, Maus (#554056, clone G94-90.5)	k.A.	1:80	BD Pharming, Heidelberg, Deutschland
α -Kaninchen IgG-HRP-konjugiert, Ziege	0,4 mg/ml	1:5000	Thermo Fisher, St. Leon-Rot, Deutschland
α -Ratte IgG Alexa Fluor 647 konjugiert, Ziege	1,6 mg/ml	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland
Western Blot			
α -PSTAT3 IgG (Tyr705) (D3A7) XP [®] mAb (#9145), Kaninchen	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland
α -STAT3 (124H6) mAb (#9139), Maus	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland
α -PSTAT5 (Tyr694) (C11C5) mAb (#9359), Kaninchen	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland
α -STAT5 (D2O6Y) mAb (#94205), Kaninchen	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland
α -Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP [®] Rabbit mAb #4370	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland
α -p44/42 MAPK (Erk1/2) #9102	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland
α -hIL-23R biotinyliert (BAF 1400), Ziege	0,2 mg/ml	1:1000	Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland
α -hIL-12R β 1 biotinyliert (BAF839), Ziege	50 μ g/ml	1:300	Biotechne, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
α -mIL-23R biotinyliert (BAF1686), Ziege	0,2 mg/ml	1:1000	Biotechne, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
α - mIL-12R β 1 biotinyliert (BAF1998), Ziege	0,2 mg/ml	1:300	Biotechne, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
α -hIL-12R β 2 biotinyliert (BAF1959), Maus	k.A.	1:1000	Biotechne, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
α -GFP IgG κ mAB #11814460001, Maus	0,4 mg/ml	1:1000	Roche, Mannheim, Deutschland
α -mCherry (PA5-34974)	0,32 mg/ml	1:1000	Thermo Fisher, St. Leon-Rot, Deutschland
α -FLAG [®] (F7425), Kaninchen	k.A.	1:1000	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tabelle 2: Liste der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Stammkonzentration	Verdünnung	Hersteller
α -myc-Tag (71D10) Rabbit mAb (Biotinylated) #3946	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland
α -HA-Tag (C29F4) Rabbit mAb #3724	k.A.	1:1000	Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland
Streptavidin, HRP-konjugiert (DY998)	k.A.	1:200	Biotechne, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
α -Kaninchen IgG-HRP-konjugiert, Ziege	0,4 mg/ml	1:5000	Thermo Fisher, St. Leon-Rot, Deutschland
α -Maus IgG HRP-konjugiert (31432), Ziege	0,4 mg/ml	1:5000	Thermo Fisher, St. Leon-Rot, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

Im Folgenden kommen die verwendeten Chemikalien in Tabelle 3 zur Darstellung.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid 30%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Bio-Budget, Krefeld, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
dNTP Solution dATP, dCTP, dGTP, dTTP (jeweils 100 mM)	Thermo Fisher, St. Leon-Rot, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher, St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher, St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler™ Express DNA Ladder 100-5000 bp	Thermo Fisher, St. Leon-Rot, Deutschland
Glycerin (99%)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
KCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
NaF	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NP-40	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Orange G	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher, St. Leon-Rot, Deutschland
Polybrene	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypan Blue	Bio-Rad, München, Deutschland
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher, St. Leon-Rot, Deutschland
TurboFect™	Thermo Fisher, St. Leon-Rot, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.4 Geräte und Kits

In dieser Arbeit genutzte Geräte werden in Tabelle 4 und Kits in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte.

Geräte	Hersteller
Autoklav Laboklav 25	SHP, Detzel Schloss/Satuelle, Deutschland
BD FACSCanto™ II	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Material und Methoden

Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte.

Geräte	Hersteller
BINDER CO2-Inkubator	BINDER, Tuttlingen, Deutschland
Biorad PowerPac™ Spannungsquelle	Bio-Rad, München, Deutschland
Gefrierschrank Forma™ 900	Thermo Fisher, St. Leon-Rot, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München, Deutschland
Heizbad LAUDA Aqualine AL 12 & AL 25	LAUDA Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen, Deutschland
Infors HT Multitron®	Infors, Bottmingen, Schweiz
INTAS ChemoCam Imager	INTAS, Göttingen, Deutschland
INTAS Gel iX Imager	INTAS, Göttingen, Deutschland
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417R und 5018R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer mit Heizung	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Mars Safety Class 2 Sterilbank	Scanlaf, Lyngø, Dänemark
Mikrowelle Optiquick	Moulinex, Offenbach, Deutschland
MiniPROTEAN® Tetra System	Bio-Rad, München, Deutschland
Minizentrifuge	Axon Labortechnik, Kaiserslautern, Deutschland
NanoDrop™ 2000c Spectrophometer	Thermo Fisher, St. Leon-Rot, Deutschland
peqStar 2X Twin Block Thermal Cycler	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
pH-Meter	Xylem Analytics, Weilheim, Deutschland
Pipetus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Plattformschüttler Titramax 1000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Research® plus Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rollenmischer SRT 9D	Bibby Scientific, Staffordshire, England
Sterilbankpumpenanlage	HLC BioTech, Göttingen, Deutschland
TC10™ und 20™ Automated Cell Counter	Bio-Rad, München, Deutschland
Tecan infinite M200 PRO Plate Reader	Tecan Trading, Männedorf, Schweiz
Thermomixer® comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ Blotting System	Bio-Rad, München, Deutschland
UV-Tisch	Bio-Budget, Krefeld, Deutschland
Vortex Schüttler	neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
Waage	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits.

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

2.1.5 Kulturmedien

Die zur Kultivierung von Bakterien und eukaryotischer Zellen genutzten Medien sind in Tabelle 6 gelistet. Die Zugabe der jeweiligen Antibiotika erfolgte nach Entnahme des LB-Mediums aus der Kühlung bzw. nach Aufkochen des LB-Agars bei Temperaturen unterhalb von 50°C im Abkühlungsprozess.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Kulturmedien.

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

2.1.6 Plasmide und Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Plasmide.

Plasmide	Herkunft	Resistenz
p409-hIL-23R	(75)	Amp
p409-hIL-12Rβ1	(75)	Amp
p409-hIL-12Rβ2	(20)	Amp
p409-mIL-23R	(38)	Amp
p409-mIL-12Rβ1	(38)	Amp
p409-mIL-12Rβ2	(35)	Amp
pcDNA3.1	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	Amp
pcDNA3.1-FLAG-HA-mCherryhb-hFasR	(76)	Amp

Tabelle 7: Liste der verwendeten Plasmide.

Plasmide	Herkunft	Resistenz
pcDNA3.1-myc-GFPnb-hFasR	(76)	Amp
pCR-Script	AG Scheller	Amp
pEGFP	Clontech	Kan
pMOWS-hygro	(77)	Amp
pMOWS-puro	(78)	Amp

Die für die Klonierung verwendeten Oligonukleotide werden in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Oligonukleotide und deren Sequenz.

Primer	Name	Sequenz (5'-3')
DF17	pcDNA3.1 rev	AGGCACAGTCGAGGCTG
DF28	23B pR1	GCAACATGATGGCCAAGAAGAC
DF38	pCR-Script fwd1	TGCTGCAAGGCGATTAAG
DF39	pCR-Script rev1	ATGCTTCCGGCTCGTATG
DF82	5' pcDNA3.1	GACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGC
DF85	5' pMOWS	AGCCCTTTGTACACCCTAAGC
DF86	3' pMOWS	AGCAATAGCATGATACAAAGG
DF133	mIL-12R β 2 pFC	AGCATTTCGTGATATCAAGCAT
DF497	hIL-23R-RT-FP1	TGGGATATTTAACAGATCATTCCGAACTGG
DF504	hIL-12Rb1-RT-RP2	TGTCCCAGGACATCTCTACCAC
DF519	hIL-12Rb2-FP3	CTCAACGCATTACTTCCAGCAAAAAG
DF558	hIL-23R-NotI	GACGCGGCCCGCTACTTTTCCAAGAGTGAAATCCTATTG
DF559	hIL-12Rb1-EcoRI	GACGAATTCTGGAGCCAGCCCCAGCGCTTC
DF561	hIL-12Rb2-EcoRI	GACGAATTCTCCCACGAAATGAGAGGGAATTTTGTCTGC
DF563	mIL-12Rb2-EcoRI	GACGAATCCCCCAAGGAAATGAAAGGGAATTTTGTCCAC AGGGC

2.1.7 Puffer und Lösungen

In Tabelle 9 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen gelistet.

Tabelle 9: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	10% APS
Blockierlösung	5% Magermilchpulver in TBS-T
BSA-Lösung	5% BSA in TBS-T

Material und Methoden

Tabelle 9: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Ethanol	vgl. mit Sigma-Aldrich, München, Deutschland
FACS-Puffer	1% BSA in PBS
Lämmli-Puffer (5x)	5% β -Mercaptoethanol 50% Glycerin 10% SDS 125 mM Tris-HCl pH 6,8 1 Spatelspitze Bromphenolblau
<i>lysis buffer</i> pSTAT3	2 mM EDTA 150 mM NaCl 1 mM NaF 1 mM Na_3VO_4 1% NP-40 50 mM Tris-HCl pH 7,5 1% Triton X-100 1 Tablette cOmplete™ Protease Inhibitor auf 50 ml
<i>lysis buffer</i> JAK2	0,5 mM EDTA 10 mM MgCl_2 150 mM NaCl 0,5% NP-50 1 mM Na_3VO_4 10 mM Tris-HCl 1 Tablette cOmplete™ Protease Inhibitor auf 50 ml
Magermilchpulverlösung 5%	5% Magermilchpulver in TBS-T (0,5%)
Nanotrap <i>dilution buffer</i>	1 mM EDTA 150 mM NaCl 10 mM NaF 1 mM Na_3VO_4 1 mM PMSF 20 mM Tris-HCl pH 7,5 1 Tablette cOmplete™ Protease Inhibitor auf 50 ml
Nanotrap <i>lysis buffer</i>	Nanotrap <i>dilution buffer</i> 0,5% NP-40
Orange G Ladepuffer (6x)	50 mM EDTA 30% Glycerin 0,25% Orange G
<i>phosphate buffered saline</i> (PBS)	2,7 mM KCl 1,5 mM KH_2PO_4 137 mM NaCl 8,1 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4
<i>solution 1</i> (S1) für Plasmid-DNA-Minipräparation	0,5 M EDTA 4 M NaOH 1:1000 RNase 10% SDS 1 M Tris-HCl, pH 7,4
<i>solution 2</i> (S2) für Plasmid-DNA-Minipräparation	0,2 M NaOH 1% SDS

Tabelle 9: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
S3-Puffer für Plasmid-DNA-Minipräparation	3 M Kaliumacetat
Sammelgelpuffer	0,4% SDS 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
SDS-PAGE Laufpuffer	192 mM Glycin 0,1% SDS 25 mM Tris-HCl, pH 8,3
<i>stripping</i> Puffer	0,1% β -Mercaptoethanol 2% SDS 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8
TAE Puffer	0,01 M EDTA 0,2 M Essigsäure 0,4 M Tris-HCl, pH 8,8
<i>Tris buffered saline</i> (TBS)	5 M NaCl 200 mM Tris-HCl, pH 7,5
TBS-T	5 M NaCl 200 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,05% Tween [®] 20
Transferpuffer	2 M Glycerin 5% Methanol 0,01% SDS 250 mM Tris-HCl, pH 8,0
Trenngelpuffer	0,4% SDS 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
BD Falcon [™] Reaktionsgefäße 15, 50 ml	BD Pharming, Heidelberg, Deutschland
Cell Counting Slides for TC10 [™] /TC20 [™] Cell Counter, Dual-Chamber	Bio-Rad, München, Deutschland
CytoOne [®] Zellkulturplatten 6-, 12-, 96-well	STARLAB, Hamburg, Deutschland
Kryoröhrchen	VWR, Langenfeld, Deutschland
MICRO-TOUCH [®] Nitra-Tex [®] EPT [™] Handschuhe	Ansell, Brüssel, Belgien
PCR Kappen Größe 125	STARLAB, Hamburg, Deutschland
PCR Tubes 0,2 ml	STARLAB, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Roti [®] -PVDF-Transfermembran	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 10: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
TipOne® Pipettenspitzen	STARLAB, Hamburg, Deutschland
Whatman™ Filterpapier	VWR, Langenfeld, Deutschland
Zellkulturschale 10 cm (adhärent)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten 6-, 12-, 96-well (adhärent)	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.9 Zelllinien und Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurde zur Klonierung ausschließlich der Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E. coli*) XL1-blue {recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proABlacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)] verwendet. Die verwendeten eukaryotischen Zelllinien sind in Tabelle 11 genannt.

Tabelle 11: Liste der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft	Hersteller
Ba/F3-gp130	Suspensionszellen	Murine prä B-Zellen	Immunex, Seattle, USA (Gearing <i>et al.</i> , 1994)
HEK293T	Adhärente Zellen	Humane embryonale Nierenzellen	DSMZ ACC635, Braunschweig, Deutschland
Phoenix-Eco	Adhärente Zellen	Humane embryonale Nierenzellen	DKFZ, Ursula Klingmüller, Heidelberg, Deutschland
U4C	Adhärente Zellen	Humane Fibrosarkomzellen	(35)
Ba/F3-gp130-hIL-23R	Suspensionszellen	Murine prä B-Zellen	(33)
Ba/F3-gp130-hIL-12Rβ1	Suspensionszellen	Murine prä B-Zellen	(33)
Ba/F3-gp130-hIL-12Rβ2	Suspensionszellen	Murine prä B-Zellen	AG Scheller
Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ2	Suspensionszellen	Murine prä B-Zellen	(35)
Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1 _{EZ} -IL-23R _{IZ}	Suspensionszellen	Murine prä B-Zellen	(73)
Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12Rβ1 _{EZ} -IL-23R _{IZ}	Suspensionszellen	Murine prä B-Zellen	Doreen Floß

2.1.10 Zytokine und rekombinante Proteine

Die im Rahmen dieser Arbeit zur Stimulation der Zelllinien genutzten Zytokine und rekombinanten Proteine sind in Tabelle 12 gelistet.

Material und Methoden

Tabelle 12: Liste der verwendeten Zytokine und rekombinanten Proteine.

Bezeichnung	Stammkonzentration	Zytokin/ rekombinantes Protein
Hyper-IL-6 (HIL-6)	5 µg/ml	Konditionierter Zellkulturüberstand einer CHO-K1 Zelllinie mit Hyper-IL-6-Sekretion
Hyper-hIL-12 (HhIL-12)	k.A.	Konditionierter Zellkulturüberstand einer CHO-K1 Zelllinie mit Hyper-hIL-12-Sekretion
Hyper-mIL-12 (HmIL-12)	1 µg/ml	Konditionierter Zellkulturüberstand einer CHO-K1 Zelllinie mit Hyper-mIL-12-Sekretion
Hyper-mIL-23 (HmIL-23)	4 µg/ml	Konditionierter Zellkulturüberstand einer CHO-K1 Zelllinie mit Hyper-mIL-23-Sekretion
2xGFP	2,39 µg/ml	Konditionierter Zellkulturüberstand einer CHO-K1 Zelllinie mit 2xGFP-Sekretion
2xmCherry	k.A.	Konditionierter Zellkulturüberstand einer CHO-K1 Zelllinie mit 2xmCherry-Sekretion
GFP-Fc	135 µg/ml	Rekombinantes GFP-Fc-Fusionsprotein
mCherry-Fc	410 µg/ml	Rekombinantes mCherry-Fc-Fusionsprotein

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Bakterientransformation

Zur Plasmid-DNA-Vervielfältigung wurden chemisch-kompetente *Escherichia coli*-Zellen transformiert. Hierfür wurden 30 µl der zuvor aliquotierten *E. coli* XL-1 blue auf Eis 5 min inkubiert. Daraufhin wurde je 1 µl Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes hinzugegeben und erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Hitzeschock-Transformation durchgeführt, indem der Ansatz aus *E. coli* und DNA für 1 min bei 42 °C erhitzt wurde. Nach erneuten 5 min im Eisbad wurden 500 µl LB-Medium hinzugegeben, welches zuvor auf 37°C erwärmt wurde. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und 1400 rpm wurden schließlich 100 µl des Ansatzes auf eine LB-Agar-Platte ausgestrichen, welche das Plasmid-spezifische Selektionsantibiotikum enthielt. Diese Agar-Platte wurde bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.2 Präparation der Plasmid-DNA

Nach erfolgreich durchgeführter Transformation und Heranwachsen einzelner Bakterienkolonien auf Agarplatten (vgl. Abschnitt 2.2.1) wurden einzelne Kolonien hinsichtlich der erfolgreichen Aufnahme der Plasmid-DNA überprüft. Dies geschah mittels Plasmid-DNA-Minipräparation. Anschließend wurde die DNA-Menge mittels Midipräparation vervielfältigt.

Plasmid-DNA-Minipräparation

Eine Bakterienkolonie wurde in 2 ml LB-Flüssigmedium mit spezifischem Selektionsantibiotikum eingebracht und über Nacht bei 37°C und 1200 rpm inkubiert. Anschließend wurden 1,5 ml des Ansatzes bei Raumtemperatur (RT) und 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde nach Entfernen des Überstandes in 100 µl 4°C kaltem S1-Puffer resuspendiert. Zu diesem Zellgemisch wurden 200 µl S2-Puffer hinzugegeben, welcher eine alkalische Lyse der Zellen bewirkt. Der Ansatz wurde mehrfach invertiert und die Lyse-Reaktion nach 5 min durch Zugabe von 150 µl S3-Puffer neutralisiert. Um die DNA von den denaturierten Proteinen zu trennen, wurde der Ansatz nach 10 min Inkubation auf Eis bei 4°C und 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 900 µl eisgekühltem 100%igem Ethanol versetzt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm für 15 min. Nach Entfernen des Überstandes und Zugabe von 500 µl 70%igem Ethanol wurde der Ansatz erneut

zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 5 min). Das DNA-Pellet wurde schließlich für 10 min luftgetrocknet und in 30 µl H₂O_{dd} gelöst.

Plasmid-DNA-Midipräparation

Die mittels Mini-Präparation gewonnene Plasmid-DNA wurde per Restriktionsendonukleasen überprüft (vgl. Abschnitt 2.2.3). Anschließend wurden 100 ml flüssigen LB-Mediums mit 100-200 µl der jeweiligen nach der Transformation nicht für die Minipräparation verwendeten *E.coli*-Kulturen beimpft und über Nacht bei 37°C und 140 rpm inkubiert. Die Bakterienkultur wurde bei 4°C und 4000 rpm für 15 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes erfolgte die weitere Plasmid-DNA-Präparation mittels *NucleoBond*[®] *Xtra Midi/ Maxi*-Kit nach Angaben des Herstellers.

Abschließend wurde die DNA-Konzentration per UV-Spektroskopie (*NanoDrop*[®]) bestimmt. Hierfür wurde 1 µl des Plasmid-DNA-H₂O_{dd}-Gemischs (1:10 Verdünnung) aufgebracht und bei einer Wellenlänge von 260 nm dessen optische Dichte bestimmt. Ferner erfolgte die Kontrolle der gereinigten Plasmid-DNA mittels Restriktionsendonukleasen (vgl. Abschnitt 2.2.3).

2.2.3 Restriktive Spaltung von Plasmid-DNA

Die durch die Arbeitsschritte der vorherigen Abschnitte gereinigte und vervielfältigte Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsenzyme an den jeweils spezifischen palindromischen Schnittstellen geschnitten. Die Ermittlung dieser Schnittstellen erfolgte über das DNA-Analyse Programm pDRAW32 und die entsprechenden Plasmidkarten dieser Dissertationsschrift sind im Anhang aufgeführt.

Die restriktive Spaltung kann entweder in analytischer oder in präparativer Absicht in folgender Zusammensetzung erfolgen:

Analytischer Ansatz		Präparativer Ansatz	
Plasmid-DNA	ca. 1 µg	Plasmid-DNA	ca. 10 µg
Restriktionsenzym	0,5 µl	Restriktionsenzym	1-2 µl
10x Reaktionspuffer	2 µl	10x Reaktionspuffer	4 µl
H ₂ O _{dd}	ad 20 µl	H ₂ O _{dd}	ad 40 µl

Der analytische Ansatz wurde bei 37°C für 2 h, der präparative Ansatz zur späteren Ligation bei 37°C über Nacht inkubiert. Bei Nutzung mehrerer Restriktionsenzyme wurde der Ansatz

bei gleichbleibendem Gesamtvolumen den Angaben des Herstellers entsprechend verändert. Zur Beendigung der enzymatischen Aktivität wurde der Ansatz mit DNA-Ladepuffer (*Orange G*; 6x konzentriert) versetzt und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (vgl. Abschnitt 2.2.4).

2.2.4 Agarosegelelektrophorese und -extraktion

Die Agarosegelelektrophorese erfolgte zur Größentrennung von DNA-Fragmenten eines Ansatzes. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern entlang des mit 120 V aufgebauten elektrischen Gradienten in Abhängigkeit der Anzahl ihrer Basenpaare (bp) unterschiedlich schnell zur Anode. Die Herstellung des Agarosegels erfolgte durch Aufkochen von Agarose in TAE-Puffer und anschließendem Gießen in einem Gelschlitten. Je nach Größe der erwarteten DNA-Fragmente wurden 1-2%ige Agarosegele gegossen. Um die DNA per *INTAS Gel iX Imager* auswerten zu können, wurde 0,001%iges Ethidiumbromid zur Agarose hinzugegeben. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden *GeneRuler™ Express DNA Ladder* und *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* verwendet.

Um gezielt DNA-Fragmente aus dem Agarosegel zu isolieren, wurden die jeweiligen Banden unter Einsatz von UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA der ausgeschnittenen Gelstücke wurde durch Einsatz des *Nucleospin® Gel and PCR Clean-up Kit* den Herstellerangaben entsprechend isoliert. Anschließend wurde die Konzentration der isolierten DNA-Fragmente mittels UV-Spektroskopie bestimmt (vgl. Abschnitt 2.2.2) und eine erneute Kontrolle der isolierten DNA mittels Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

2.2.5 Dephosphorylierung der 5'-Enden von Plasmid-DNA-Vektoren

Um die Linearisierung von, zuvor durch Restriktionsenzyme gespaltenen (vgl. Abschnitt 2.2.3), Vektor-DNA-Abschnitten beizubehalten und eine Re-Ligation zu verhindern, wurden diese an ihren 5'-Enden dephosphoryliert. Hierfür wurde der jeweilige Restriktionsansatz (40 µl) folgendermaßen erweitert:

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

Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde die alkalische Phosphatase durch Inkubation bei 75°C für 5 min inaktiviert.

2.2.6 Phosphorylierung von DNA

Vor der Ligation werden PCR-Produkte an ihren 5'-Enden, anders als Vektor-DNA, phosphoryliert. Im Falle mittels Restriktionsenzyme gewonnener DNA-Fragmente entfiel die zusätzliche Phosphorylierung. Die Phosphorylierung erfolgte folgendem Ansatz entsprechend:

T4-Polynukleotidkinase	2 µl
10x T4-Ligasepuffer	15 µl
PCR-Produkt	132 µl
H ₂ O _{dd}	ad 150 µl

Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die T4-Polynukleotidkinase durch Inkubation bei 75°C für 5 min inaktiviert. Anschließend wurden die bearbeiteten DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt und zur weiteren Bearbeitung extrahiert.

2.2.7 Klenow-Behandlung von pMOWS-Vektoren

Nach Dephosphorylierung (vgl. Abschnitt 2.2.6) der, zuvor mittels Restriktionsenzyme gespaltenen, pMOWS-Vektoren erfolgte zusätzlich die Klenow-Behandlung. Hierbei werden die *sticky ends* der Vektoren zu *blunt ends* aufgefüllt und die Vektoren so für die anschließende Ligation (vgl. 2.2.8) vorbereitet. Die Klenow-Behandlung wurde wie folgt durchgeführt:

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

Nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch eine 10-minütige Inkubation bei 95°C beendet.

2.2.8 Ligation der Plasmid-DNA

Zur Einbringung der *inserts* oder von PCR-Produkten in Vektoren wurden in dieser Arbeit Ligationen durchgeführt. Hierfür wurden die Vektoren und *inserts* oder PCR-Produkte jeweils mittels Restriktionsenzymen gespalten und entsprechend den vorherigen Abschnitten für die

Ligation vorbereitet. Zur Berechnung der *insert*-DNA Menge (in ng) wurde folgende Formel genutzt:

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

Anschließend wurde der Reaktionsansatz für die Ligation wie folgt zusammengesetzt:

Menge an <i>insert</i>	s.o.
Vektor-DNA	100 ng
T4-DNA-Ligase	2 µl
10x T4-DNA-Ligasepuffer	2 µl
H ₂ O _{dd}	ad 20 µl

Im Falle einer *blunt end* Ligation wurden außerdem 2 µl PEG 4000 dem Reaktionsansatz hinzugegeben. Der Ligationsansatz wurde bei einer *sticky end* Ligation bei RT für 2 h, bei einer *blunt end* Ligation bei 4°C über Nacht inkubiert. Schließlich wurde die ligierte DNA in chemisch kompetente *E.coli* transformiert (vgl. Abschnitt 2.2.1).

2.2.9 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein molekularbiologisches Verfahren zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte. Hierfür werden ein sogenanntes *template* (der zu amplifizierende DNA-Abschnitt), eine thermostabile DNA-Polymerase, spezifische Primer samt Pufferlösung sowie Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) benötigt. In einem PCR-Thermocycler wird anschließend ein geeignetes PCR-Programm durchlaufen, welches in mehreren gleichbleibenden Zyklen abläuft.

In dieser Arbeit wurde ein *peqStar 2X Twin Block Thermal Cycler* verwendet. Innerhalb eines Zyklus wurde zuerst die DNA bei 95°C für 1 min denaturiert. Anschließend wurde bei 60°C für 1 min ein Anlagern der Primer (*annealing*) und schließlich bei 72°C die *template*-Vervielfältigung durch Polymerasen katalysiert. Die Dauer des Vervielfältigungszyklus richtet sich nach der jeweiligen Polymerase. Vor Beginn des ersten Zyklus erfolgte eine initiale Denaturierung bei 95°C für 5 min, nach Ende des letzten Zyklus eine finale Elongation für 10 min.

Durch die sogenannte *colony*-PCR konnte der erfolgreiche Einbau des jeweiligen *inserts* in die Plasmid-DNA zuvor transformierter *E.coli*-Kolonien nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 2.2.1). Ein mit 20 µl H₂O_{dd} befülltes PCR-Reaktionsgefäß und eine 2 ml LB-Flüssigkultur wurden mit Material einer Bakterienkolonie beimpft. Die Flüssigkultur wurde nach Inkubation bei 37°C über Nacht für die Plasmid-DNA-Minipräparation verwendet (vgl. Abschnitt 2.2.2). Das PCR-Reaktionsgefäß wurde bei 95°C für 5 min inkubiert. Anschließend wurden dem Reaktionsansatz folgende Bestandteile hinzugegeben:

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

Außerdem wurde die PCR in dieser Arbeit auch zum Einbringen von *inserts* in linearisierte Vektoren genutzt. Hierzu wurden als *proofreading* DNA-Polymerasen *Pfu* oder Phusion® folgendem Ansatz entsprechend verwendet:

<i>Pfu</i>		Phusion®	
<i>Pfu</i> Polymerase (2,5 U/µl)	0,5 µl	<i>Pfu</i> Polymerase (2,5 U/µl)	0,5 µl
10x <i>Pfu</i> Puffer	5 µl	10x HF Puffer	10 µl
<i>template</i> DNA	1 µl	<i>template</i> DNA	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl	dNTPs (10 mM)	1 µl
<i>forward Primer</i> (10 µM)	3 µl	<i>forward Primer</i> (10 µM)	3 µl
<i>reverse Primer</i> (10 µM)	3 µl	<i>reverse Primer</i> (10 µM)	3 µl
H ₂ O _{dd}	<i>ad</i> 50 µl	H ₂ O _{dd}	<i>ad</i> 50 µl

Nach Abschluss der PCR und Zugabe von 10 µl *Orange G* Ladebuffer konnten die PCR-Produkte per Agarosegelelektrophorese ausgewertet und gegebenenfalls extrahiert werden (vgl. Abschnitt 2.2.4).

2.2.10 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Die in dieser Arbeit hergestellten Plasmide wurden von *Microsynth Seqlab* (Göttingen, Deutschland) sequenziert. Eine abschließende Analyse der Nukleotidsequenzen erfolgte mit der Software Clustal Omega von EMBL-EBI (Cambridge, GB, <https://www.ebi.ac.uk/seqdb/confluence/display/THD/Clustal+Omega>).

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zellkultivierung

In dieser Arbeit wurde zur Kultivierung stabiler Zelllinien *Dulbecco's Modified Eagle Medium, high Glucose* (4,5 g/l) (DMEM) verwendet. Zudem wurde es mit 10%igem fetalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) (DMEM+) versetzt. Anschließend wurden noch Penicillin (60 mg/l) und Streptomycin (100 mg/l) hinzugegeben (DMEM^{+/+}). Die Zellkulturen wurden in 10 cm Zellkulturschalen und in 10 ml DMEM^{+/+} angelegt. Stabile Zelllinien wurden zusätzlich mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum versetzt. Die Kulturen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert und einmal wöchentlich passagiert.

Ba/F3-gp130-Zellen wurden zusätzlich mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 (HIL-6) versehen. Zum Passagieren wurden jeweils 0,25 µl der konfluenten in eine neu angelegte Zellkulturschale mit 10 ml DMEM^{+/+} übertragen.

2.3.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Im Falle der HEK293T- und U4C-Zellen gelang ein transientes Einbringen der gewünschten DNA mittels Transfektion. Hierzu wurden die Zellen am Vortag der Transfektion in 10 cm Zellkulturschalen mit 10 ml DMEM^{+/+} mit einer Zellzahl von 2×10^6 ausgesät. Die Zellzählung erfolgte mittels *TC20™ Automated Cell Counter*. Am nächsten Tag wurde 1 ml Antibiotikum- und serum-freies Medium (DMEM^{-/-}) mit 5 µg DNA und 10 µl *TurboFect™* (Transfektionsreagenz) tropfenweise versetzt und nach 20-minütiger Inkubation bei RT vorsichtig zu den Zellen pipettiert. In den durchgeführten Co-Transfektionen wurden bei gleichbleibendem Medium- und *TurboFect™*-Anteil jeweils nur 2,5 µg DNA pro Plasmid verwendet. Anschließend wurden die Zellen wieder bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Bei den U4C-Zellen erfolgte nach 6 Stunden ein Mediumswechsel.

Phoenix-Eco-Zellen wurden am Vortag der Transfektion in 6-well-Platten mit einer Zellzahl von 6×10^5 in 2 ml DMEM^{+/+} pro well ausgesät. Am nächsten Tag wurden sie mit 200 µl DMEM^{-/-}, 1 µg Plasmid-DNA und 2 µl *TurboFect™* versetzt. Anschließend wurde nach 6 h

ebenfalls ein Mediumswechsel mit 30% FCS-haltigem Medium durchgeführt und die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert.

2.3.3 Retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen

Stabile Ba/F3-gp130-Zelllinien wurden mittels retroviraler Transduktionen generiert. Hierfür wurden zuvor transfizierte Phoenix-Eco-Zellen verwendet (vgl. Abschnitt 2.3.2). Die Phoenix-Eco-Zellen wurden mit den retroviralen Vektoren pMOWS-hygro und pMOWS-puro transfiziert. Diese synthetisieren mRNA-haltige Virushüllproteine, die wiederum die Ba/F3-gp130-Zellen transduzieren. Ba/F3-gp130-Zellen integrieren daraufhin die zuvor durch Reverse Transkriptase-Aktivität zu DNA umgeschriebene Information in ihr Genom und exprimieren anschließend die entsprechenden Proteine.

Nach dem Waschen mit PBS wurden die zu transduzierenden Ba/F3-gp130-Zellen auf eine Zellzahl von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Zu 50 μ l dieser Zellsuspension wurden anschließend 250 μ l Überstand der transfizierten Phoenix-Eco-Zellen und 3 μ l Polybrene (entspricht 2,4 μ g) hinzugegeben. Nach 2-3-stündiger Zentrifugation bei RT und 1800 rpm wurden die Zellen in 5 ml DMEM^{+/+} resuspendiert und mit 10 ng/ml HIL-6 versetzt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde je nach Resistenz des verwendeten retroviralen Vektors 1 mg/ml Hygromycin B, oder nach 48-stündiger Inkubation 1,5 μ g/ml Puromycin hinzugegeben.

Nach zweiwöchiger Selektion der Zellen konnten diese mittels Durchflusszytometrie (vgl. Abschnitt 2.3.4), Proliferationsassay (vgl. Abschnitt 2.3.5), Stimulationsassay (vgl. Abschnitt 2.3.6) und Western Blot (vgl. Abschnitt 2.4.3) analysiert werden.

2.3.4 Durchflusszytometrie

Die retroviral transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen (vgl. Abschnitt 2.3.3) wurden mittels Durchflusszytometrie auf Expression der jeweiligen Rezeptoren auf der Zelloberfläche untersucht. In dieser Arbeit erfolgte dies am *BD FACSCanto™ II* und anschließender Auswertung durch die *FCS Express* Software.

Für die Messung wurden 5×10^5 Zellen der zu untersuchende Zelllinie bei RT und 2000 rpm für 5 min zentrifugiert, anschließend in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und erneut wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Daraufhin wurde das Zellpellet in 100 μ l Primärantikörper-haltigem FACS-Puffer resuspendiert und für 2 h lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml FACS-Puffer und erneuter Zentrifugation (4°C, 2000 rpm, 5 min) wurde das Zellpellet in 100 μ l Sekundärantikörper-haltigem FACS-Puffer resuspendiert und für 1 h bei 4°C im Kühlschrank lichtgeschützt inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 1 ml FACS-

Puffer und erneuter Zentrifugation (4°C, 2000 rpm, 10 min) wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und anschließend per Durchflusszytometrie analysiert. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 gelistet.

2.3.5 Analyse der Zellviabilität

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Proliferationsverhalten transduzierter Ba/F3-gp130-Zellen unter Zytokinstimulation mittels *CellTiter-Blue*[®] *Cell Viability Assay* untersucht. Das Prinzip dieses Assays besteht in einer durch metabolisch aktive Zellen vermittelte Verstoffwechslung von *CellTiter-Blue*[®] Reagenz. Sie reduzieren den im Reagenz enthaltenen Farbstoff Resazurin zu stark fluoreszierendem Resorufin. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zur Anzahl lebender Zellen und somit ein Maß für die Zellproliferation. Zellviabilitätsassays wurden in dieser Arbeit sowohl für mehrere Zelllinien unter Stimulation verschiedener Zytokine, als auch einzelner Zelllinien unter Stimulation verschiedener Konzentrationen eines Zytokins durchgeführt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte im *Tecan infinite*[®] *M200 PRO plate reader* bei 560/590 nm.

Hierfür wurden die Ba/F3-gp130 Zelllinien dreimalig mit PBS gewaschen. Die Zentrifugation dieses Schrittes erfolgte jeweils bei RT und 1500 rpm für 5 min. Nach Resuspension in DMEM^{+/+} wurden die Zellen gezählt und auf eine Konzentration von 50000 Zellen pro ml eingestellt. Anschließend wurden nach Zugabe des entsprechenden Proteins bzw. Zytokins jeweils 100 µl der Zellsuspension in drei verschiedene *wells* einer 96-*well* Zellkulturplatte überführt und mikroskopisch auf Vorhandensein der Zellen kontrolliert. Zur Stimulation wurden in dieser Arbeit sowohl HIL-6 und Hyper-IL-23 (HIL-23), als auch die fluoreszierenden Proteine 2xGFP, GFP-FC und 2xmCherry in verschiedenen Konzentrationen genutzt. Die Auswertung erfolgte nach 72-stündiger Inkubation. Die erste Messung erfolgte unmittelbar nach Zugabe von 20 µl *CellTiter-Blue*[®] Reagenz (Zeitpunkt „0“). Anschließend wurden in den nächsten 2 h Messungen in 20-minütigen Abständen durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch konzentrationsabhängige Zellviabilitätsassays durchgeführt. Hierfür wurde analog zu dem obigen Verfahren vorgegangen mit der Ausnahme, dass eine Zelllinie nicht nur mit einer festen Konzentration eines Zytokins oder synthetischen Liganden stimuliert wurde, sondern mit unterschiedlichen Konzentrationen entlang eines Konzentrationsgefälles. Anschließend wurde das Proliferationsverhalten der Zellen im Verhältnis zur Konzentration des Liganden analysiert. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte Zellen der zu analysierenden Zelllinie, als Positivkontrolle mit HIL-6 stimulierte

Zellen der zu analysierenden Zelllinie gewählt. Die Konzentrationen wurden entweder absolut (meist in ng/ml) oder relativ (in Prozent) angegeben.

Für die Varianzanalyse wurde das one-way ANOVA (*analysis of variance*) Verfahren mittels *GraphPad Prism 6.0* (GraphPad Software Inc.) genutzt. Die statistische Signifikanz wurde bei $p \leq 0,05$ festgelegt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

2.3.6 Stimulationsassay

Zur Analyse der durch Zugabe von Zytokinen oder fluoreszierender Proteine aktivierten Signalwege zuvor transfizierter oder transduzierter Zelllinien wurden Stimulationsassays durchgeführt. Neben der Untersuchung der intrazellulären Signalweiterleitung von in Ba/F3-gp130-Zellen transduzierter synthetischer Zytokinrezeptoren wurde diese auch für transient transfizierte U4C-Zellen durchgeführt.

Ba/F3-gp130-Zellen wurden nach dreimaligem Waschen mit PBS und Zentrifugation (RT, 1500 rpm, 5 min) in DMEM^{-/-} resuspendiert und zu je 1 ml pro *well* auf eine 12-*well* Platte aufgeteilt. Das sogenannte *starving* der Zellen erfolgte bei 37°C für 4 h im CO₂-Inkubator. Nach Stimulation der Zelllinien mit verschiedenen Konzentrationen Zytokin und fluoreszierender Proteine für 30 min wurden die Zellen zentrifugiert (RT, 1500 rpm, 5 min), in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Nach Herstellung der Zelllysate (vgl. Abschnitt 2.4.1) wurde per Western Blot (vgl. Abschnitt 2.4.3) auf eine erfolgte Signalweiterleitung untersucht. Sowohl die ERK1/2-, als auch die STAT3- und STAT5-Phosphorylierung wurden analysiert.

Transient transfizierte U4C-Zellen wurden hinsichtlich der Signalweiterleitung nach Stimulation mit HIL-23 untersucht. Hierfür wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 und STAT3 ebenfalls per Western Blot analysiert. Der Versuchsablauf entspricht den obigen Erklärungen.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Um einerseits die Oberflächenexpression der verschiedenen Rezeptoren und andererseits die intrazelluläre Signaltransduktion der verschiedenen Zelllinien per Western Blot untersuchen zu können, war es notwendig, die Zellen zu lysieren. Hierfür wurde das zuvor eingefrorene Zellpellet (vgl. Abschnitt 2.3.6) der Ba/F3-gp130-Zellen verwendet. Die adhärennten Zellen

(U4C und HEK293T) wurden nach Waschen mit PBS mittels Zellschaber in 1 ml PBS geerntet und anschließend zentrifugiert (4°C, 1500 rpm, 5 min).

Die eigentliche Lysatherstellung erfolgte für alle Zelltypen gleich. Nach Resuspension der Zellen in 150-200 µl *lysis buffer* wurden diese bei 4°C unter Rotation für 2 h inkubiert. Der nach Zentrifugation (4°C, 13000 rpm, 15 min) gewonnene Überstand wurde anschließend per *Pierce*[®] *BCA Protein Assay Kit* auf seine Proteinkonzentration untersucht (vgl. Abschnitt 2.4.2).

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der hergestellten Zelllysate (vgl. Abschnitt 2.4.1) wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Bicinchoninsäure (BCA) *Protein Assay Kit* unter Befolgung der Herstellerempfehlungen durchgeführt. Dieses Testverfahren basiert auf einer Reduktion zweiwertiger Kupferionen in Anwesenheit von Proteinen. Durch Bindung von BCA und einwertigen Kupferionen kommt es zur Ausbildung eines violetten Farbstoffs, welcher bei einer Wellenlänge von 562 nm mittels *Tecan infinite*[®] *M200 PRO plate reader* quantifiziert werden kann.

Eine 96-well Zellkulturplatte wurde mit steigenden Konzentrationen von BSA-Lösung zweifach zu je 25 µl pro Konzentration befüllt. Nach Herstellung von 1:20 in H₂O_{dd} verdünnten Zelllysaten wurden pro Probe jeweils 25 µl in zwei *wells* der Zellkulturplatte aufgetragen. Anschließend wurden pro *well* jeweils 200 µl eines Arbeitsreagenzes hinzugegeben und die Zellkulturplatte bei 37°C für 30 min inkubiert. Für die Analyse der Proteinkonzentration wurde daraufhin anhand der gemessenen BSA-Extinktionswerte eine Standardgerade gebildet.

Abschließend wurden die Zelllysate auf eine Konzentration von 2,5 µg/µl eingestellt und mit β-Mercaptoethanol-haltigem Lämmli-Puffer (5x konzentriert) auf 200 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach Inkubation bei 95°C für 10 min konnten die Proben zur weiteren Analyse mittels Western Blot genutzt werden (vgl. Abschnitt 2.4.3).

2.4.3 Western Blot

Der Western Blot ist ein proteinbiochemisches Verfahren zur molekulargewichtsabhängigen Größentrennung und anschließender Antikörperdetektion von Proteinen. Zur Größentrennung der Proteine wurde in dieser Arbeit die *sodium dodecyl sulfat polyacrylamid* Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Das negativ geladene SDS lagert sich an Proteine an. Diese wandern dem angelegten elektrischen Gradienten entsprechend zur Anode. Kleinere Protein-SDS-Komplexe wandern schneller durch das Gel, sodass diese näher an der Anode aufzufinden sind.

Die SDS-Polyacrylamidgele bestehen aus einem Sammelgelanteil zur Aufbringung der Proben und einem Trenngelanteil zur Trennung entsprechend der Proteingröße und wurden wie folgt hergestellt:

	<u>Sammelgel</u>	<u>Trenngel</u>
H ₂ O _{dd}	1,7 ml	4,0 ml
Acrylamid (30%ig)	0,5 ml	3,3 ml
Spezifischer Puffer	0,75 ml	2,6 ml
APS (10%ig)	30 µl	100 µl
TEMED	3 µl	4 µl

Nach Aufbringung des Größenstandards *Pageruler™ Prestained Protein Ladder* und der zuvor mit Lämmli-Puffer versetzten Proben (vgl. Abschnitt 2.4.2) wurden diese bei 95 V für 2 h analysiert.

Die Antikörperdetektion beruht auf dem Einsatz eines Primärantikörpers, welcher spezifisch an das nachzuweisende Protein bindet und einem Sekundärantikörper, welcher mit dem Primärantikörper interagiert und somit letztendlich das Protein nachweisen kann. In dieser Arbeit wurde zum Nachweis der *INTAS ChemoCam Imager* genutzt. Hierfür wurde eine PVDF-Membran genutzt, die nach 2-minütiger Aktivierung in Methanol mit Transferpuffer gewaschen wurde. Das Polyacrylamidgel wurde auf die Membran und sich darunter befindlichen vier Lagen mit Transferpuffer befeuchtetem Filterpapier aufgelegt. Abschließend wurden auf das Gel vier Lagen mit Transferpuffer befeuchtetem Filterpapier aufgebracht und der Transferkomplex in das *Trans-Blot® Turbo™ Blotting System* eingelegt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes für 1 h bei 20 V erfolgte der Transfer der Proteine auf die Membran. Anschließend wurden freie Proteinbindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in 5%iger Magermilchpulverlösung bei RT für 2 h blockiert. Nachfolgend wurde der Primärantikörper nach dreimaligem Waschen mit TBS-T aufgebracht und die Membran unter Rollen bei 4°C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T der Sekundärantikörper aufgebracht und die Membran für 2 h bei RT inkubiert. Wurden biotinylierte Antikörper verwendet, erfolgte der Nachweis mit Streptavidin-HRP und die Inkubation wurde lichtgeschützt für 1 h durchgeführt. Nach anschließendem Waschen mit TBS-T und TBS konnte die Membran per *INTAS ChemoCam Imager* analysiert werden.

Um eine Analyse derselben Membran mit anderen Antikörpern durchführen zu können wurde diese für 30 min in 60°C warmen *stripping buffer* inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit

TBS-T und Blockierung in 5%iger Magermilchpulverlösung sowie Aufbringung des Primär- und Sekundärantikörpers nach dem bereits beschriebenen Procedere, konnte die erneute Auswertung erfolgen.

3 Ergebnisse

3.1 Der humane IL-23R bildet funktionell aktive Homodimere

Wie bereits in Abschnitt 1.3 beschrieben, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Homodimerisierung verschiedener Zytokinrezeptoren aus der IL-12 Familie untersucht und somit die Beobachtungen von Schröder *et al.* (74) und Engelowski *et al.* (37) in vorangegangenen Studien überprüft und weiter analysiert werden.

In dem in Abb. 4 dargestellten Proliferationsassay wurden verschiedene, ausschließlich natürliche Interleukinrezeptoren tragende Ba/F3-gp130-Zellen untersucht. Sowohl die murinen als auch die humanen Rezeptorvarianten des IL-23R und des IL-12R β 1 wurden einzeln und in Kombination analysiert.

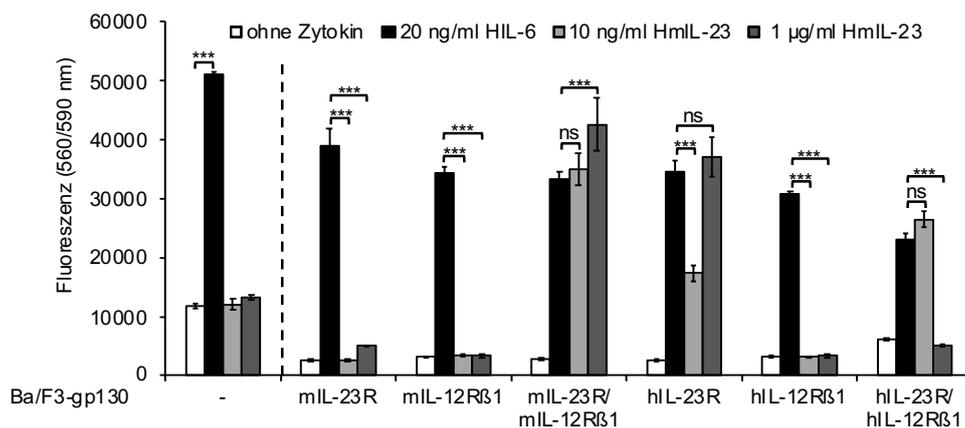


Abb. 4: Proliferation von Ba/F3-gp130 Zelllinien mit Expression von murinem oder humanem IL-23 Rezeptor. Die angegebenen Ba/F3-gp130 Zelllinien wurden mit 20 ng/ml HIL-6 sowie 10 ng/ml bzw. 1 µg/ml HmIL-23 für 72 Stunden stimuliert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nicht behandelt. Für diesen Nachweis wurden jeweils 5000 Zellen pro *well* ausgesät. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation 560 nm/ Emission 590 nm) repräsentiert ein Maß für die Proliferation der Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus Triplikaten. Dieses Experiment ist ein Replikat der Versuchsreihe von Sofie Beier (79) und wurde daher nur mit $n=1$ durchgeführt. ns nicht signifikant, *** $p \leq 0,001$.

Die als Negativkontrolle fungierenden, untransduzierten Ba/F3-gp130-Zellen wiesen wie erwartet einzig unter HIL-6-Stimulation eine vermehrte Zellproliferation auf. HIL-6 ist ein Fusionszytokin bestehend aus IL-6 und dem löslichen IL-6R, die über einen *peptidelinker* miteinander verbunden sind (80). Bei den ausschließlich mit der cDNA des murinen und des humanen IL-23R transduzierten Zellen wurden nach HmIL-23-Stimulation ebenfalls erhöhte Proliferationsraten nachgewiesen. HIL-23 ist ebenfalls ein Fusionszytokin bestehend aus den beiden über einen Peptidlinker verbundenen IL-23 Untereinheiten IL-12p40 und IL-23p19 (31). Eine vermehrte Zellproliferation zeigte sich für die Ba/F3-gp130-mIL-23R Zellen jedoch erst

bei Stimulation mit 1 µg/ml HmIL-23. Bei einer Stimulation mit 10 ng/ml wurde keine Zellproliferation nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wiesen die, den humanen IL-23R exprimierenden Ba/F3-gp130 Zellen schon bei Stimulation mit der geringeren Konzentration von HmIL-23 deutlich erhöhte Proliferationsraten auf, welche unter der höheren Konzentration sogar die HIL-6-induzierte Zellproliferation übertrafen. Für beide Rezeptorvarianten bedeutete der Anstieg der Proliferationsraten eine durch Homodimerisierung des jeweiligen IL-23R induzierte Aktivierung der intrazellulären Signalwege, die letztendlich in der Proliferation der Zellen resultierte. Durch den humanen IL-23R wurde diese deutlich früher und ausgeprägter vermittelt. Die Ba/F3-gp130-Zellen, welche den humanen oder murinen IL-12Rβ1 auf ihrer Zelloberfläche exprimierten, wiesen wie erwartet keine Proliferation unter Stimulation mit HmIL-23, jedoch unter Stimulation mit HIL-6 auf. Die mit beiden Rezeptoren co-transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen spiegelten das physiologische Vorkommen der Rezeptoren und die über Heterodimerisierung des IL-23R und des IL-12Rβ1 induzierte Signaltransduktion wider. Die HmIL-23-Stimulation führte hierbei in den Zellen, die die murinen Rezeptorvarianten exprimierten zu sehr ausgeprägten Proliferationsraten. In der Analyse der humanen Interleukinrezeptoren wurde unter HmIL-23-Stimulation mit 10 ng/ml ebenfalls eine ausgeprägte Proliferation der Zellen erreicht, welche bei Stimulation mit 1 µg/ml jedoch ausblieb. Diese ausbleibende Proliferation bei Stimulation mit hohen Konzentrationen HmIL-23 von Zellen mit dem humanen IL-23 Rezeptor wurde ebenfalls von anderen Mitgliedern der AG Scheller in ähnlichen Experimenten beobachtet (79,81). Die Ursache für dieses Phänomen wurde bisher noch nicht geklärt.

3.2 Synthetische Zytokinrezeptoren induzieren die Homodimerisierung von Rezeptoren der IL-12 Zytokinfamilie

3.2.1 Generierung der SyCyRs

Synthetische Zytokinrezeptoren (SyCyRs) sind in den extrazellulären Anteilen modifizierte Zytokinrezeptoren. Sie besitzen weiterhin die intrazellulären Anteile des jeweiligen physiologischen Zytokinrezeptors. Über die Bindung spezifischer Liganden an die extrazellulären Rezeptordomänen kann so die regelrechte intrazelluläre Signalweiterleitung stattfinden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die verschiedenen extrazellulären Anteile der Zytokinrezeptoren der IL-12 Familie mit sogenannten *nanobodies* (nb) bzw. VHHs ersetzt. Hierfür wurden entweder spezifische GFP- (G_{VHH}) oder mCherry- (C_{VHH}) *nanobodies*

verwendet. Die Rezeptordimerisierung wurde somit nicht mehr durch Zytokine, sondern durch die artifiziell hergestellten Proteine GFP und mCherry vermittelt (vgl. Abb. 2).

Da in dieser Arbeit entweder GFP_{VHH} oder mCherry_{VHH} für die Generierung der Homodimere verwendet wurde, erfolgte die Stimulation der SyCyRs mittels 2xGFP oder 2xmCherry. Beides sind Dimere der jeweiligen fluoreszierenden Proteine. Auf diese Weise wurden in dieser Arbeit jeweils G_{VHH}- und C_{VHH}-SyCyRs für die humanen IL-23R, IL-12Rβ1, IL-12Rβ2 sowie für den murinen IL-12Rβ2 generiert. Für die abschließende funktionelle Analyse der SyCyRs wurden diese zusätzlich in eine den jeweiligen natürlichen Rezeptor tragende Ba/F3-gp130 Zelllinie eingebracht (siehe Abb. 5).

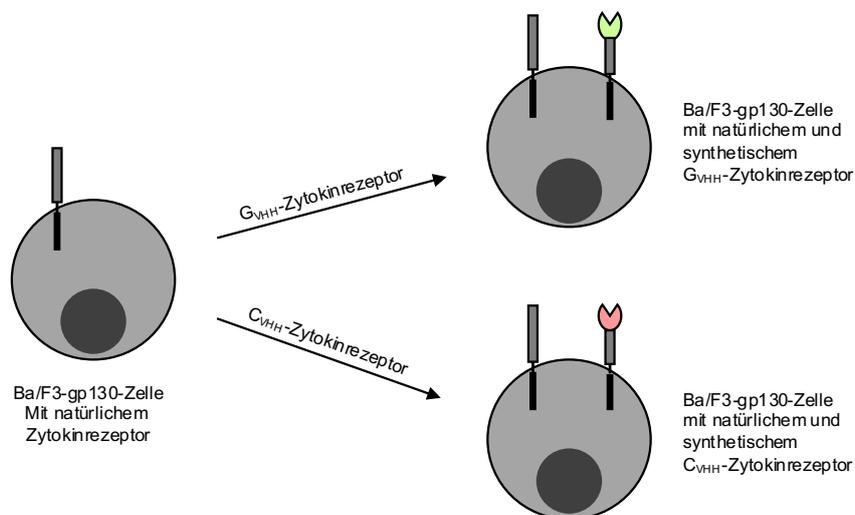


Abb. 5: Generierung von Ba/F3-gp130 Zellen mit natürlichem und synthetischem Zytokinrezeptor (SyCyR). Ba/F3-gp130-Zellen, die den physiologischen Zytokinrezeptor trugen, wurden mit den entsprechenden G_{VHH}- sowie C_{VHH}-Zytokinrezeptor enthaltenden pMOWS-Expressionsvektoren retroviral transduziert. Hierbei entstanden Ba/F3-gp130-Zelllinien, die sowohl den physiologischen als auch den synthetischen Rezeptor eines bestimmten Zytokinrezeptors exprimierten. Bei den für die dargestellte Generierung verwendeten Zytokinrezeptoren handelte es sich um hIL-23R, hIL-12Rβ1, hIL-12Rβ2 und mIL-12Rβ2. Somit wurde pro Zytokinrezeptor sowohl eine G_{VHH} als auch eine C_{VHH} exprimierende Ba/F3-gp130-Zelllinie generiert.

Somit konnten diese sowohl den physiologischen als auch den synthetischen Zytokinrezeptor tragenden Zelllinien unter Stimulation mit dem jeweiligen Zytokin oder dem jeweiligen Dimer des spezifischen fluoreszierenden Liganden miteinander verglichen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Expressionsvektoren pcDNA3.1-myc-GFPnb-hFasR und pcDNA3.1-FLAG-HA-mCherrynb-hFasR für die Generierung des jeweiligen SyCyRs genutzt. Die Vektoren lagen der AG Scheller bereits vor (siehe Tabelle 7). Auf diese Weise enthielten die SyCyRs neben den verschiedenen intrazellulären Interleukinrezeptoranteilen und extrazellulären *nanobodies* zusätzlich noch sogenannte *tags* zur späteren Immunodetektion mittels Durchflusszytometrie (vgl. Abschnitt 2.34) oder Western Blot (vgl. Abschnitt 2.4.3). Für G_{VHH}-Varianten war dies der myc-tag, für C_{VHH}-Varianten waren es sowohl der FLAG- als

auch der HA-tag. Im weiteren Verlauf dieser Dissertationsschrift werden die tags der besseren Übersicht halber nicht mehr durchgehend erwähnt.

Zur Generierung GFP-spezifischer SyCyRs wurden die cDNAs der jeweils einzubringenden Zytokinrezeptoranteile (hIL-23R, hIL-12R β 1, hIL-12R β 2, mIL-12R β 2) aus dem entsprechenden Plasmid des p409-Vektors mittels PCR amplifiziert, die PCR-Produkte phosphoryliert und in den pCR-Script Vektor ligiert. Dieser wurde zuvor mit HincII linearisiert und anschließend dephosphoryliert, um eine Religation zu verhindern. Die einzubringende cDNA der Rezeptoranteile codierte für die intrazellulären Domänen, Transmembrandomänen sowie die 15 AS der extrazellulären Domäne des entsprechenden Zytokinrezeptors.

Nach Transformation der generierten Plasmid-DNA in *E. coli* Bakterien und nachfolgendem Anzichten von Bakterienkolonien aus Einzelklonen auf LB-Agarplatten erfolgte die Klonierung der Zytokinrezeptor tragenden pCR-Script Expressionsvektoren (siehe Abb. 6)

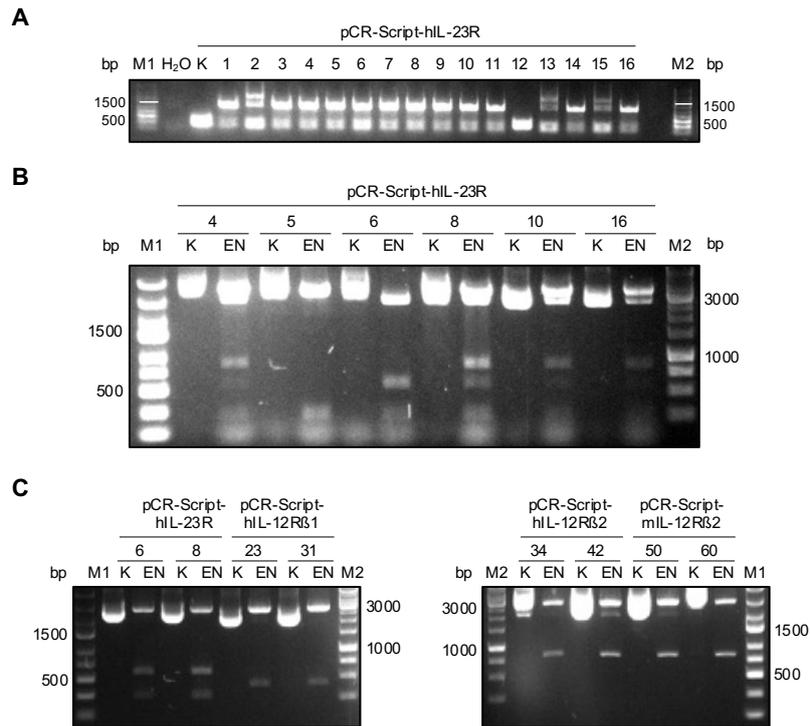


Abb. 6: Klonierung der Zytokinrezeptor tragenden pCR-Script Expressionsvektoren. A Die Analyse des hIL-23R tragenden pCR-Script Expressionsvektor wurde mittels colony-PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese durchgeführt. 1-16 bezeichnen die für die colony-PCR ausgewählten Klone. Die errechnete Fragmentlänge betrug 1128 bp. B Für die Analyse des hIL-23R tragenden pCR-Script Expressionsvektor mittels Minipräparation wurden die Klone 4, 5, 6, 8, 10 und 16 ausgewählt, mit EcoRI und NotI (EN) gespalten und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Als Kontrolle (K) wurde pro Rezeptorvariante eine nicht durch Restriktionsenzyme gespaltene Probe aufgetragen. Die errechneten Fragmentgrößen betragen 281, 596 und 2879 bp. C Die Isolierung der Plasmid-DNA der Zytokinrezeptor tragenden pCR-Script Expressionsvektoren erfolgte mittels Midipräparation. Hierfür wurden die Klone 6 und 8 für den hIL-23R tragenden pCR-Script Vektor, die Klone 23 und 31 für den hIL-12Rβ1 tragenden pCR-Script Vektor, die Klone 34 und 42 für den hIL-12Rβ2 tragenden pCR-Script Vektor und die Klone 50 und 60 für den mIL-12Rβ2 tragenden pCR-Script Vektor ausgewählt. Diese wurden mit EcoRI und NotI (EN) gespalten und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Als Kontrolle (K) wurde pro Rezeptorvariante eine nicht durch Restriktionsenzyme gespaltene Probe aufgetragen. Die errechneten Fragmentgrößen betragen 281, 596 und 2879 bp für den hIL-23R tragenden pCR-Script Vektor, 406 und 2879 bp für den hIL-12Rβ1 tragenden pCR-Script Vektor, 775 und 2879 bp für den hIL-12Rβ2 tragenden pCR-Script Vektor und 766 und 2879 bp für den mIL-12Rβ2 tragenden pCR-Script Vektor. DNA-Größenstandard in A, B und C: GeneRuler™ Express DNA Ladder (M1), GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (M2).

Putative Bakterienkolonien wurden mittels *colony*-PCR untersucht (vgl. Abschnitt 2.2.9). Anschließend erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA sowie die Restriktionsspaltung (vgl. Abschnitt 2.2.2). In Abb. 6 wurden für die Analyse mittels *colony*-PCR (A) und *Minipräparation* (B) beispielhaft ausschließlich pCR-Script-hIL-23R Klone dargestellt. Abb. 6C zeigt die Analyse isolierter Plasmide nach Midipräparation. Alle Plasmide wurden mittels EcoRI und NotI gespalten und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. Abschnitt 2.2.4) analysiert. Die erwarteten Fragmentgrößen betragen für pCR-Script-hIL-23R 281 bp, 596 bp und 2879 bp, für pCR-Script-hIL-12Rβ1 406 und 2879 bp, für pCR-Script-hIL-12Rβ2 775 und 2879 bp und für pCR-Script-mIL-12Rβ2 766 und 2879 bp. Die errechneten Fragmentgrößen stimmten mit der gelelektrophoretischen Darstellung der Vektoren pCR-Script-hIL-23R, pCR-Script-hIL-12Rβ1, pCR-Script-hIL-12Rβ2 und pCR-Script-mIL-12Rβ2 überein. Die anschließende Sequenzierung der Plasmid-DNA bestätigte die Vektoren.

Generierung der pcDNA3.1-SyCyR-Varianten

Der nächste Schritt zur Klonierung der SyCyR Plasmid-DNA für die Generierung stabiler Ba/F3-gp130-Zelllinien lag im Einbringen der für die verschiedenen Zytokinrezeptoren codierenden DNA-Abschnitte in den Expressionsvektor pcDNA3.1-myc-G_{VHH} (s. Abb. 7).

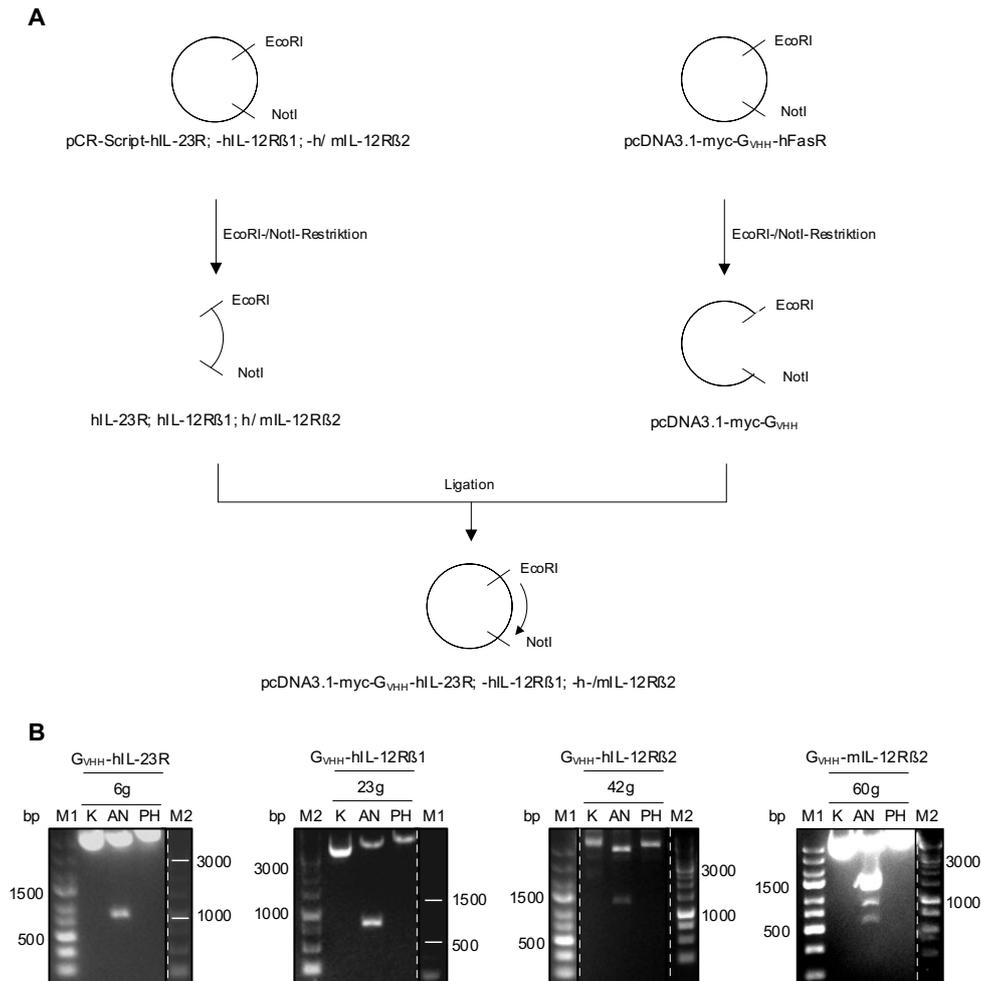


Abb. 7: Klonierung der G_{VHH} -SyCyR-Varianten des humanen IL-23R, IL-12R β 1, IL-12R β 2 sowie des murinen IL-12R β 2. **A** Aus den zuvor generierten pCR-Script Vektoren wurden die für den entsprechenden Zytokinrezeptor codierenden DNA-Abschnitte mittels Restriktionsverdau mit EcoRI und NotI herausgeschnitten. Diese *inserts* wurden in den ebenfalls mit EcoRI und NotI gespaltenen Expressionsvektor pcDNA3.1-myc- G_{VHH} -hFasR eingebracht. Durch die Restriktionsenzyme wurde der hFasR-Anteil des Vektors entfernt. Nach anschließender Ligation von Vektor und *insert* wurden somit die synthetischen Zytokinrezeptorvarianten pcDNA3.1-myc- G_{VHH} -hIL-23R, pcDNA3.1-myc- G_{VHH} -hIL-12R β 1, pcDNA3.1-myc- G_{VHH} -hIL-12R β 2 sowie pcDNA3.1-myc- G_{VHH} -mIL-12R β 2 hergestellt. Die so generierte Plasmid-DNA wurde anschließend per *colony*-PCR, Mini- und Midipräparation analysiert und isoliert. **B** Die Zytokinrezeptor tragenden pcDNA3.1 Expressionsvektoren wurden mit AflIII und NotI (AN) und mit PmeI und HindIII (PH) gespalten und mittels Agarosegelelektrophorese getrennt. Als Kontrolle (K) wurde pro Rezeptorvariante eine nicht durch Restriktionsenzyme gesplante Probe aufgetragen. 6g, 23g, 42g und 60g ist die Bezeichnung für die Klone, mit denen im Rahmen dieser Arbeit die weiteren Experimente durchgeführt wurden. Die errechneten Fragmentgrößen nach Spaltung durch AflIII und NotI betragen 755 und 5357 bp für den hIL-23R tragenden pcDNA3.1-myc- G_{VHH} Vektor, 880 und 5357 bp für den hIL-12R β 1 tragenden pcDNA3.1-myc- G_{VHH} Vektor, 1249 und 5357 bp für den hIL-12R β 2 tragenden pcDNA3.1-myc- G_{VHH} Vektor und 1240 und 5357 bp für den mIL-12R β 2 tragenden pcDNA3.1-myc- G_{VHH} Vektor. Die errechneten Fragmentgrößen nach Spaltung durch PmeI und HindIII betragen 6112 bp für den hIL-23R tragenden pcDNA3.1-myc- G_{VHH} Vektor, 6237 bp für den hIL-12R β 1 tragenden pcDNA3.1-myc- G_{VHH} Vektor, 6606 bp für den hIL-12R β 2 tragenden pcDNA3.1-myc- G_{VHH} Vektor und 6597 bp für den mIL-12R β 2 tragenden pcDNA3.1-myc- G_{VHH} Vektor. DNA-Größenstandard: *GeneRulerTM Express DNA Ladder* (M1), *GeneRulerTM 1kb DNA Ladder* (M2).

Die Restriktionsspaltung der Plasmide erfolgte mittels EcoRI und NotI. Hierdurch verlor das Plasmid des pcDNA3.1-G_{VHH} Vektors DNA-Abschnitte, die für den hFasR codierten. Ferner erfolgte für die zuvor generierten pCR-Script Vektoren ebenfalls die Restriktionsspaltung mittels EcoRI und NotI zur Gewinnung der für die entsprechenden Zytokinrezeptoren codierenden DNA-Abschnitte. Nach Agarosegelelektrophorese zur Trennung der gespaltenen DNA-Fragmente wurden sowohl der pcDNA3.1-myc-G_{VHH} Expressionsvektor als auch die für die entsprechenden Zytokinrezeptoren codierenden DNA-Abschnitte (*inserts*) per Gelextraktion isoliert (vgl. Abschnitt 2.2.4). Nach anschließender Ligation des pcDNA3.1-myc-G_{VHH} Expressionsvektors mit den für die verschiedenen Zytokinrezeptoren codierenden *inserts* erfolgte, analog zum Vorgehen bei der Subklonierung der pCR-Script Varianten, die Analyse und Isolierung der hergestellten Plasmid-DNA mittels *colony*-PCR (vgl. Abschnitt 2.2.9), *Mini*- und *Midipräparation* (vgl. Abschnitt 2.2.2) sowie anschließender Testrestriktion. Somit wurden die Expressionsvektoren pcDNA3.1-myc-G_{VHH}-hIL-23R, pcDNA3.1-myc-G_{VHH}-hIL-12Rβ1, pcDNA3.1-myc-G_{VHH}-hIL-12Rβ2 und pcDNA3.1-myc-G_{VHH}-mIL-12Rβ2 generiert.

Um die synthetischen C_{VHH}-Zytokinrezeptoren zu generieren, wurde analog zu den G_{VHH} Rezeptorvarianten vorgegangen. Die jeweiligen *inserts* wurden ebenfalls in pcDNA3.1-Vektoren eingebracht, jedoch wurde hierfür der Expressionsvektor pcDNA3.1-Flag-HA-C_{VHH}-hFasR genutzt (s. Abb. 8 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

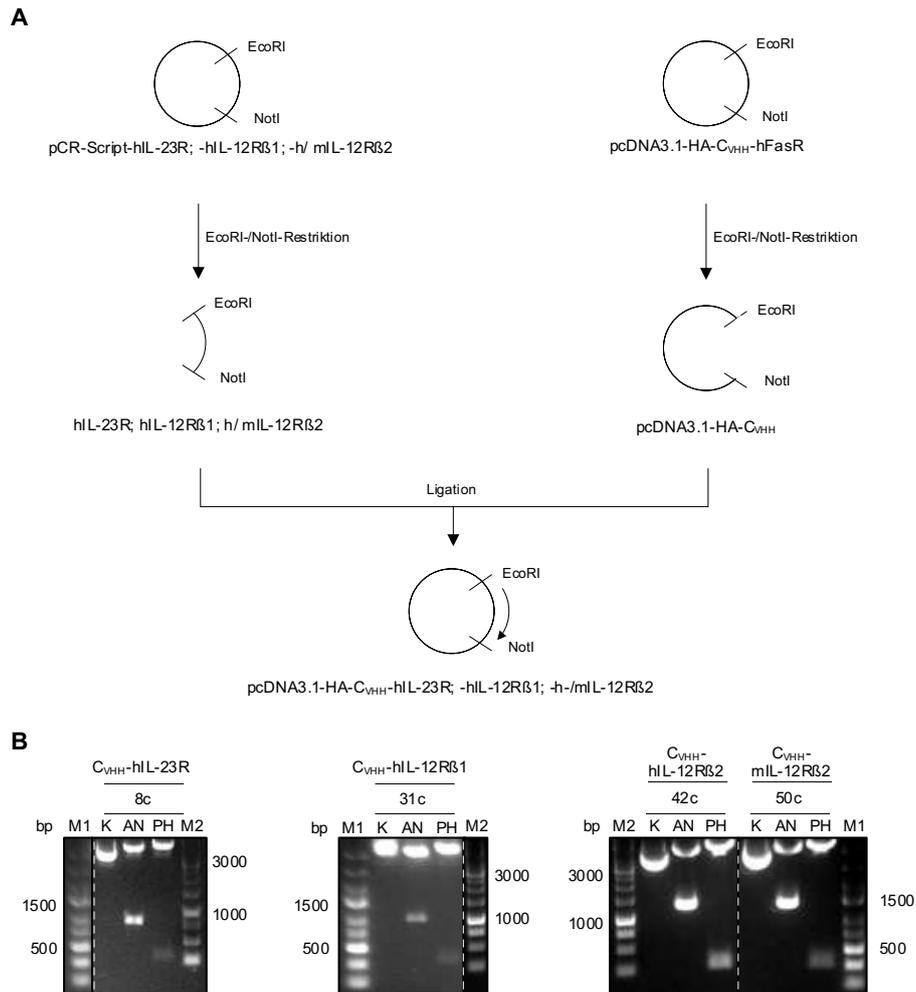


Abb. 8: Klonierung der CVHH-SyCyR-Varianten des humanen IL-23R, IL-12R β 1, IL-12R β 2 sowie des murinen IL-12R β 2. A Aus den zuvor generierten pCR-Script Vektoren wurden die für den entsprechenden Zytokinrezeptor codierenden DNA-Abschnitte mittels Restriktionsverdau mit EcoRI und NotI isoliert. Diese inserts wurden in den ebenfalls mit EcoRI und NotI gespaltenen Expressionsvektor pcDNA3.1-HA-CVHH-hFasR eingebracht. Durch die Restriktionsenzyme wurde der hFasR-Anteil des Vektors entfernt. Nach anschließender Ligation von Vektor und insert wurden somit die synthetischen Zytokinrezeptorvarianten pcDNA3.1-HA-CVHH-hIL-23R, pcDNA3.1-HA-CVHH-hIL-12R β 1, pcDNA3.1-HA-CVHH-hIL-12R β 2 sowie pcDNA3.1-HA-CVHH-mIL-12R β 2 hergestellt. Die so generierte Plasmid-DNA wurde anschließend per colony-PCR, Mini- und Midipräparation analysiert und isoliert. B Die Zytokinrezeptor tragenden pcDNA3.1 Expressionsvektoren wurden mit AflII und NotI (AN) und PmlI und HindIII (PH) gespalten und mittels Agarosegelelektrophorese getrennt. Als Kontrolle (K) wurde pro Rezeptorvariante eine nicht durch Restriktionsenzyme gesplante Probe aufgetragen. 8c, 31c, 42c und 50c sind die Bezeichnungen für die Klone, mit denen im Rahmen dieser Arbeit die weiteren Experimente durchgeführt wurden. Der besseren Übersicht halber kommen nur die Ergebnisse dieser Klone zur Darstellung. Die errechneten Fragmentgrößen nach Spaltung durch AflII und NotI betragen 815 und 5353 bp für den hIL-23R tragenden pcDNA3.1-HA-CVHH Vektor, 940 und 5353 bp für den hIL-12R β 1 tragenden pcDNA3.1-HA-CVHH Vektor, 1309 und 5353 bp für den hIL-12R β 2 tragenden pcDNA3.1-HA-CVHH Vektor und 1300 und 5353 bp für den mIL-12R β 2 tragenden pcDNA3.1-HA-CVHH Vektor. Die errechneten Fragmentgrößen nach Spaltung durch PmeI und HindIII betragen 311 und 5857 bp für den hIL-23R tragenden pcDNA3.1-HA-CVHH Vektor, 311 und 5982 bp für den hIL-12R β 1 tragenden pcDNA3.1-HA-CVHH Vektor, 311 und 6351 bp für den hIL-12R β 2 tragenden pcDNA3.1-HA-CVHH Vektor und 311 und 6342 bp für den mIL-12R β 2 tragenden pcDNA3.1-HA-CVHH Vektor. DNA-Größenstandard: GeneRulerTM Express DNA Ladder (M1), GeneRulerTM 1kb DNA Ladder (M2).

Im Gegensatz zum pcDNA3.1-myc-G_{VHH}-hFasR Vektor weist der pcDNA3.1-HA-C_{VHH}-hFasR Vektor in den extrazellulären Rezeptoranteilen mCherry-spezifische statt GFP-spezifische *nanobodies* und N-terminal den HA- statt des myc-tags auf. Der weitere Ablauf der Klonierung entspricht dem der Klonierung der G_{VHH}-SyCyR Plasmide. Hierdurch wurden die Expressionsvektoren pcDNA3.1-HA-C_{VHH}-hIL-23R, pcDNA3.1-HA-C_{VHH}-hIL-12Rβ1, pcDNA3.1-HA-C_{VHH}-hIL-12Rβ2 und pcDNA3.1-HA-C_{VHH}-mIL-12Rβ2 generiert.

Die hergestellten C_{VHH}- und G_{VHH}-cDNAs codierten extrazellulär somit sowohl für die jeweiligen zur Immunodetektion genutzten *tags* als auch für die entsprechenden *nanobodies*, intrazellulär blieb der jeweilige Anteil der Interleukinrezeptoren unverändert.

Transient transfizierte HEK293T-Zellen exprimieren SyCyRs der IL-12 Familie

Zum Nachweis einer Expression der SyCyRs auf eukaryotischen Zellen wurden HEK293T-Zellen mit den jeweiligen pcDNA3.1-SyCyR-Expressionsvektoren transient transfiziert (vgl. Abschnitt 2.3.2). Nach Herstellung der entsprechenden Zelllysate (vgl. Abschnitt 2.4.1) wurden die synthetischen Zytokinrezeptoren mittels α -HA bzw. α -myc Antikörper nachgewiesen (siehe Abb. 9B). Zusätzlich sind die Expressionskassetten der synthetischen Zytokinrezeptoren schematisch in Abb. 9A dargestellt.

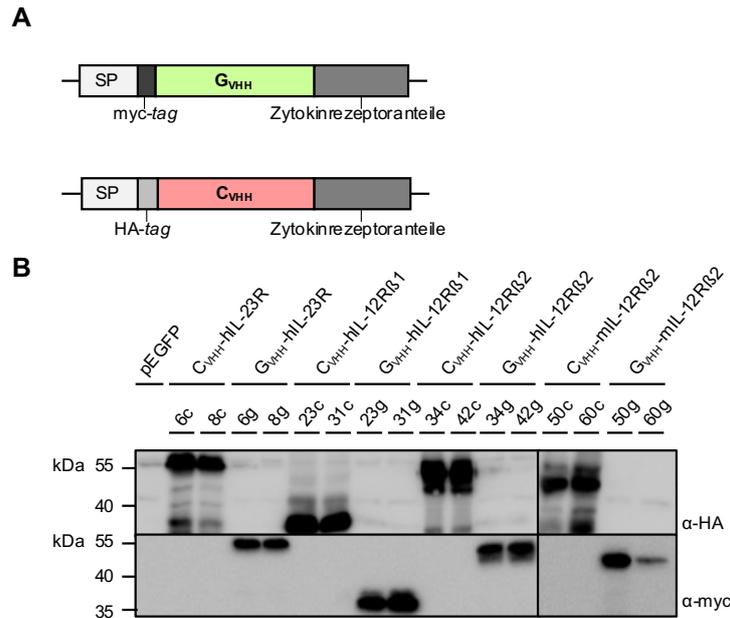


Abb. 9: Transiente Expression der synthetischen Rezeptoren der IL-12 Zytokinfamilie in eukaryotischen Zellen. **A** Schematische Darstellung der Expressionskassetten für die synthetischen Zytokinrezeptoren. Die Expressionskassette des G_{VHH}-Zytokinrezeptors besteht aus den Sequenzen für das Signalpeptid des IL-6R (SP), dem myc-tag, dem GFP-nanobody und den entsprechenden Zytokinrezeptoranteilen, bestehend aus 15 AS der extrazellulären Domäne, der Transmembrandomäne sowie der intrazellulären Domäne. Die Expressionskassette des C_{VHH}-Zytokinrezeptors ist analog aufgebaut, jedoch weist diese zwischen den Sequenzen für das Signalpeptid des IL-6R (SP) und dem mCherry-nanobody einen HA-tag auf. Modifiziert nach Engelowski *et al.* (37). **B** Transiente Expression der SyCyRs in HEK293T Zellen. 48h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Zelllysate mittels Western Blot unter Verwendung von α-HA sowie α-myc Antikörpern analysiert. Als Transfektions- und Negativkontrolle im Western Blot wurde das Plasmid pEGFP verwendet. Zwei putative Expressionsvektoren wurden jeweils analysiert, beispielsweise 6c und 8c für den synthetischen Zytokinrezeptor C_{VHH}-hIL-23R. Das erwartete Molekulargewicht lag für C_{VHH}-hIL-23R (6c, 8c) bei 49,1 kDa, für G_{VHH}-hIL-23R (6g, 8g) bei 46,8 kDa, für C_{VHH}-hIL-12Rβ1 (23c,31c) bei 31,3 kDa, für G_{VHH}-hIL-12Rβ1 (23g, 31g) bei 29 kDa, für C_{VHH}-hIL-12Rβ2 (34c, 42c) bei 45 kDa, für G_{VHH}-hIL-12Rβ2 (34g, 42g) bei 42,8 kDa, für C_{VHH}-mIL-12Rβ2 (50c, 60c) bei 45,2 kDa, für G_{VHH}-mIL-12Rβ2 (50g, 60g) bei 42,9 kDa.

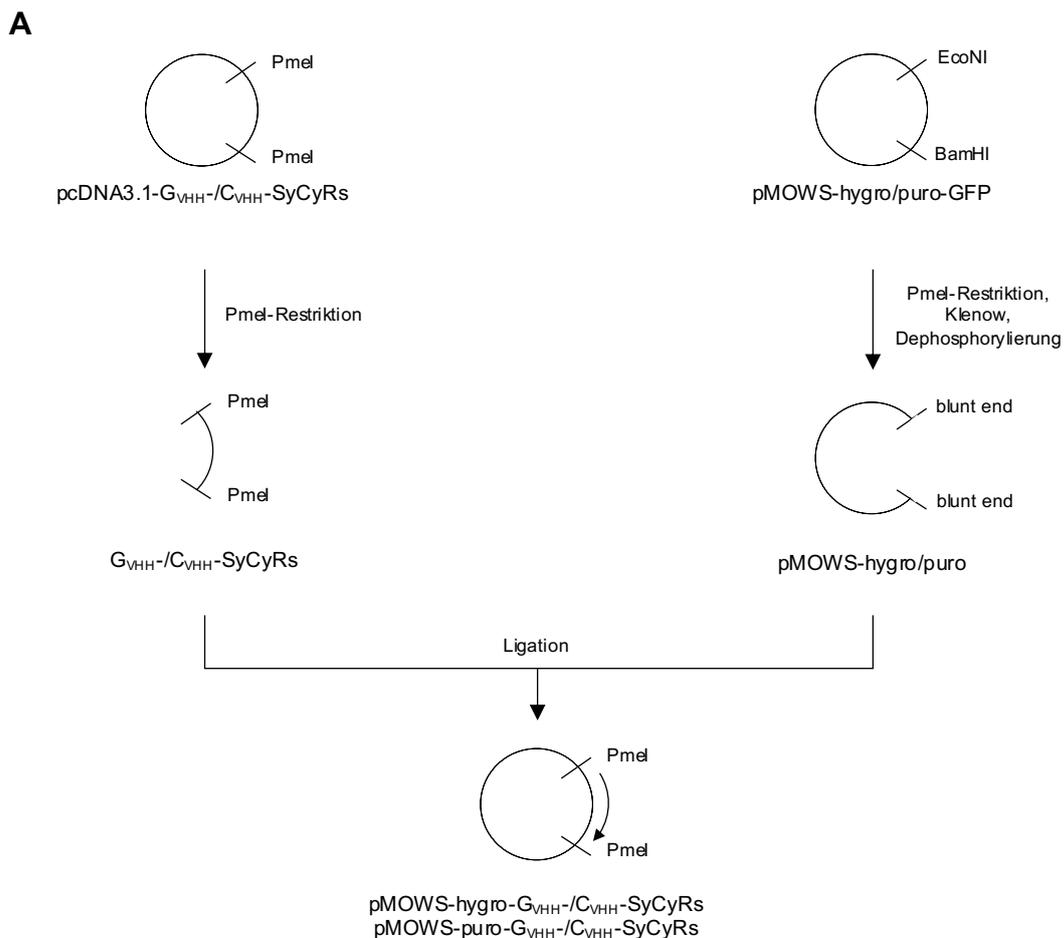
Sowohl die G_{VHH}- als auch die C_{VHH}-Expressionskassette besteht aus den Sequenzen des IL-6R Signalpeptids, des entsprechenden tags und nanobodies sowie des jeweiligen Zytokinrezeptoranteils. Dieser besteht aus 15 AS der entsprechenden extrazellulären Domäne zusätzlich der Transmembran- und der intrazellulären Domäne.

Da in dieser Arbeit jeweils zwei Klone pro SyCyR- cDNA hergestellt wurden, sind im Western Blot ebenfalls je 2 Proteinbanden pro SyCyR-cDNA zu erkennen. Die Proteine wurden entsprechend ihres Molekulargewichts mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese (vgl. Abschnitt 2.4.3) voneinander getrennt und im Western Blot durch Einsatz der entsprechenden Antikörper visualisiert. Die erwarteten Molekulargewichte sind in der Abbildungsbeschriftung aufgeführt (siehe Abb. 9). Die verminderte Bandenintensität des zweiten Klons des G_{VHH}-mIL-12Rβ2 (60g) spricht für eine verminderte Rezeptorexpression. Da die Immunodetektion jedoch gut sichtbar vorliegt, ist von einem erfolgreichen Transfektionsprozess jedes einzelnen Klons auszugehen.

3.2.2 Erzeugung stabiler Ba/F3-gp130-SyCyR Zelllinien

Generierung der pMOWS-SyCyR-Varianten

Nach der erfolgreichen Klonierung der codierenden DNA für die verschiedenen SyCyR-Konstrukte in den Expressionsvektor pcDNA3.1 und der Testexpression in HEK293T Zellen wurden diese in die retroviralen Vektoren pMOWS-hygro und pMOWS-puro übertragen. Die pMOWS Vektoren wurden im weiteren Verlauf für die retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen zur Generierung stabiler Zelllinien genutzt (vgl. Abschnitt 2.3.3). Hierfür wurden die für die 4 verschiedenen G_{VHH} -SyCyRs und die 4 verschiedenen C_{VHH} -SyCyRs codierenden DNA-Abschnitte sowohl in pMOWS-hygro als auch in pMOWS-puro eingebracht (s. Abb. 10). Dies resultierte in 16 verschiedenen pMOWS-SyCyR-Vektoren.



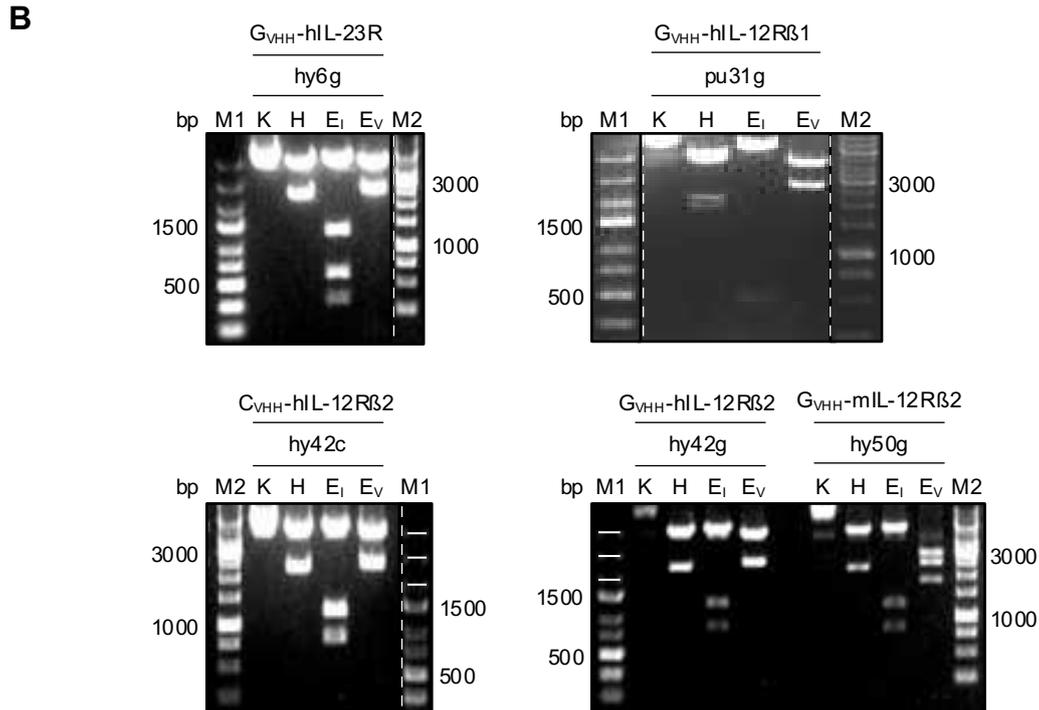


Abb. 10: Klonierung der verschiedenen SyCyR-Varianten des humanen IL-23R, IL-12R β 1, IL-12R β 2 sowie des murinen IL-12R β 2. A Aus den zuvor generierten pcDNA3.1 Vektoren wurden die für den entsprechenden Zytokinrezeptor codierenden DNA-Abschnitte mittels Restriktionsverdau mit PmeI herausgeschnitten. Diese *inserts* wurden in die ebenfalls mit PmeI gespaltenen retroviralen Vektoren pMOWS-puro-GFP sowie pMOWS-hygro-GFP eingebracht. Durch die Restriktionsenzyme wurde der GFP-Anteil des Vektors herausgeschnitten. Nach anschließender Klenowbehandlung und Dephosphorylierung wurden Vektor und *insert* ligiert. Somit entstand für jede synthetische Zytokinrezeptorvariante je ein pMOWS-puro- bzw. -hygro-Vektor. Dies galt sowohl für die C_{VHH} als auch für die G_{VHH} Rezeptorvarianten. Die so generierte Plasmid-DNA wurde anschließend per *colony*-PCR, Mini- und Midipräparation analysiert und isoliert. **B** Die Zytokinrezeptor tragenden retroviral pMOWS Vektoren wurden mit HindIII (H), EcoRI (E_I) und EcoRV (E_V) gespalten und mittels Agarosegelelektrophorese getrennt. Als Kontrolle (K) wurde pro Rezeptorvariante eine nicht durch Restriktionsenzyme gesplante Probe aufgetragen. Hy6g, pu31g, hy42c/g und hy50g sind die Bezeichnungen für die Klone, mit denen im Rahmen dieser Arbeit die weiteren Experimente durchgeführt wurden. Der besseren Übersicht halber kommen nur die Ergebnisse dieser Klone zur Darstellung. Fragmentgrößen (bp): hy6g: H: 2354+5177, E_I: 317+596+1219+5399, E_V: 75+2502+4894; pu31g: H: 1883+4750, E_I: 442+6191, E_V: 75+2502+4056; hy42c: H: 2308+5117, E_I: 807+1219+5399, E_V: 75+2502+4848; hy42g: H: 2253+5117, E_I: 811+1219+5399, E_V: 75+2502+4792; hy50g: H: 2243+5117, E_I: 802+1219+5399, E_V: 75+1813+2502+2970. DNA-Größenstandard: *GeneRuler*TM *Express DNA Ladder* (M1), *GeneRuler*TM *1kb DNA Ladder* (M2).

Für die Klonierung der retroviralen, synthetische Zytokinrezeptor tragenden pMOWS Vektoren wurden die jeweiligen pcDNA3.1-SyCyR-Vektoren mittels PmeI restriktiv gespalten. Hierdurch wurden die für die entsprechenden synthetischen Zytokinrezeptor codierenden DNA-Abschnitte (*inserts*) freigesetzt, konnten isoliert werden und standen zur Klonierung in die pMOWS-puro und -hygro Vektoren zur Verfügung. Nach erfolgter Klenow-Behandlung (vgl. Abschnitt 2.2.7) sowie Dephosphorylierung (vgl. Abschnitt 2.2.5) der mit EcoNI und BamHI gespaltenen pMOWS Vektoren wurden diese mit den *inserts* ligiert. Daraufhin wurden die bekannten Klonierungsschritte zur Generierung der Plasmid-DNA durchgeführt, bestehend aus Transformation der Ligationsprodukte (vgl. Abschnitt 2.2.1), *colony*-PCR (vgl. Abschnitt 2.2.9) sowie Plasmid-DNA-Mini- und Midipräparation (vgl. Abschnitt 2.2.2). Die Ergebnisse

der Spaltung der durchgeführten Midipräparation sind in Abb. 10 (B) dargestellt und entsprechen den erwarteten Fragmentgrößen. Hierbei kommen der besseren Übersicht halber ausschließlich die cDNAs zur Darstellung, die im weiteren Verlauf der Arbeit für Analysen genutzt wurden. Letztendlich wurden durch die in Abb. 10 dargestellten Klonierungsschritte sowohl für den retroviralen pMOWS-puro als auch pMOWS-hygro Vektor die verschiedenen G_{VHH} - bzw. C_{VHH} -spezifischen synthetischen Zytokinrezeptorvarianten vom hIL-23R, hIL-12R β 1, hIL-12R β 2 und mLIL-12R β 2 generiert. Sie wurden daraufhin retroviral in Ba/F3-gp130 Zellen transduziert (siehe nächster Abschnitt) und diese anschließend in verschiedenen Ansätzen analysiert.

Retrovirale Transduktion der pMOWS Vektoren

Zur Generierung stabiler Zelllinien wurden in dieser Arbeit Ba/F3-gp130-Zellen verwendet. Durch retrovirale Transduktion (vgl. Abschnitt 2.3.3) wurde die cDNA für die verschiedenen zuvor hergestellten synthetischen Zytokinrezeptoren in die Ba/F3-gp130-Zellen eingebracht. Zusätzlich wurden Ba/F3-gp130 Zelllinien, die bereits den entsprechenden natürlichen Zytokinrezeptor trugen, retroviral mit der cDNA der SyCyRs transduziert. So wurden für die hIL-23R-Varianten die Zelllinien hIL-23R/ G_{VHH} -hIL-23R sowie hIL-23R/ C_{VHH} -hIL-23R, für die hIL-12R β 1-Varianten die Zelllinien hIL-12R β 1/ G_{VHH} -hIL-12R β 1 sowie hIL-12R β 1/ C_{VHH} -hIL-12R β 1, für die hIL-12R β 2-Varianten die Zelllinien hIL-12R β 2/ G_{VHH} -hIL-12R β 2 sowie hIL-12R β 2/ C_{VHH} -hIL-12R β 2 und für die mLIL-12R β 2-Varianten die Zelllinien mLIL-12R β 2/ G_{VHH} -mLIL-12R β 2 und mLIL-12R β 2/ C_{VHH} -mLIL-12R β 2 hergestellt.

Alle generierten Zelllinien wurden mittels Durchflusszytometrie (vgl. Abschnitt 2.3.4) hinsichtlich der Expression der synthetischen Zytokinrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche untersucht. Hierfür wurden *myc-tag* tragende G_{VHH} -Zelllinien mit dem α -myc-Primärantikörper, *HA-tag* tragende C_{VHH} -Zelllinien mit dem α -HA-Primärantikörper inkubiert und anschließend analysiert. In Abb. 11 sind die Histogramme der erzeugten transduzierten Zelllinien nach Durchflusszytometrie dargestellt, welche in dieser Arbeit für weitere Analysen genutzt wurden. Hierbei handelt es sich außer bei der Zelllinie C_{VHH} -hIL-12R β 2 um die GFP-spezifischen SyCyR-Varianten der verschiedenen Interleukinrezeptoren (G_{VHH} -hIL-23R, G_{VHH} -hIL-12R β 1, G_{VHH} -hIL-12R β 2 und G_{VHH} -mLIL-12R β 2).

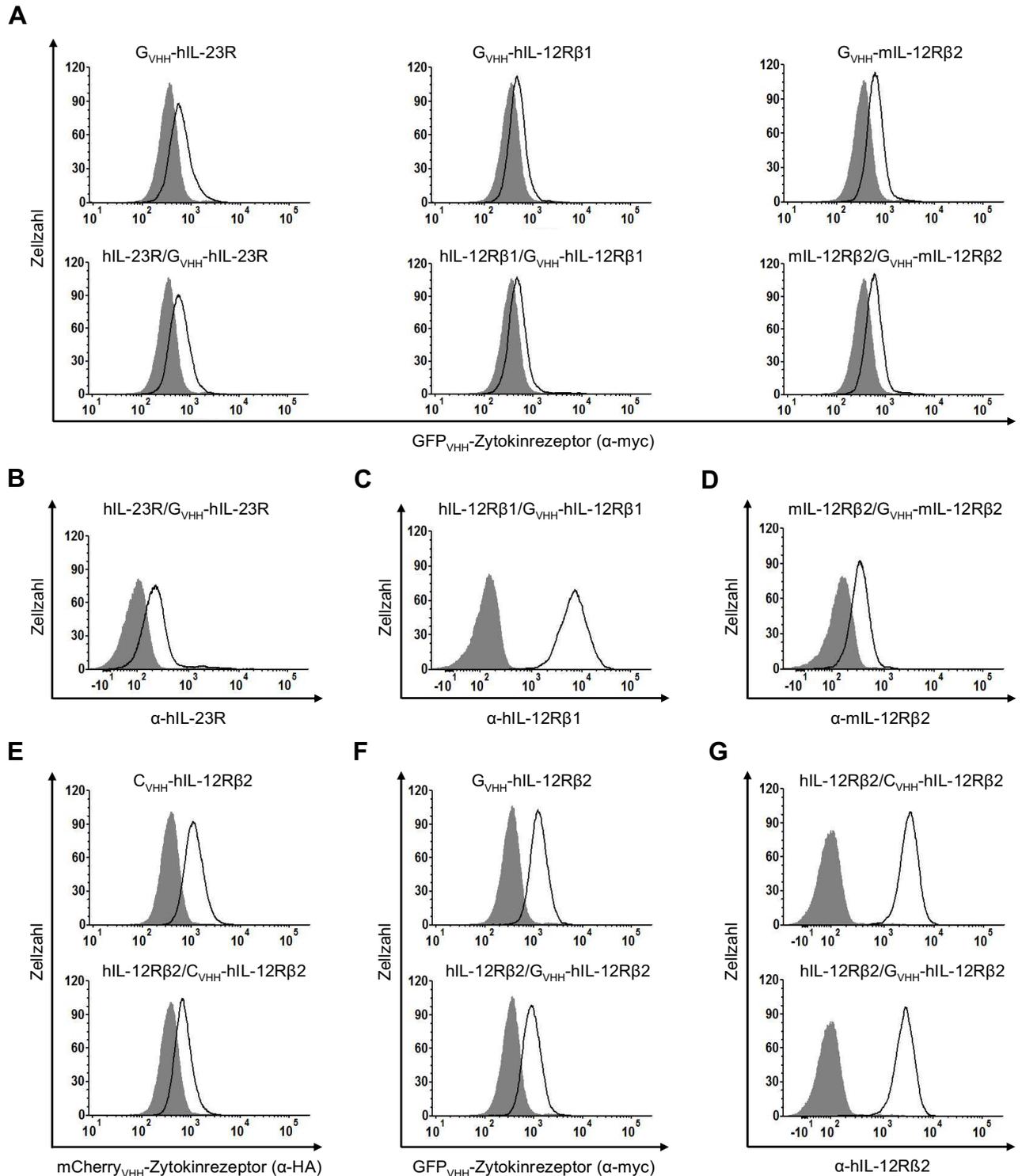


Abb. 11: Analyse der Oberflächenexpression der synthetischen Zytokinrezeptoren auf transduzierten Ba/F3-gp130 Zelllinien. A, E, F Die abgebildeten Ba/F3-gp130 Zelllinien wurden hinsichtlich der Expression der synthetischen Zytokinrezeptoren mittels Durchflusszytometrie untersucht. Für den Nachweis der GFP-SyCyRs wurden anti-myc Antikörper, für den Nachweis der mCherry-SyCyRs anti-HA Antikörper verwendet. Die x-Achse repräsentiert ein Maß für die Fluoreszenzintensität und dient somit auch als Indikator für die Oberflächenexpression. Die y-Achse steht für die Anzahl der analysierten Zellen. Die grauen Histogramme repräsentieren Ba/F3-gp130 Zellen ohne Expression der synthetischen Zytokinrezeptoren und dienen als Negativkontrolle. Die schwarz umrandeten Histogramme stellen Histogramme der SyCyR exprimierenden Zellen dar. B-D, G Analyse der Oberflächenexpression der Wildtyprezeptoren der abgebildeten Ba/F3-gp130 Zelllinien. Der Nachweis der physiologischen Zytokinrezeptoren erfolgte mit spezifischen Antikörpern, die gegen die extrazellulären Domänen des entsprechenden Rezeptors gerichtet sind.

Die erkennbaren Rechtsverschiebungen der schwarz umrandeten, nicht gefüllten Kurven bedeuten, dass es bei den analysierten, den entsprechenden synthetischen Zytokinrezeptor tragenden, Zelllinien im Gegensatz zu untransduzierten Ba/F3-gp130-Zellen zu einer Bindung der jeweiligen Primärantikörper kam. Durch die anschließende Bindung des Sekundärantikörpers mit dem Fluorophor stieg die Fluoreszenzintensität der markierten Zellen an und das Histogramm ist auf der x-Achse nach rechts verschoben. Die untransduzierten, als Negativkontrolle dienenden, Ba/F3-gp130-Zellen ohne Expression der synthetischen Zytokinrezeptoren werden durch die grauen Histogramme dargestellt. Aufgrund der fehlenden Interaktion mit den entsprechenden Antikörpern kam es zu keiner Rechtsverschiebung auf der x-Achse. Anhand dieser Ergebnisse wurde für alle dargestellten Ba/F3-gp130 Zelllinien die erfolgreiche retrovirale Transduktion und somit Expression der synthetischen Zytokinrezeptoren auf deren Zelloberfläche nachgewiesen.

3.2.3 Ba/F3-gp130 Zellen mit den synthetischen Zytokinrezeptoren sind funktionell aktiv

Nach dem Nachweis der Oberflächenexpression wurden Zellviabilitätsanalysen (vgl. Abschnitt 2.3.5) und Stimulationsassays (vgl. Abschnitt 2.3.6) zur funktionellen Charakterisierung der synthetischen Rezeptoren durchgeführt. Die Experimente wurden sowohl an ausschließlich den entsprechenden synthetischen Zytokinrezeptor tragenden als auch an zusätzlich den entsprechenden physiologischen Zytokinrezeptor tragenden Ba/F3-gp130 Zelllinien durchgeführt. Hierfür wurden die generierten stabilen Zelllinien sowohl mittels Zytokin (HmIL-23, HhIL-12, HmIL-12) als auch mittels Dimer des spezifischen synthetischen Liganden (2xGFP, 2xmCherry) stimuliert und in ihrer Aktivität miteinander verglichen (siehe Abb. 5). Die verwendeten Designerzytokine sind über einen *linker* verbundene Fusionsproteine von IL-12p40 mit der entsprechenden α -Untereinheit. Für HmIL-23 wurde hierfür IL23p19, für HhIL-12 und HmIL-12 IL12p35 genutzt (31,38). HmIL-23 und HmIL-12 sind murinen, HhIL-12 humanen Ursprungs. Da kein entsprechender ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) zur Quantifizierung der konditionierten Zellkulturüberstände von HhIL-12 und 2xmCherry zur Verfügung stand, konnte die genaue Konzentration dieser nicht bestimmt werden. Die Angabe der Konzentrationen erfolgte bei Letzteren in % und bezieht sich auf das Volumen des Mediums.

Die verschiedenen Ba/F3-gp130 Zelllinien wurden mit verschiedenen Liganden stimuliert und nach drei Tagen die Zellviabilität bestimmt. Die Zellviabilität repräsentiert das Proliferationsverhalten der Zelllinien in Gegenwart des Liganden. Sie wurde im Rahmen der

Assays über das Fluoreszenzsignal von Resorufin ermittelt und ist auf der x-Achse dargestellt. Als Positivkontrolle diente die Stimulation der analysierten Zelllinien mit HIL-6. Hyper-IL-6 ist ein Designerzytokin bestehend aus dem löslichen IL-6R (sIL-6R) und IL-6 (80). Durch direkte Interaktion mit gp130 führt HIL-6 zur Aktivierung des IL-6 Signalweges.

Als Negativkontrolle blieben die Zellen unstimuliert, um eine ligandenunabhängige Aktivität der synthetischen Zytokinrezeptoren auszuschließen. Zusätzlich erfolgte die Analyse untransduzierter Ba/F3-gp-130-Zellen, um eine von den synthetischen Zytokinrezeptoren unabhängige Proliferation durch den Einsatz der Zytokine oder der synthetischen Liganden auszuschließen.

Abschließend wurde die Signaltransduktion hinsichtlich der Phosphorylierung von STAT3 und -5 für den JAK/STAT- und von ERK1/2 für den MAPK/ERK-Signalweg untersucht. Die Liganden wurden hierfür in zwei verschiedenen Konzentrationen für die Stimulation eingesetzt. Nach Stimulation mit dem entsprechenden Liganden für 30 min wurden Zelllysate der stimulierten Zellen hergestellt und diese anschließend per Western Blot ausgewertet. Hierfür wurden jeweils gleiche Mengen an Gesamtprotein pro Spur aufgetragen und ein Proteinnachweis unter Einsatz spezifischer Antikörper durchgeführt.

Synthetische hIL-12R β 2 Rezeptoren repräsentieren ein funktionelles hIL-12R β 2 Dimer

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl GFP- als auch mCherry-spezifische synthetische Zytokinrezeptorvarianten des hIL-12R β 2 hergestellt und analysiert (siehe Abb. 12 und Abb. 13).

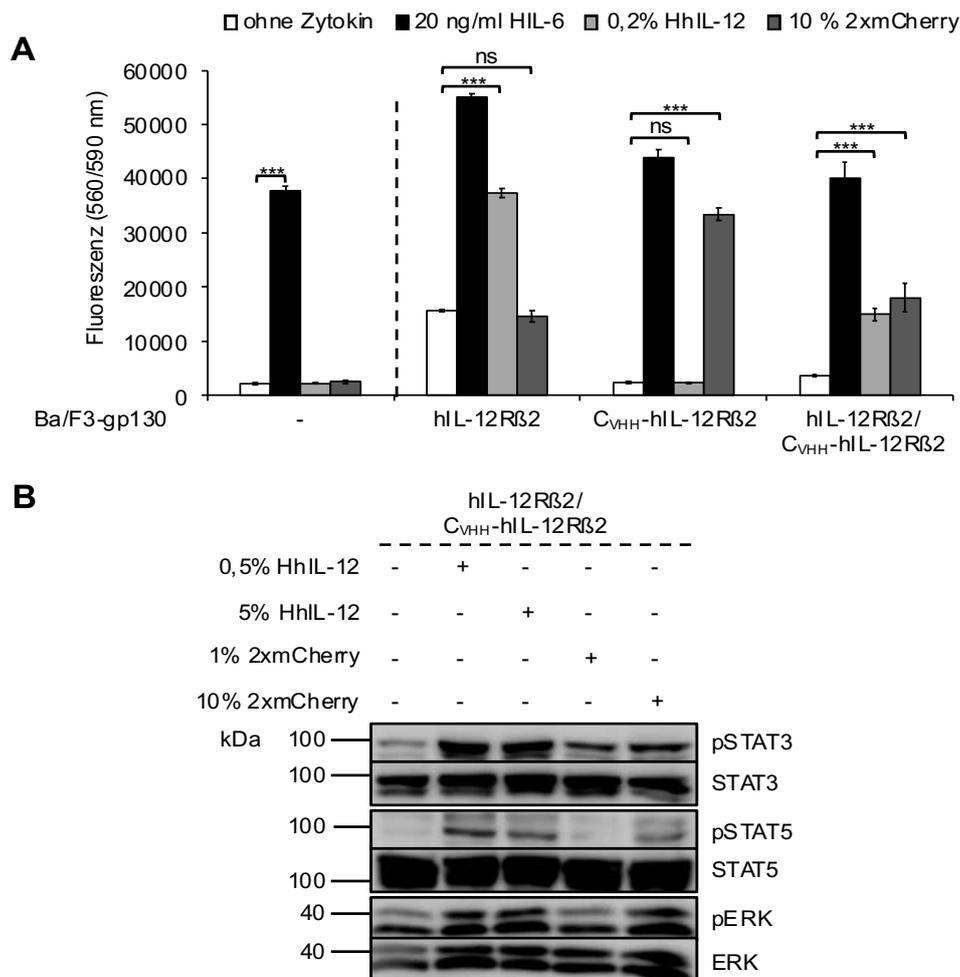


Abb. 12: Die Dimerisierung von hIL-12R β 2 aktiviert den JAK/STAT- sowie MAPK-Signalweg und induziert die Zellproliferation. **A** Die angegebenen Ba/F3-gp130 Zelllinien wurden mit 20 ng/ml HIL-6 sowie 0,2% HhIL-12 und 10% 2xmCherry für 72 Stunden stimuliert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nicht behandelt. Für diesen Nachweis wurden jeweils 5000 Zellen pro *well* ausgesät. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation 560 nm/ Emission 590 nm) repräsentiert ein Maß für die Proliferation der Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus Triplikaten. Ein repräsentatives Experiment von $n=3$ ist abgebildet. ns nicht signifikant, *** $p \leq 0,001$. **B** Ba/F3-gp130-hIL-12R β 2/C_{VHH}-hIL-12R β 2 Zellen wurden mit den angegebenen Liganden für 30 min stimuliert. Nach Herstellung der Zelllysate wurden diese mittels Western Blot analysiert. Gleiche Mengen an Gesamtprotein (50 μ g) wurden pro Spur aufgetragen. Der Nachweis der Signalproteine erfolgte mittels Antikörper. Ein repräsentatives Experiment von $n=3$ ist abgebildet.

Der Zellviabilitätsassay zur Analyse des synthetischen C_{VHH}-hIL-12R β 2 Zytokinrezeptors (siehe Abb. 12A) wies die Proliferation der untransduzierten Ba/F3-gp130-Zellen unter HIL-6-Stimulation nach. Die mit der cDNA des hIL-12R β 2 transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen zeigten ebenfalls unter HIL-6- und HIL-12-Stimulation eine zytokinabhängige Proliferation, welche jedoch für die Stimulation mit HIL-12 nicht so ausgeprägt war. Da in dieser Zelllinie hIL-12R β 2 und gp130 exprimiert sind, ließ sich schlussfolgern, dass die Proliferation durch eine Homodimerisierung des hIL-12R β 2 mit anschließender Signalweiterleitung induziert wurde. Der synthetische Ligand 2xmCherry induzierte sowohl bei diesen als auch bei untransduzierten Ba/F3-gp130 Zellen keine Proliferation, wodurch eine rezeptorunabhängige

Aktivierung durch das fluoreszierende Protein ausgeschlossen wurde. Ba/F3-gp130 Zellen, die mit der für den C_{VHH}-hIL-12R β 2 codierenden DNA transduziert wurden, proliferierten unter HIL-6- (Positivkontrolle) und 2xmCherry-Stimulation, jedoch nicht unter HhIL-12-Stimulation. Dies entsprach dem erwarteten Ergebnis, da der extrazelluläre Rezeptoranteil des synthetischen Rezeptors nicht mehr dem des hIL-12R β 2 entsprach, sondern Anteile dessen durch den mCherry-spezifischen *nanobody* ersetzt wurden (vgl. Abschnitt 3.2.1). Nach extrazellulärer Bindung des synthetischen Liganden 2xmCherry wurde durch intrazelluläre Signalweiterleitung eine Proliferation der stimulierten Zellen induziert. Da in dieser Zelllinie ausschließlich der C_{VHH}-hIL-12R β 2 und der gp130-Rezeptor exprimiert wurden, bedeutet eine Proliferation unter 2xmCherry-Stimulation eine funktionell aktive Homodimerisierung des synthetischen Rezeptors C_{VHH}-hIL-12R β 2. Da der intrazelluläre Anteil des Rezeptors nicht verändert worden war, entsprach die intrazelluläre Signalweiterleitung weiterhin der des physiologischen hIL-12R β 2. Die sowohl den physiologischen als auch synthetischen Zytokinrezeptor exprimierende Co-Zelllinie hIL-12R β 2/C_{VHH}-hIL-12R β 2 wies unter HIL-6-, HhIL-12- und 2xmCherry-Stimulation eine Zellproliferation auf. Da diese Zellen neben dem gp130-Rezeptor sowohl den physiologischen hIL-12R β 2 als auch den synthetischen C_{VHH}-hIL-12R β 2 Rezeptor exprimierten, konnte über Bindung von HhIL-12 am Wildtyprezeptor sowie von 2xmCherry am synthetischen Zytokinrezeptor eine Zellproliferation induziert werden. Diese stellt eine zur Signaltransduktion führende Homodimerisierung sowohl des physiologischen hIL-12R β 2 als auch des synthetischen C_{VHH}-hIL-12R β 2 Rezeptors dar. Eine durch Heterodimerisierung von gp130 und hIL-12R β 2 induzierte Aktivität war auszuschließen, da die Stimulation mit HhIL-12 und nicht mit IL-35, welches die Heterodimerisierung von gp130 und hIL-12R β 2 induziert, erfolgte (12,82). Die vergleichsweise geringeren Proliferationsraten unter HhIL-12- und 2xmCherry-Stimulation lassen eine verminderte Expression des physiologischen hIL-12R β 2 und des synthetischen C_{VHH}-hIL-12R β 2 Rezeptors in der mit diesen transduzierten Ba/F3-gp130 Zelllinie, im Vergleich zu den ausschließlich den jeweiligen Rezeptor exprimierenden Zellen, vermuten. Die in Abb. 11 dargestellte Analyse der Oberflächenexpression der entsprechenden Rezeptoren auf transduzierten Ba/F3-gp130 Zelllinien bestätigt dies zusätzlich.

Anschließend wurde die sowohl den physiologischen hIL-12R β 2 als auch den synthetischen C_{VHH}-hIL-12R β 2 Rezeptor tragende Ba/F3-gp130 Zelllinie bezüglich der Signaltransduktion analysiert. Hierfür wurde nach Durchführung eines Stimulationsassays (vgl. Abschnitt 2.3.6) die Phosphorylierung von STAT3, STAT5 und ERK1/2 mittels Western Blot analysiert (siehe Abb. 12B). Die Zellen wurden jeweils mit 0,5 und 5% HhIL-12 sowie 1 und 10% 2xmCherry

stimuliert. Um eine ligandenunabhängige Aktivität auszuschließen, blieben die Zellen in einem Ansatz unstimuliert. Durch die Proteinvisualisierung mittels Western Blot war eine Phosphorylierung von STAT3, STAT5 und ERK1/2 für beide mit HhIL-12 stimulierten Ansätze sowie für den mit 10% 2xmCherry stimulierten Ansatz nachweisbar. Der mit 1% 2xmCherry stimulierte Ansatz zeigte lediglich die Phosphorylierung von STAT3. Im unstimulierten Ansatz kam es wie erwartet zu keiner Aktivierung von STAT3, STAT5 oder ERK1/2. Somit wurde die funktionelle Aktivität der sowohl den physiologischen hIL-12R β 2 als auch den synthetischen C_{VHH}-hIL-12R β 2 Rezeptor tragenden Ba/F3-gp130 Zelllinie bezüglich der Signaltransduktion nach spezifischer Stimulation für den JAK/STAT- und den MAPK/ERK-Signalweg nachgewiesen. Da die Expression von STAT4 in Ba/F3 Zellen für eine Detektion mittels Western Blot zu niedrig ist, wurde auf die STAT4-Analyse im Stimulationsassay verzichtet (83).

Abschließend wurde die sowohl den physiologischen hIL-12R β 2 als auch den synthetischen C_{VHH}-hIL-12R β 2 Rezeptor tragende Ba/F3-gp130 Zelllinie in einem Zellviabilitätsassay mit steigenden Konzentrationen an HhIL-12 bzw. synthetischem Liganden (siehe Abb. 13) untersucht.

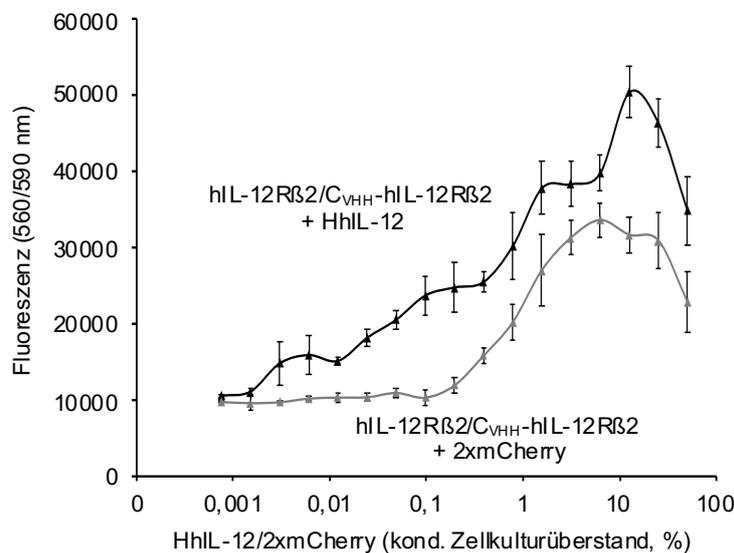


Abb. 13: Proliferation von Ba/F3-gp130-hIL-12R β 2/C_{VHH}-hIL-12R β 2 Zellen nach Stimulation mit HhIL-12 oder synthetischem Liganden. Die Ba/F3-gp130-hIL-12R β 2/C_{VHH}-hIL-12R β 2 Zellen wurden mit dem Zytokin HhIL-12 oder dem synthetischen Liganden 2xmCherry in aufsteigenden Konzentrationen kultiviert. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation 560 nm/ Emission 590 nm) repräsentiert ein Maß für die Proliferation der Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus Triplikaten. Ein repräsentatives Experiment von n=3 ist abgebildet.

Die Ergebnisse entsprechen denen des zuvor dargestellten Proliferationsassays (siehe Abb. 12A) und bestätigen die, durch Homodimerisierung der entsprechenden Rezeptoren induzierte, funktionelle Aktivität der synthetischen Zytokinrezeptoren. Zu Beginn zeigte sich in beiden Versuchsansätzen ein Anstieg der Zellproliferation unter Stimulation mit höheren Konzentrationen. Ab Konzentrationen von ungefähr 10%iger Stimulanzugabe fallen die Kurven jedoch wieder ab. Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter Stimulation mit höheren Konzentrationen in verschiedenen Experimenten ein Abfall der Zellproliferation beobachtet. Dies kann den hohen Konzentrationen der eingesetzten Zellkulturüberstände geschuldet sein. In zukünftigen Studien sollen daher gereinigte rekombinante Proteine eingesetzt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden weiterhin synthetische hIL-12R β 2 Rezeptoren, die extrazellulär über einen GFP_{VHH} verfügen, analysiert.

Im Zellviabilitätsassay (siehe Abb. 14A) zeigte sich das erwartete Ergebnis der verschiedenen Ba/F3-gp130 Zelllinien.

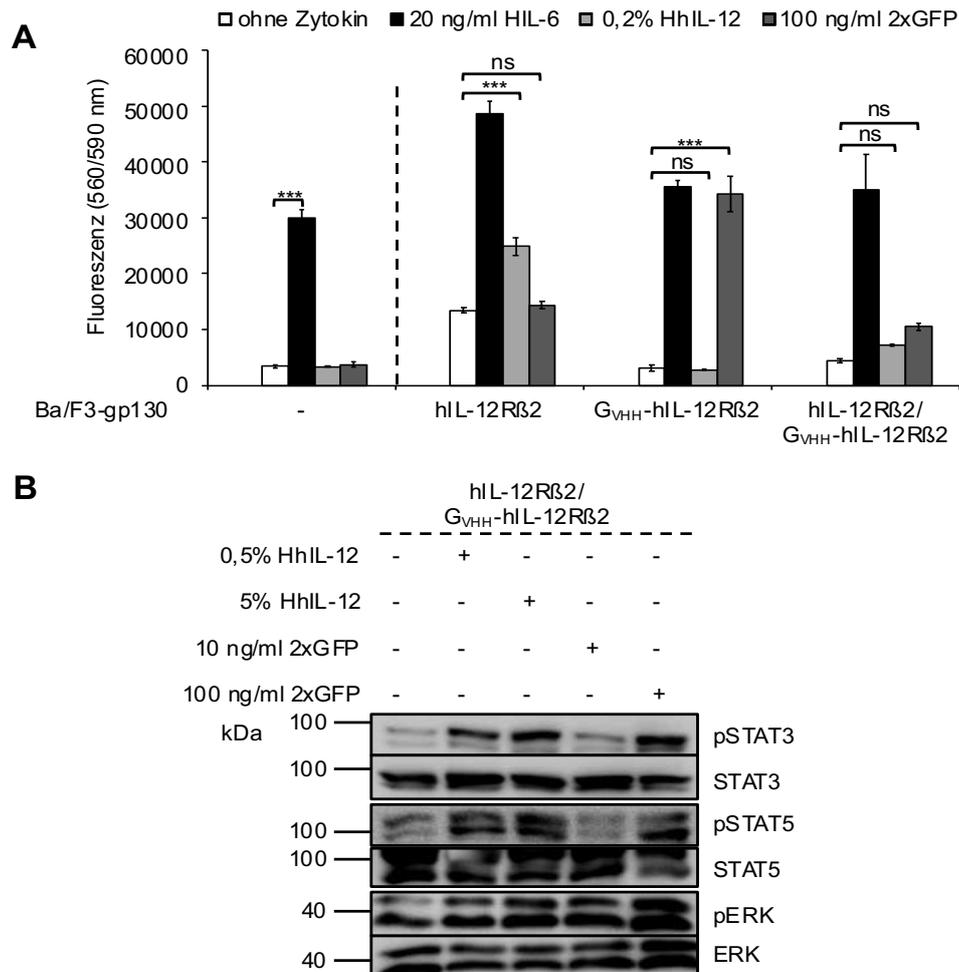


Abb. 14: Die Dimerisierung von hIL-12R β 2 aktiviert den JAK/STAT- sowie MAPK-Signalweg und induziert die Zellproliferation. **A** Die angegebenen Ba/F3-gp130 Zelllinien wurden mit 20 ng/ml HIL-6 sowie 0,2% HhIL-12 und 100 ng/ml 2xGFP für 72 Stunden stimuliert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nicht behandelt. Für diesen Nachweis wurden jeweils 5000 Zellen pro *well* ausgesät. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation 560 nm/ Emission 590 nm) repräsentiert ein Maß für die Proliferation der Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus Triplikaten. Ein repräsentatives Experiment von $n=3$ ist abgebildet. ns nicht signifikant, *** $p \leq 0,001$. **B** Ba/F3-gp130-hIL-12R β 2/G_{VHH}-hIL-12R β 2 Zellen wurden mit den angegebenen Liganden für 30 min stimuliert. Nach Herstellung der Zelllysate wurden diese mittels Western Blot analysiert. Gleiche Mengen an Gesamtprotein (50 μ g) wurden pro Spur aufgetragen. Der Nachweis der Signalproteine erfolgte mittels Antikörper. Ein repräsentatives Experiment von $n=3$ ist abgebildet.

Die Kontrollzelllinien Ba/F3-gp130 und hIL-12R β 2 proliferierten jeweils unter HIL-6-Stimulation, die den hIL-12R β 2 exprimierende Zelllinie zusätzlich unter HhIL-12 Stimulation. Ba/F3-gp130-G_{VHH}-hIL-12R β 2 Zellen verzeichneten eine ausgeprägte HIL-6 bzw. 2xGFP abhängige Proliferation. Die sowohl den physiologischen hIL-12R β 2 als auch den synthetischen G_{VHH}-hIL-12R β 2 Rezeptor tragenden Ba/F3-gp130 Zellen proliferierten unter HIL-6-Stimulation stark, unter HIL-12- und 2xGFP-Stimulation nur gering. Das verminderte Proliferationsverhalten dieser Zelllinie unter HIL-12- oder 2xGFP-Stimulation, im Vergleich zu den ausschließlich den physiologischen oder synthetischen Zytokinrezeptor exprimierenden

Zelllinien, wurde bereits zuvor bei der C_{VHH} -Variante (siehe Abb. 12 (A)) beobachtet. Die Proliferationsraten der G_{VHH} -Variante fielen geringer aus als die der C_{VHH} -Variante.

Die Analyse der Phosphorylierung von STAT3, STAT5 und ERK1/2 (siehe Abb. 14B) ergab funktionell aktive Ba/F3-gp130-hIL-12R β 2/ G_{VHH} -hIL-12R β 2 Zellen nach Stimulation mit 0,5 und 5% HhIL-12 sowie 100 ng/ml 2xGFP. Bei einer Stimulation mit 10 ng/ml 2xGFP wurde lediglich Erk1/2 phosphoryliert.

Eine steigende Zellproliferation wurde auch bei steigenden Konzentrationen von HhIL-12 oder des synthetischen Liganden beobachtet (siehe Abb. 15).

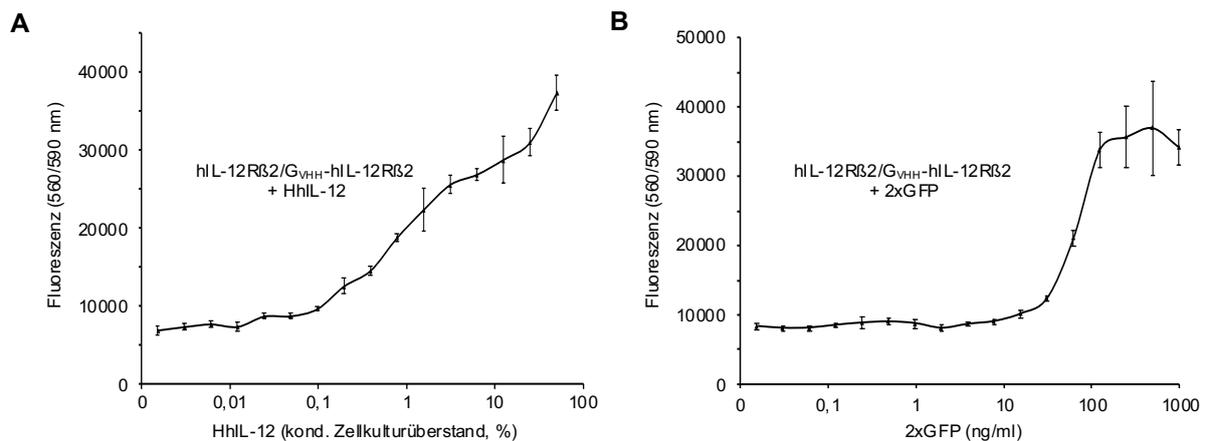


Abb. 15: Proliferation von Ba/F3-gp130-hIL-12R β 2/ G_{VHH} -hIL-12R β 2 Zellen nach Stimulation mit HhIL-12 oder synthetischem Liganden. Die Ba/F3-gp130-hIL-12R β 2/ G_{VHH} -hIL-12R β 2 Zellen wurden mit dem Zytokin HhIL-12 (A) oder dem synthetischen Liganden 2xmCherry (B) in aufsteigenden Konzentrationen kultiviert. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation 560 nm/ Emission 590 nm) repräsentiert ein Maß für die Proliferation der Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus Triplikaten. Ein repräsentatives Experiment von n=3 ist abgebildet.

Die Ergebnisse entsprechen denen des zuvor dargestellten Proliferationsassays (siehe Abb. 14A) und bestätigen die funktionelle Aktivität der synthetischen G_{VHH} -hIL-12R β 2 Zytokinrezeptoren. Diese beruht auf der Homodimerisierung der entsprechenden Rezeptoren. Der Abfall der Proliferationsraten bei Stimulation mit mehr als 100 ng/ml 2xGFP entspricht den bereits bei den synthetischen C_{VHH} -hIL-12R β 2 Zytokinrezeptoren beobachteten Ergebnissen (siehe Abb. 13). Im Gegensatz dazu wurden bei der Stimulation mit HhIL-12 nicht so hohe Proliferationsraten wie bei der C_{VHH} -hIL-12R β 2 Variante erreicht und es kam zu keinem Abfall der Proliferationsraten bei Stimulation mit höheren Konzentrationen des Zytokins.

Synthetische mIL-12R β 2 Rezeptoren repräsentieren ein funktionelles mIL-12R β 2 Dimer

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich zum humanen synthetischen IL-12R β 2 Zytokinrezeptor ebenfalls eine GFP-spezifische synthetische murine IL-12R β 2 Rezeptorvariante generiert (vgl. Abschnitt 3.2.1) und anschließend analysiert.

Die Proliferationsanalyse des synthetischen G_{VHH}-mIL-12R β 2 Zytokinrezeptors (siehe Abb. 16A) wurde im Vergleich zu den zuvor dargestellten Proliferationsassays zusätzlich mit einer weiteren Kontrollzelllinie durchgeführt (Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1/mIL-12R β 2 Zellen).

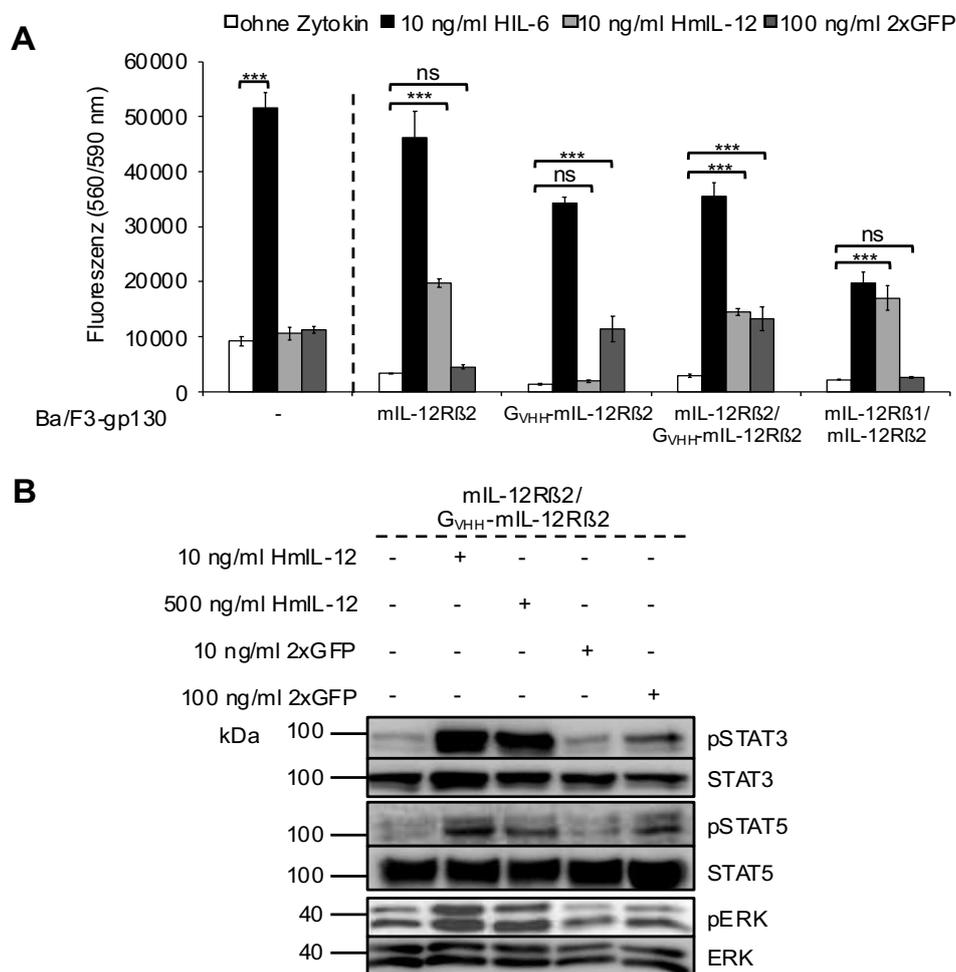


Abb. 16: Die Dimerisierung von mIL-12R β 2 aktiviert den JAK/STAT- sowie MAPK-Signalweg und induziert die Zellproliferation. A Die angegebenen Ba/F3-gp130 Zelllinien wurden mit 10 ng/ml HIL-6 sowie 10 ng/ml HmIL-12 und 100 ng/ml 2xGFP für 72 Stunden stimuliert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nicht behandelt. Für diesen Nachweis wurden jeweils 5000 Zellen pro well ausgesät. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation 560 nm/ Emission 590 nm) repräsentiert ein Maß für die Proliferation der Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus Triplikaten. Ein repräsentatives Experiment von n=4 ist abgebildet. ns nicht signifikant, *** $p \leq 0,001$. B Ba/F3-gp130-mIL-12R β 2/G_{VHH}-mIL-12R β 2 Zellen wurden mit den angegebenen Liganden für 30 min stimuliert. Nach Herstellung der Zelllysate wurden diese mittels Western Blot analysiert. Gleiche Mengen an Gesamtprotein (50 μ g) wurden pro Spur aufgetragen. Der Nachweis der Signalproteine erfolgte mittels Antikörper. Ein repräsentatives Experiment von n=3 ist abgebildet.

Im Zellviabilitätsassay (siehe Abb. 16A) wurden Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1/mIL-12R β 2 Zellen als Positivkontrolle genutzt. Zur Stimulation der synthetischen G_{VHH}-mIL-12R β 2 Rezeptorvarianten wurde murines IL-12 (HmIL-12) genutzt. Auch die Ba/F3-gp130-mIL-12R β 2/G_{VHH}-mIL-12R β 2 Zelllinie zeigte in der Proliferationsanalyse vergleichbare Ergebnisse zu den humanen synthetischen IL-12R β 2 Zytokinrezeptoren. Sie wies sogar für die Stimulation mit HmIL-12 eine vergleichbare Proliferationsrate wie Ba/F3-gp130-mIL-12R β 2-Zellen, und für die Stimulation mit 2xGFP eine vergleichbare Proliferationsrate wie Ba/F3-gp130-G_{VHH}-mIL-12R β 2 Zellen auf. Die IL-12 abhängige Zellproliferation der Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1/mIL-12R β 2 Zellen mit HmIL-12 war vergleichbar zur HIL-6 abhängigen Proliferation. Um die Signaltransduktion für den MAPK/ERK- und den JAK/STAT-Signalweg (siehe Abb. 16**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**B) zu analysieren, wurden die Ba/F3-gp130-mIL-12R β 2/G_{VHH}-mIL-12R β 2 Zellen mit 2xGFP und murinem HIL-12 stimuliert und in einem weiteren Ansatz unstimuliert belassen. Wie bei den zuvor dargestellten Western Blot Analysen der Zelllysate von sowohl mit dem physiologischen als auch dem entsprechenden synthetischen hIL-12R β 2 Zytokinrezeptor transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen wurde auch für die murine Rezeptorvariante bei Stimulation mit dem Liganden HmIL-12 sowohl in niedriger als auch in hoher Konzentration die Phosphorylierung von STAT3, STAT5 und ERK1/2 nachgewiesen. Bezüglich der mit 2xGFP stimulierten Ansätze wurde erneut eine verminderte Aktivität unter Stimulation mit 10 ng/ml nachgewiesen. Unter Stimulation mit 100 ng/ml 2xGFP wurde eine eindeutige STAT3- und eine schwache STAT5- und ERK-Phosphorylierung nachgewiesen. In der Zusammenschau der Ergebnisse ist sowohl für die Stimulation mit dem Zytokin als auch mit dem synthetischen Liganden von der Aktivierung des JAK/STAT- und MAPK-Signalwegs und der daraus resultierenden Induktion der Zellproliferation der Ba/F3-gp130-mIL-12R β 2/G_{VHH}-mIL-12R β 2 Zellen auszugehen.

Auch unter Stimulation mit steigenden Konzentrationen HmIL-12- und 2xGFP (siehe Abb. 17) wurde für die Ba/F3-gp130-mIL-12R β 2/G_{VHH}-mIL-12R β 2 Zellen eine deutliche Zellproliferation beobachtet.

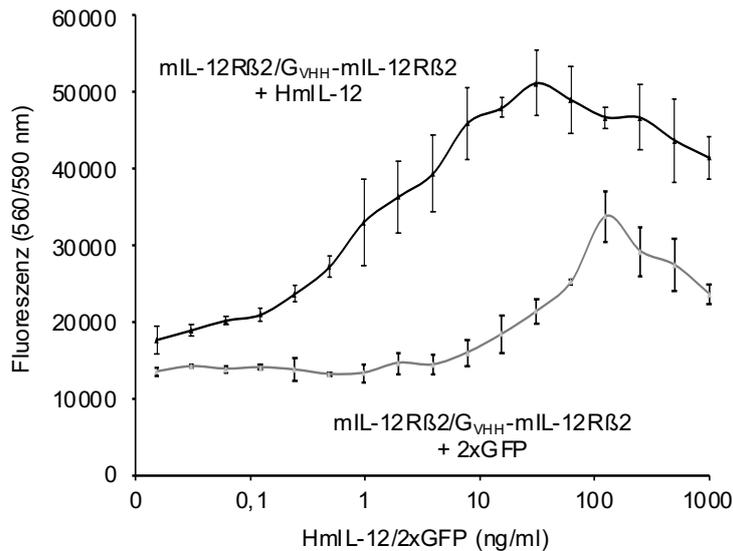


Abb. 17: Proliferation von Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ2/GVHH-mIL-12Rβ2 Zellen nach Stimulation mit HmIL-12 und synthetischem Liganden. Die Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ2/GVHH-mIL-12Rβ2 Zellen wurden mit dem Zytokin HmIL-12 oder dem synthetischen Liganden 2xGFP in aufsteigenden Konzentrationen kultiviert. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation 560 nm/ Emission 590 nm) repräsentiert ein Maß für die Proliferation der Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte ± SD aus Triplikaten. Ein repräsentatives Experiment von n=3 ist abgebildet.

Unter Stimulation mit 2xGFP kam es wie bei den Ba/F3-gp130-hIL-12Rβ2/GVHH-hIL-12Rβ2 und -CVHH-hIL-12Rβ2 Zelllinien bei einer Stimulation mit 100 ng/ml zur stärksten Proliferation der Zellen. Der augenscheinliche Abfall der Zellproliferation bei Stimulation mit hohen Konzentrationen 2xGFP entsprach den Ergebnissen der Ba/F3-gp130-hIL-12Rβ2/GVHH-hIL-12Rβ2 und -CVHH-hIL-12Rβ2 Zelllinien und erfordert wie zuvor beschrieben weitere Abklärung.

Die Ergebnisse der Zellviabilitätsassays (siehe Abb. 16) **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** A und Abb. 17) sowie des Stimulationsassays (siehe Abb. 16B) bestätigen die, durch Homodimerisierung der entsprechenden Zytokinrezeptorvarianten induzierte, funktionelle Aktivität der synthetischen murinen IL-12Rβ2 Zytokinrezeptor tragenden Ba/F3-gp130-Zellen.

Synthetische hIL-23 Rezeptoren repräsentieren ein funktionelles hIL-23R Dimer

Die durch Engelowski *et al.* sowie Artur Schneider bereits beschriebene funktionell aktive Homodimerisierung des IL-23R bildet die Grundlage der vorliegenden Arbeit (37,84). Im Folgenden kommen die im Rahmen dieser Arbeit generierten Ergebnisse zur Homodimerisierung des IL-23R zur Darstellung.

In Abb. 18 sind die Ergebnisse bezüglich Proliferationsverhalten und Signaltransduktion von mit synthetischen hIL-23R Zytokinrezeptorvarianten transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen nach

Stimulation mit HmIL-23 und 2xGFP dargestellt. Murines IL-23 entfaltet seine Wirkung sowohl an murinen, als auch an humanen IL-23 Rezeptoren (20).

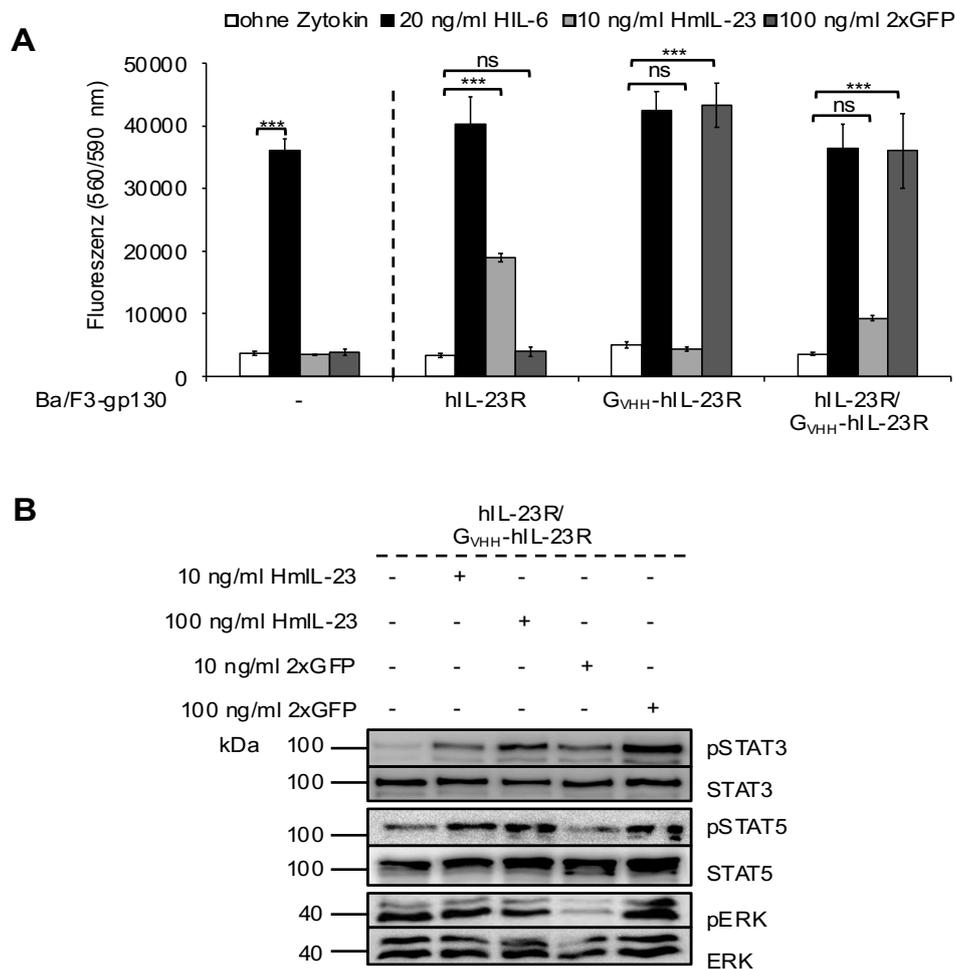


Abb. 18: Die Dimerisierung von hIL-23R aktiviert den JAK/STAT- sowie MAPK-Signalweg und induziert die Zellproliferation. **A** Die angegebenen Ba/F3-gp130 Zelllinien wurden mit 20 ng/ml HIL-6 sowie 10 ng/ml HmIL-23 und 100 ng/ml 2xGFP für 72 Stunden stimuliert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nicht behandelt. Für diesen Nachweis wurden jeweils 5000 Zellen pro *well* ausgesät. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation 560 nm/ Emission 590 nm) repräsentiert ein Maß für die Proliferation der Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus Triplikaten. Ein repräsentatives Experiment von $n=3$ ist abgebildet. ns nicht signifikant, *** $p \leq 0,001$. **B** Ba/F3-gp130-hIL-23R/G_{VHH}-hIL-23R Zellen wurden mit den angegebenen Liganden für 30 min stimuliert. Nach Herstellung der Zellysate wurden diese mittels Western Blot analysiert. Gleiche Mengen an Gesamtprotein (50 μ g) wurden pro Spur aufgetragen. Der Nachweis der Signalproteine erfolgte mittels Antikörper. Ein repräsentatives Experiment von $n=3$ ist abgebildet.

Die Ba/F3-gp130- und -hIL-23R Kontrollzellen zeigten im Zellviabilitätsassay (siehe Abb. 18A) den zuvor gezeigten Proliferationsanalysen entsprechende Zellproliferationsraten. Die mit der codierenden DNA für G_{VHH}-hIL-23R transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen proliferierten unter HIL-6- und 2xGFP-Stimulation vergleichbar und wiesen keine Zellproliferation bei einer Stimulation ohne Liganden sowie bei Stimulation mit HmIL-23 auf. Dies bestätigt die funktionelle Aktivität der synthetischen hIL-23R Zytokinrezeptoren und entsprach ebenfalls den Beobachtungen von Engelowski *et al.* und Artur Schneider (37,84). Auch die Ba/F3-gp130-

hIL-23R/G_{VHH}-hIL-23R Zellen zeigten das erwartete Verhalten: Sie proliferierten unter Stimulation mit HIL-6, HmIL-23 und 2xGFP, wobei die Proliferation unter HmIL-23-Stimulation am geringsten ausfiel.

Der Stimulationsassay (siehe Abb. 18B) bestätigte die funktionelle Aktivität der Ba/F3-gp130-hIL-23R/G_{VHH}-hIL-23R Zellen. Bei allen Varianten mit Liganden wurde eine STAT3-Phosphorylierung nachgewiesen. Außer bei der Stimulation mit 10 ng/ml 2xGFP traf dies ebenfalls auf die STAT5- und ERK1/2-Phosphorylierung zu.

Bei der Analyse der Zellproliferation mit steigenden Konzentrationen von HmIL-23 oder 2xGFP (siehe Abb. 19) wurde die funktionelle Aktivität der Ba/F3-gp130-hIL-23R/G_{VHH}-hIL-23R Zellen und somit der Nachweis der Homodimerisierung der entsprechenden Rezeptoren bestätigt.

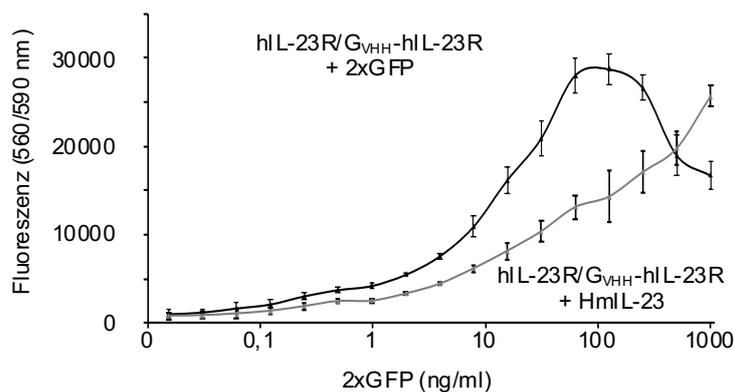


Abb. 19: Proliferation von Ba/F3-gp130-hIL-23R/G_{VHH}-hIL-23R Zellen nach Stimulation mit HmIL-23 und synthetischem Liganden. Die Ba/F3-gp130-hIL-23R/G_{VHH}-hIL-23R Zellen wurden mit dem Zytokin HmIL-23 oder dem synthetischen Liganden 2xGFP in aufsteigenden Konzentrationen kultiviert. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation 560 nm/ Emission 590 nm) repräsentiert ein Maß für die Proliferation der Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus Triplikaten. Ein repräsentatives Experiment von n=3 ist abgebildet.

Diese Ergebnisse bestätigten die funktionelle Aktivität der Ba/F3-gp130-hIL-23R/G_{VHH}-hIL-23R Zellen. Die Zellproliferationsrate stieg bei Stimulation mit zunehmenden Konzentrationen von 2xGFP an und fiel wie in den vorherigen Analysen der synthetischen humanen und murinen IL-12R β 2 Zytokinrezeptoren nach Stimulation mit mehr als 100 ng/ml 2xGFP wieder ab. Die Stimulation mit steigenden Konzentrationen von HmIL-23 führte zu vermehrter Zellproliferation. Eine Reduktion der Zellproliferation wurde bei hohen Konzentrationen nicht gezeigt.

Sowohl die Ergebnisse der Zellviabilitätsassays (siehe Abb. 18A und Abb. 19) als auch des Stimulationsassays (siehe Abb. 18B) bestätigen die, durch Homodimerisierung der

synthetischen G_{VHH} -hIL-23R Zytokinrezeptoren induzierte, funktionelle Aktivität der synthetischen hIL-23R Zytokinrezeptor tragenden Zellen.

Synthetische hIL-12R β 1 Rezeptoren repräsentieren kein funktionelles hIL-12R β 1 Dimer

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ferner synthetische Zytokinrezeptorvarianten des hIL-12R β 1 generiert (vgl. Abschnitt 3.2.1) und analysiert. Der hIL-12R β 1 ist Bestandteil des physiologischen IL-12 sowie IL-23 Rezeptorkomplexes und dient der Bindung von p40 (82). Mittels Proliferationsanalyse stabiler, den synthetischen hIL-12R β 1 Zytokinrezeptor tragender, Ba/F3-gp-130 Zellen wurde eine mögliche, durch Homodimerisierung der entsprechenden hIL-12R β 1 Zytokinrezeptorvarianten induzierte, Signaltransduktion untersucht (siehe Abb. 20).

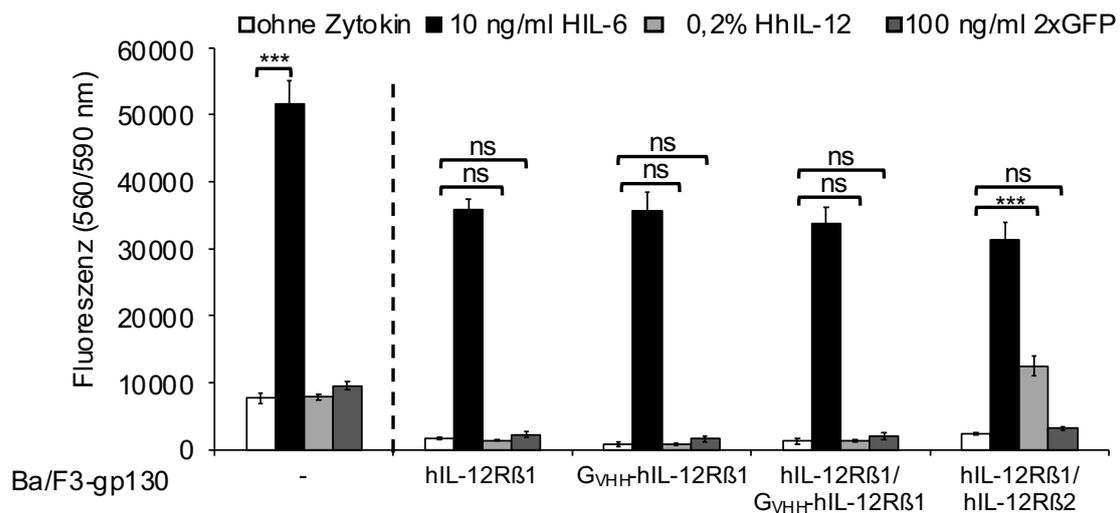


Abb. 20: Die Dimerisierung von hIL-12R β 1 induziert keine Zellproliferation. Die angegebenen Ba/F3-gp130 Zelllinien wurden mit 10 ng/ml HIL-6 sowie 0,2% HhIL-12 und 100 ng/ml 2xGFP für 72 Stunden stimuliert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nicht behandelt. Für diesen Nachweis wurden jeweils 5000 Zellen pro well ausgesät. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation 560 nm/ Emission 590 nm) repräsentiert ein Maß für die Proliferation der Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus Triplikaten. Ein repräsentatives Experiment von n=3 ist abgebildet. ns nicht signifikant, *** $p \leq 0,001$.

Anders als bei den zuvor dargestellten Analysen der synthetischen Zytokinrezeptorvarianten der IL-12 Familie kam es in diesem Versuch weder bei den mit der cDNA für G_{VHH} -hIL-12R β 1 transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen, noch bei den sowohl mit der cDNA für den natürlichen hIL-12R β 1 als auch mit der cDNA für G_{VHH} -hIL-12R β 1 transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen zur Zellproliferation bei Stimulation mit HhIL-12 oder dem synthetischen Liganden. Alle analysierten Zelllinien wiesen, als Positivkontrolle, eine gp130-vermittelte Zellproliferation nach HIL-6-Stimulation auf. Die ausschließlich den hIL-12R β 1 Wildtyprezeptor

exprimierenden Ba/F3-gp130 Zellen zeigten keine Zellproliferation nach HhIL-12-Stimulation. Die Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1/hIL-12R β 2 Zellen zeigten eine HhIL-12 abhängige Zellproliferation. Die Ergebnisse belegen, dass der hIL-12R β 1 im Gegensatz zum hIL-23R, hIL-12R β 2 und mL-12R β 2 keine funktionelle Aktivität durch Homodimerisierung induziert. Die Heterodimerisierung des hIL-12R β 1 und des hIL-12R β 2 ist somit weiterhin die Voraussetzung zur Induktion der IL-12 Signaltransduktion.

In Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die synthetischen hIL-23R-, hIL-12R β 2- und mL-12R β 2 Zytokinrezeptoren funktionell aktiv waren. Da die verschiedenen Ba/F3-gp130 Zellen nur jeweils eine physiologische Zytokinrezeptorvariante oder synthetische Zytokinrezeptorvariante beziehungsweise die sowohl mit den physiologischen als auch synthetischen Zytokinrezeptoren transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen jeweils beide exprimierten, bedeutete eine funktionelle Aktivität der Zellen im Zellviabilitäts- und Stimulationsassay eine durch Homodimerisierung der jeweiligen Rezeptoren vermittelte Signalweiterleitung. Die hIL-12R β 1-Varianten hingegen zeigten bei Stimulation mit HhIL-12 oder entsprechendem synthetischem Liganden keinerlei Aktivität, sodass von keiner funktionell aktiven Homodimerisierung des hIL-12R β 1 bei Stimulation mit HhIL-12 ausgegangen werden kann.

3.3 Chimäre Zytokinrezeptoren verdeutlichen die Homodimerisierung des IL-23R

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich zu den Experimenten an synthetischen Zytokinrezeptoren die funktionell aktive Homodimerisierung von Interleukinrezeptoren an chimären Rezeptorvarianten analysiert. In einem dieser Ansätze lag der Fokus auf der Analyse von chimären Rezeptorvarianten des murinen IL-23R. Ba/F3-gp130 Zellen, die zuvor mit der cDNA für die chimären IL-23R-Varianten transduziert worden waren, wurden bezüglich Zellproliferation und Aktivierung intrazellulärer Signalwege nach Stimulation untersucht. Die Besonderheit dieser Rezeptoren bestand in der Veränderung des intrazellulären Rezeptoranteils des physiologischen mL-12R β 1 Interleukinrezeptors, welcher gegen die intrazelluläre Domäne des physiologischen mL-23R Interleukinrezeptors ausgetauscht wurde (siehe Abb. 21). Die Transmembrandomäne entsprach der des physiologischen mL-12R β 1 Rezeptors.

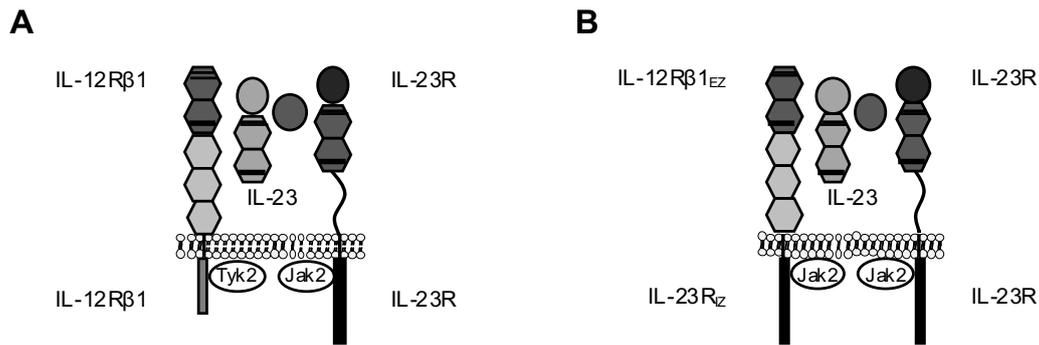


Abb. 21: Schematische Darstellung des physiologischen IL-23R und des chimären mIL-12Rβ1_{EZ}-IL-23R_{IZ} Rezeptorkomplexes. Der physiologische IL-23R Rezeptorkomplex (A) wird durch ein Heterodimer aus dem IL-23R und dem IL-12Rβ1 gebildet und bindet als Liganden IL-23. Die hier auf dem murinen IL-12Rβ1 beruhende und als mIL-12Rβ1_{EZ}-IL-23R_{IZ} bezeichnete chimäre Rezeptorvariante (B) unterscheidet sich vom Wildtyprezeptor im intrazellulären Anteil des mIL-12Rβ1. Dieser wurde durch den intrazellulären Anteil des IL-23R ersetzt („IL-23R_{IZ}“). Da der extrazelluläre Rezeptoranteil unverändert blieb („IL-12Rβ1_{EZ}“), wird das Bindungsverhalten von IL-23 nicht beeinflusst. Eine IL-23-Stimulation sollte somit zu einer intrazellulären Homodimerisierung des IL-23R bei extrazellulär weiterhin vorliegender Heterodimerisierung des IL-23R mit dem IL-12Rβ1 führen. Abbildung modifiziert nach Floss *et al.* 2017 (73).

Diese neue und im Folgenden als „mIL-12Rβ1_{EZ}-IL-23R_{IZ}“ bezeichnete Rezeptorvariante wurde durch retrovirale Transduktion (vgl. Abschnitt 2.3.3) in Ba/F3-gp130 Zellen eingebracht. Ferner wurde eine Ba/F3-gp130 Zelllinie aus sowohl den physiologischen mIL-23R als auch den chimären Interleukinrezeptor mIL-12Rβ1_{EZ}-IL-23R_{IZ} tragenden Ba/F3-gp130-Zellen generiert („Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12Rβ1_{EZ}-IL-23R_{IZ} Zellen“). Beide Zelllinien lagen in der AG Scheller bereits vor und wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit funktionell charakterisiert.

3.3.1 Expressionsanalyse chimärer Rezeptorvarianten mittels

Durchflusszytometrie

Zu Beginn wurde die Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche der Ba/F3-gp130 Zelllinien mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe Abb. 22). Zur Kontrolle wurden den physiologischen Rezeptorkomplex tragende Ba/F3-gp130 Zellen analysiert.

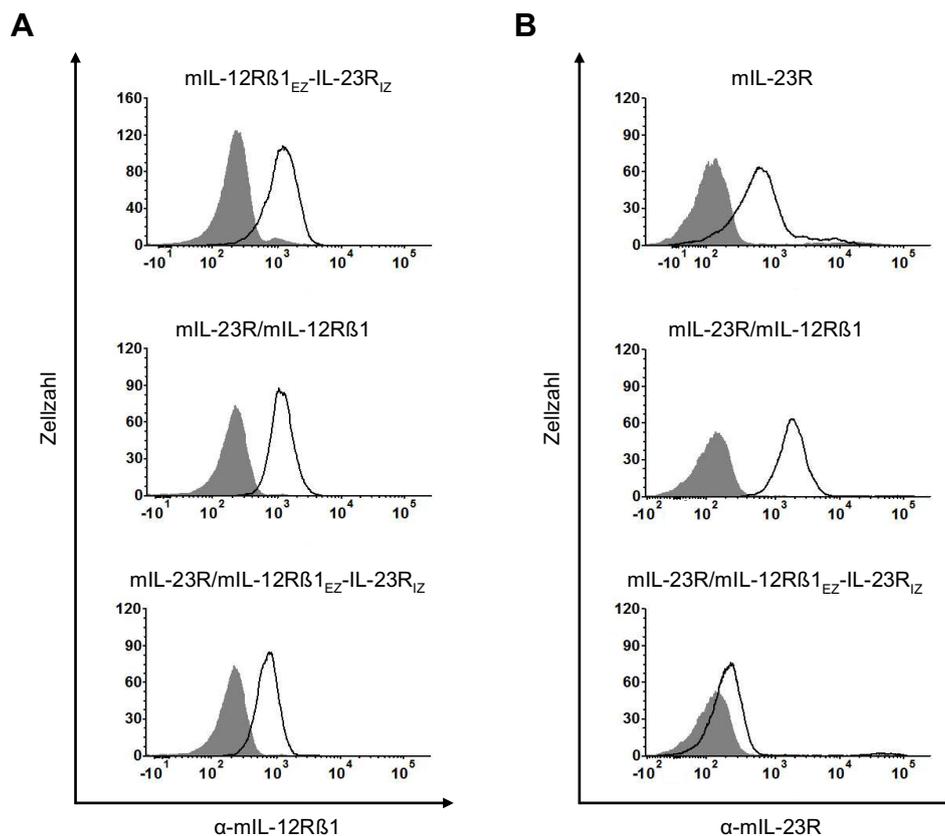


Abb. 22: Analyse der Oberflächenexpression der chimären Zytokinrezeptoren auf transduzierten Ba/F3-gp130 Zelllinien. Die abgebildeten Ba/F3-gp130 Zelllinien wurden hinsichtlich der Expression der chimären Zytokinrezeptoren mittels Durchflusszytometrie untersucht. Für den Nachweis der extrazellulären mIL-23R Domänen wurden anti-mIL-23R Antikörper (A), für den Nachweis der extrazellulären mIL-12Rβ1 Domäne anti-mIL-12Rβ1 Antikörper (B) verwendet. Die x-Achse repräsentiert ein Maß für die Fluoreszenzintensität und dient somit auch als Indikator für die Oberflächenexpression. Die y-Achse steht für die Anzahl der analysierten Zellen. Die grauen Histogramme repräsentieren Ba/F3-gp130 Zellen ohne Expression der entsprechenden extrazellulären Zytokinrezeptoranteile und dienen als Negativkontrolle. Die schwarz umrandeten Histogramme stehen für Ba/F3-gp130 Zellen mit den angegebenen chimären und oder natürlichen Rezeptoren.

Die ausschließlich den modifizierten, chimären mIL-12Rβ1 exprimierenden Zellen zeigten eine deutliche Rechtsverschiebung des Histogramms nach Inkubation mit α -mIL-12Rβ1 verglichen mit untransduzierten Ba/F3-gp130-Zellen (siehe Abb. 22A). Dies zeigt eine Bindung des Antikörpers an den mIL-12Rβ1 und verdeutlicht somit die Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche. Für die Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12Rβ1 Zellen wurde ebenfalls eine erfolgreiche Expression für den den mIL-12Rβ1 auf der Zelloberfläche durch Rechtsverschiebung des entsprechenden Histogramms nachgewiesen. Das Histogramm der Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12Rβ1^{EZ}-IL-23R^{IZ} Zelllinie zeigte eine Rechtsverschiebung im Gegensatz zur Negativkontrolle nach Inkubation mit dem α -mIL-12Rβ1 Antikörper. Ferner wies das Histogramm dieser Zelllinie nach Färbung mit α -mIL-23R eine Rechtsverschiebung auf (siehe Abb. 22B). Im Gegensatz zu den Ba/F3-gp130-mIL-23R und -mIL23R/mIL-12Rβ1 Zelllinien war diese Verschiebung jedoch deutlich geringer, was auf eine verminderte

Rezeptorexpression des mIL-23R in den Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β 1_{EZ}-IL-23R Zellen hinweist.

3.3.2 Chimäre mIL-23-Rezeptoren sind funktionell aktiv

Nach erfolgreichem Nachweis der Rezeptorexpression für die chimären Zelllinien (vgl. vorheriger Abschnitt) folgte die Funktionalitätsanalyse, welche analog zu den synthetischen Zytokinrezeptor exprimierenden Ba/F3-gp130-Zellen (vgl. Abschnitt 3.2.4) mittels Zellviabilitätsassays und der Analyse der Signaltransduktion nach Stimulation mit HmIL-23 durchgeführt wurde.

In der durchgeführten Proliferationsanalyse wurde jede zu analysierende Zelllinie zum Ausschluss autonomer Aktivität in einem Ansatz unstimuliert belassen. In einem weiteren, als Positivkontrolle dienenden, Ansatz wurden die Zellen mit 10 ng/ml HIL-6 stimuliert, um über eine gp130-vermittelte Aktivität zur Proliferation zu führen. Ferner wurden sie in weiteren Ansätzen sowohl mit 10 ng/ml als auch mit 1 μ g/ml HmIL-23 stimuliert, um die Zellproliferation der die chimären Zytokinrezeptor tragenden Ba/F3-gp130 Zelllinien mit Ba/F3-gp130 Zellen, die die physiologischen Zytokinrezeptoren trugen, vergleichen zu können. Abb. 23 zeigt die Ergebnisse der Proliferationsanalyse.

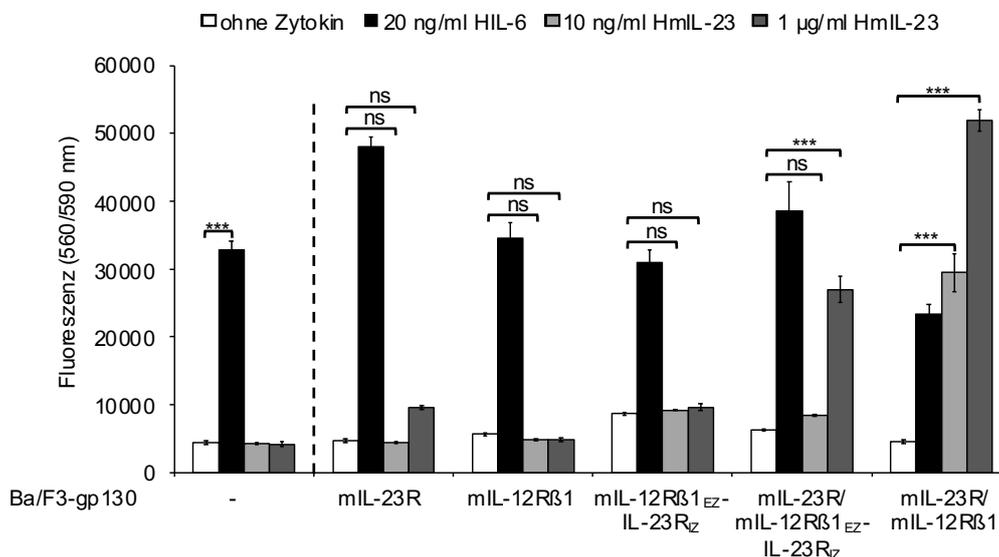


Abb. 23: Die Dimerisierung von chimären mIL-23 Zytokinrezeptorvarianten induziert die Zellproliferation. Die angegebenen Ba/F3-gp130 Zelllinien wurden mit 20 ng/ml HIL-6 sowie 10 ng/ml HmIL-23 und 1 μ g/ml HmIL-23 für 72 Stunden stimuliert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nicht behandelt. Für diesen Nachweis wurden jeweils 5000 Zellen pro *well* ausgesät. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation 560 nm/ Emission 590 nm) repräsentiert ein Maß für die Proliferation der Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus Triplikaten. Ein repräsentatives Experiment von n=3 ist abgebildet. ns nicht signifikant, *** $p \leq 0,001$

Analog zu den durchgeführten Zellviabilitätsassays in Kapitel 3.2.3 wurden ebenfalls untransduzierte Ba/F3-gp130-Zellen analysiert, um eine ligandenunabhängige Aktivität auszuschließen. Wie bereits bei den vorangegangenen Experimenten gezeigt, erfolgte außer nach HIL-6-Stimulation keine Proliferation der untransduzierten Ba/F3-gp130 Zellen. Die Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β 1 Zellen zeigten wie erwartet eine Zellproliferation bei HIL-6- und HmIL-23-Stimulation. Im Vergleich dazu kam es bei den Ba/F3-gp130-mIL-23R Zellen neben der HIL-6-Stimulation auch unter Einsatz von 1 μ g/ml HmIL-23 zur Zellproliferation, welche in einer funktionell aktiven Homodimerisierung des mIL-23R begründet lag. Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1 Zellen wiesen unter Stimulation mit HmIL-23 wie erwartet keine Zellproliferation auf. Für Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1^{EZ}-IL-23R^{IZ} Zellen erfolgte ausschließlich unter HIL-6-Stimulation eine Proliferation der Zellen. Eine Homodimerisierung der intrazellulären mIL-23 Rezeptoranteile nach Stimulation des chimären mIL-23R/mIL-12R β 1 Rezeptors mit HmIL-23 konnte nicht beobachtet werden. Durch Co-Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen mit sowohl dieser Rezeptorvariante als auch dem physiologischen mIL-23R hingegen, konnte bei HmIL-23-Stimulation mit höheren Konzentrationen eine Heterodimerisierung des mIL-23R und des mIL-12R β 1^{EZ}-IL-23R^{IZ} induziert werden. Die extrazellulär als Hetero- (mIL-12R β 1 und mIL-23R) und intrazellulär als Homodimer (mIL-23R) vorliegenden Rezeptoren induzierten eine Zellproliferation. Dies deutet eine durch Homodimerisierung des mIL-23R hervorgerufene Signaltransduktion hin.

Die Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β 1^{EZ}-IL-23R^{IZ} Zelllinie wurde weiterhin hinsichtlich des Proliferationsverhaltens bei Stimulation mit steigenden Konzentrationen von HmIL-23 mit der Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β 1 Zelllinie verglichen (siehe Abb. 24).

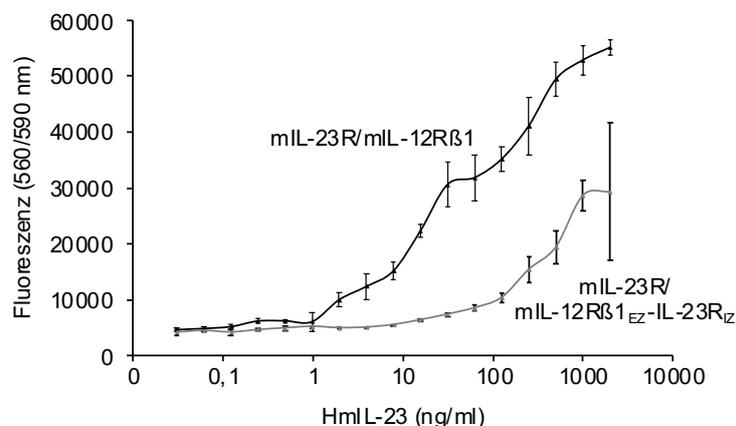


Abb. 24: Proliferation von Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β 1 und Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β 1^{EZ}-IL-23R^{IZ} Zellen nach Stimulation mit HmIL-23. Die angegebenen Zellen wurden mit dem Zytokin HmIL-23 in steigenden Konzentrationen kultiviert. Die Fluoreszenzmessung (Exzitation 560 nm/ Emission 590 nm) repräsentiert ein Maß für die Proliferation der Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus Triplikaten. Ein repräsentatives Experiment von n=3 ist abgebildet.

Die Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β 1 Zellen zeigten bereits ab einer Konzentration von ca. 1 ng/ml HmIL-23 eine zytokinabhängige Zellproliferation. Außerdem erreichten sie auch insgesamt höhere Zellproliferationsraten als die Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β 1^{EZ}-IL-23R_{IZ} Zellen. Dies bestätigte die vorherigen Ergebnisse des Proliferationsassays (siehe Abb. 23). Bei der Analyse der Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β 1^{EZ}-IL-23R_{IZ} Zellen ergab sich zwar erst ab einer HmIL-23-Konzentration von ca. 15 ng/ml eine relevante Zellproliferation, jedoch stieg diese daraufhin stetig an. Die nachgewiesene Zellproliferation der Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β 1^{EZ}-IL-23R_{IZ} Zellen legt eine, durch Homodimerisierung der intrazellulären IL-23R Domänen vermittelte, funktionelle Aktivität der Zelllinie nahe.

Abschließend wurde die Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β 1^{EZ}-IL-23R_{IZ} Zelllinie auch bezüglich der Signaltransduktion analysiert (siehe Abb. 25).

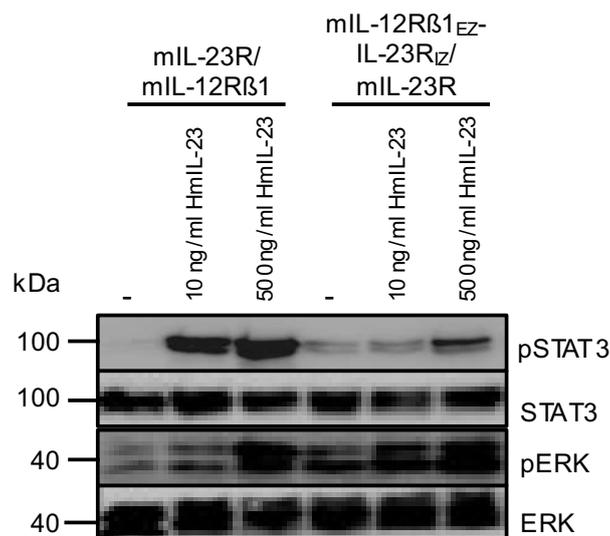


Abb. 25: Die Dimerisierung intrazellulärer mIL-23R Anteile aktiviert den JAK/STAT- sowie MAPK-Signalweg. Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β 1^{EZ}-IL-23R_{IZ} Zellen und Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β 1 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen HmIL-23 für 30 min stimuliert. Nach Herstellung der Zelllysate wurden diese mittels Western Blot analysiert. Gleiche Mengen an Gesamtprotein (50 μ g) wurden pro Spur aufgetragen. Der Nachweis der Signalproteine erfolgte mittels Antikörper. Ein repräsentatives Experiment von n=3 ist abgebildet.

Einerseits wurden nur den physiologischen mIL-23R Rezeptorkomplex (mIL-23R/mIL-12R β 1) tragende Ba/F3-gp130-Zellen als Kontrollzelllinie analysiert. Andererseits wurde die Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β 1^{EZ}-IL-23R_{IZ} Zelllinie analysiert, welche sowohl den physiologischen mIL-23R als auch den chimären mIL-12R β 1^{EZ}-IL-23R_{IZ} exprimiert.

Die Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β 1 Zellen wiesen bei Stimulation mit 500 ng/ml HmIL-23 eine deutliche Phosphorylierung von STAT3 und ERK auf. Unter Stimulation mit 10 ng/ml erfolgte eine eindeutige Signaltransduktion für den JAK-/STAT-Signalweg bei einer geringen

für den MAPK-/ERK-Signalweg. Die Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β ₁^{EZ}-IL-23R_{IZ} Zellen wiesen wie erwartet bei Stimulation mit 500 ng/ml HmIL-23 phosphorylierte Signalproteine sowohl für STAT3 als auch für ERK auf. Nach Stimulation mit 10 ng/ml HmIL-23 kam es zu einer Phosphorylierung von ERK bei einer geringen Phosphorylierung von STAT3. Ausreichend hohe HmIL-23-Konzentrationen führten somit zu einer Dimerisierung des physiologischen mIL-23R mit dem chimären Rezeptor. Ein extrazelluläres Heterodimer aus mIL-12R β ₁ und mIL-23R, dem Heterodimer des physiologischen Rezeptors entsprechend, führte somit zu der Bildung eines intrazellulären Homodimers bestehend aus den intrazellulären Domänen des mIL-23R. Analog zu den nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von HmIL-23 beobachteten Ergebnissen (siehe Abb. 24) proliferierten die Ba/F3-gp130-mIL-23/mIL-12R β ₁ Zellen verglichen mit den Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β ₁^{EZ}-IL-23R_{IZ} Zellen bereits nach Stimulation mit geringeren Konzentrationen HmIL-23. In der Zusammenschau der Ergebnisse ließ sich somit auch in der Analyse der Signaltransduktion die Aktivität der Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β ₁^{EZ}-IL-23R_{IZ} Zelllinie nach Stimulation mit HmIL-23 nachweisen und infolgedessen das Vorhandensein funktioneller mIL-23R Homodimere bestätigen.

4 Diskussion

4.1 Synthetische Zytokinrezeptoren sind funktionell aktiv

Innerhalb der letzten Jahre hat sich das Feld der synthetischen Biologie rapide weiterentwickelt (vgl. Abschnitt 1.2.1). Rekombinant hergestellte Interferone, Interleukine oder auch EPO sind heutzutage bereits fester Bestandteil in der Therapie bestimmter Erkrankungen (85). Ferner werden Fusionsproteine bestehend aus modifizierten Zytokinen, sogenannte *synthekine*, experimentell eingesetzt, um eine physiologische oder artifizielle Rezeptordimerisierung bestimmter Rezeptoren und die daraus resultierende Signaltransduktion hervorzurufen (86). Die Besonderheit synthetisch hergestellter Zytokine verglichen mit ihrer natürlichen Form liegt unter anderem in ihrer erhöhten Stabilität, Aktivität und Rezeptoraffinität (87). Für eine spezifischere Therapie werden Zytokine zudem an verschiedene tumorspezifische Antikörper angebracht. Diese als Immunozytokine bezeichneten Fusionsproteine können die unerwünschten Arzneimittelwirkungen aufgrund der geringeren systemischen Wirkung verringern (88). Neben der Ummodellierung von Zytokinen selbst, kann auch deren Rezeptor modifiziert werden. Der eingangs erwähnte, mit einem extrazellulären GFP_{VHH}-Anteil modifizierte, synNotch Rezeptor (vgl. Abschnitt 1.2.1) stellt ein Beispiel hierfür dar (66). Hier besteht der Vorteil im Einsatz von synthetischen Liganden, die verglichen mit Zytokinen weniger pleiotrope Effekte aufweisen und somit zu einem verringerten Nebenwirkungsprofil und erhöhter Spezifität führen (68).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten und auf diesem Prinzip basierenden synthetischen Zytokinrezeptorvarianten zeigten funktionelle Aktivität (vgl. Abschnitt 3.2.3). Durch Stimulation dieser mit dem entsprechenden synthetischen Liganden konnte eine, ihrer physiologischen Rezeptorvariante entsprechende, Signaltransduktion induziert werden. Gleichzeitig zeigten die verschiedenen synthetischen Zytokinrezeptorvarianten keinerlei Zellproliferation nach Stimulation mit ihrem ursprünglichen Liganden (IL-23 bzw. IL-12). Aufgrund der einfachen Austauschbarkeit der zu analysierenden Rezeptoren verschiedener Zytokinfamilien eröffnen sich durch den Einsatz synthetischer Zytokinrezeptoren neue analytische Möglichkeiten in der Zytokinforschung. Wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt, ermöglichen diese hochspezifischen und nicht von endogenen Liganden abhängigen Rezeptoren nicht nur die Analyse bereits bekannter Signalwege, sondern eignen sich auch zur Analyse neuartiger Rezeptorkombinationen.

Sowohl zu analytischen als auch therapeutischen Zwecken besitzen synthetische Zytokinrezeptoren aufgrund ihrer hohen Spezifität, guten Steuerbarkeit und universellen Einsatzmöglichkeiten großes Potenzial (68). Ein möglicher therapeutischer Einsatz könnte hierbei unter anderem im Einbringen von synthetischen Zytokinrezeptor tragenden Immunzellen in einen Organismus liegen. Diese Zellen könnten anschließend über die Zufuhr des entsprechenden synthetischen Liganden spezifisch aktiviert werden und ihre immunologische Wirkung entfalten.

4.2 Der IL-23R bildet funktionell aktive Homodimere

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente dienen in erster Linie dem ausführlichen Nachweis eines funktionell aktiven IL-23R Homodimers, welches bereits 2015 durch Schröder *et al.* sowie 2018 durch Engelowski *et al.* beschrieben wurde (37,74). Das Ziel dieser Arbeit liegt somit in der Charakterisierung eines weiteren, bisher noch nicht eindeutig nachgewiesenen, möglichen Rezeptorkomplexes innerhalb der IL-12 Familie.

Die IL-12 Rezeptorfamilie besteht aus den Rezeptoren gp130, WSX-1, IL-12R β 1, IL-12R β 2 sowie IL-23R und deren Kombinationen untereinander (siehe Abb. 26) (13).

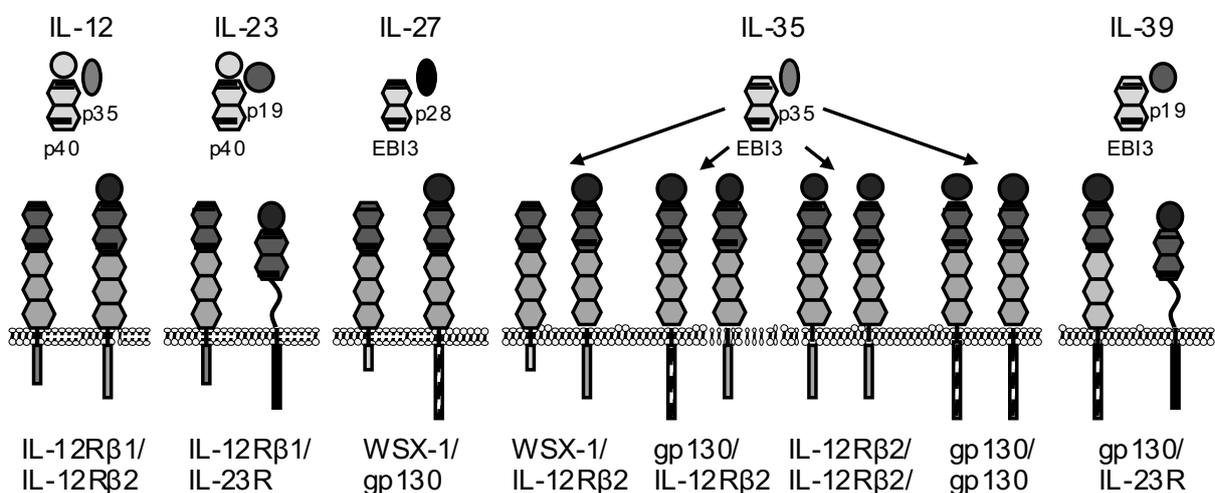


Abb. 26: Zytokine und Rezeptoren der IL-12 Familie. IL-12, bestehend aus IL-12p40 und IL-12p35, interagiert mit dem IL-12 Rezeptorkomplex, bestehend aus IL-12R β 1 und IL-12R β 2. IL-23, bestehend aus IL-12p40 und IL-23p19, bindet an den IL-23 Rezeptorkomplex, bestehend aus IL-12R β 1 und IL-23R. Das ebenfalls heterodimere, aus EBI3 und IL-27p28 bestehende, IL-27 entfaltet durch die Interaktion mit WSX-1 und gp130 seine Wirkung. Für das aus EBI3 und IL-12p35 bestehende IL-35 sind vier mögliche Rezeptorkomplexe beschrieben: WSX-1/IL-12R β 2, gp130/IL-12R β 2, IL-12R β 2/IL-12R β 2 und gp130/gp130. IL-39, bestehend aus EBI3 und IL-23p19, bindet den gp130/IL-23 Rezeptorkomplex. Die verschiedenen Ig-Domänen sind in Kreisform dargestellt. Membrangebundene FNIII-Domänen sind in hellen Grautönen dargestellt. Modifiziert nach Floss *et al.* 2020 (12).

Für die IL-23 Signaltransduktion ist ein heterodimerer Rezeptorkomplex bestehend aus dem IL-12R β 1, welcher die hochaffine Ligandenbindung der p40- (β -) Untereinheit vermittelt und dem IL-23R, welcher sowohl der Bindung der p19- (α -) Untereinheit als auch der eigentlichen Signaltransduktion dient, verantwortlich. Die Bindung von IL-23 an dessen Rezeptorkomplex induziert eine proinflammatorische JAK/STAT-vermittelte Signaltransduktion (89).

Um eine mögliche Homodimerisierung des IL-23R nachzuweisen wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Versuchsansätze gewählt. In beiden Ansätzen wurden vorrangig die in der Zytokinforschung bewährten und der AG Scheller bereits vorliegenden Ba/F3-gp130-Zellen verwendet. Dies sind murine prä B-Zellen, die humanes gp130 auf ihrer Oberfläche exprimieren und somit HIL-6 abhängig proliferieren (90,91). Eine Stimulation dieser Zellen erfolgt durch die Zugabe von HIL-6, einem Fusionszytokin bestehend aus IL-6 und dem löslichen IL-6R, welche über einen Polypeptid-*linker* artifiziell verbundenen sind (80). Auf diese Weise konnte die Stimulation von Ba/F3-gp130 Zellen, welche die zu analysierenden Rezeptorvarianten trugen, durch die entsprechenden Liganden mit der HIL-6 Stimulation verglichen werden.

In der Analyse der humanen und murinen physiologischen Rezeptorvarianten (vgl. Abschnitt 3.1 bzw. Abb. 4) zeigte sich in den Ba/F3-gp130-Zellen, welche den murinen oder den humanen IL-23R exprimierten, eine IL-23 abhängige Zellproliferation. Da ausschließlich der IL-23R in diese Zellen transduziert wurde und in diesem Versuchsansatz weder eine IL-3 noch eine HIL-6 Stimulation zusätzlich zur IL-23 Stimulation erfolgte, muss die funktionelle Aktivität der Zellen in der Homodimerisierung des IL-23R begründet liegen. Auch wenn die IL-23 abhängige Proliferation der Ba/F3-gp130-mIL-23R-Zellen nur geringfügig und erst durch eine höhere Konzentration induziert werden konnte, so ist diese weiterhin deutlich erkennbar.

In den, in Abschnitt 3.2 durchgeführten, Analysen des synthetischen IL-23R wurden ebenfalls mittels Proliferations- und Signaltransduktionsanalyse funktionell aktive Homodimere des IL-23R nachgewiesen. Die Proliferationsanalyse (vgl. Abb. 18A) ergab sowohl für die, ausschließlich den physiologischen Rezeptor oder den synthetischen Zytokinrezeptor tragenden Zellen, als auch für die Zelllinie mit beiden Rezeptorvarianten eine IL-23 bzw. 2xGFP abhängige Zellproliferation. Auffällig war die generell starke Proliferation unter Stimulation mit 2xGFP. Ferner proliferierten die Ba/F3-gp130-hIL-23R/G_{VHH}-hIL-23R Zellen unter IL-23 Stimulation verglichen mit den Ba/F3-gp130-hIL-23R Zellen etwas weniger stark, was auf eine verminderte Expression des IL-23R in dieser Zelllinie hinweist. Bei der Analyse der Signaltransduktion (vgl. Abb. 18B) wurde, außer bei Stimulation mit 10 ng/ml 2xGFP, die Phosphorylierung von STAT3, STAT5 sowie ERK1/2 und somit die funktionelle Aktivität der

Ba/F3-gp130-hIL-23R/G_{VHH}-hIL-23R Zellen nachgewiesen. In der weiterhin durchgeführten Proliferationsanalyse mit steigenden Konzentrationen von HmIL-23 und 2xGFP (vgl. Abb. 19) erfolgte eine vermehrte Zellproliferation der Ba/F3-gp130-hIL-23R/G_{VHH}-hIL-23R Zellen. Interessanterweise ist der Anstieg der Proliferationsraten unter Stimulation mit 2xGFP stärker als unter HmIL-23-Stimulation. Diese Ergebnisse legen nahe, dass für den synthetischen Zytokinrezeptor neben der, durch Einsatz von *nanobodies*, erhöhten Spezifität der Ansteuerbarkeit der Rezeptoren durch synthetische Liganden zusätzlich eine verstärkte Signaltransduktion induziert wurde. Ferner ist zu beachten, dass der Einsatz von HmIL-23, bestehend aus den beiden über einen Peptid-*linker* verbundenen IL-23 Untereinheiten p40 und p19, ohnehin schon zu einer stärkeren Signaltransduktion führt als die Stimulation mit physiologischem IL-23 (31).

Dies spiegelt unter anderem auch die zukünftigen therapeutischen Möglichkeiten von synthetischen Zytokinrezeptoren wider, da somit mit einem geringeren Risiko für mögliche ligandeninduzierte Kreuzreaktionen hochspezifisch in entsprechende Stoffwechselprozesse eingegriffen werden kann. Die in dieser Arbeit erzeugte Zelllinie mit physiologischen und synthetischen hIL-23R ermöglicht hierbei eine bessere Vergleichbarkeit der beiden Stimulationen.

In einem weiteren Ansatz wurde die chimäre Rezeptorvariante „mIL-12R β ₁^{EZ}-IL-23R_{IZ}“ (vgl. Abschnitt 3.3) ebenfalls mittels Analyse der Zellproliferation und Signaltransduktion unter verschiedenen Stimulationsbedingungen untersucht. Ba/F3-gp130 Zellen, die den chimären „mIL-12R β ₁^{EZ}-IL-23R_{IZ}“ Zytokinrezeptor und den physiologischen IL-23R trugen, zeigten nach Stimulation mit HIL-23 sowohl eine vermehrte Zellproliferation (siehe Abb. 23 und Abb. 24) als auch eine erfolgreiche Signaltransduktion (siehe Abb. 25). Da die Ba/F3-gp130-mIL-23R/mIL-12R β ₁^{EZ}-IL-23R_{IZ} Zelllinie intrazellulär ausschließlich IL-23R Anteile aufwies, lässt sich die Aktivität dieser Zelllinie somit auf eine Interaktion der intrazellulären IL-23R Anteile zurückführen und bestätigt erneut die Ausbildung funktionell aktiver Homodimere des IL-23R. Die Vermutung von Schröder *et al.*, dass Homodimere des IL-23R für die Aktivität von Ba/F3-gp130-IL-23R Zellen nach Stimulation mit dem Fusionsprotein p40_D2D3-p19-Fp verantwortlich waren, wurde durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente somit bekräftigt (74). Auch die Beobachtungen von Engelowski *et al.* im Rahmen der Experimente an synthetischen Zytokinrezeptoren wurden mittels dieser Dissertation ebenfalls bestätigt (37). Intrazelluläre humane bzw. murine IL-23R Anteile, die durch extrazelluläre Bindung der entsprechenden Liganden homodimerisieren, führen zu einer funktionellen Aktivität der entsprechenden Zelllinien bezüglich der Zellproliferation und der

Signaltransduktion. Ferner gelang es Hummel *et al.* ebenfalls die funktionelle Aktivität von natürlichen mIL-23 Rezeptoren nachzuweisen (33).

Durch den Nachweis der funktionellen Aktivität von IL-23R Homodimeren ergeben sich neue Fragestellungen bezüglich der strukturellen Abläufe innerhalb des Rezeptordimerisierungsprozesses des IL-23R nach Ligandenbindung. IL-23 interagiert physiologischerweise mit seiner p40- (β -) Untereinheit über die *site 2* Bindungsstelle mit dem IL-12R β 1 und mit seiner p19- (α -) Untereinheit über die *site 3* Bindungsstelle mit dem IL-23R (20,21,74,82,92) (siehe Abb. 27A). Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete alleinige Aktivität des IL-23R, bei fehlendem Vorhandensein des IL-12R β 1, lässt eine vom „*site 1-2-3 model*“ abweichende Zytokin-Rezeptor-Interaktion vermuten.

Bloch *et al.* postulierten diesbezüglich, dass eine hochaffine Bindung von IL-23 an den IL-23R zu einer Konformationsänderung von IL-23 führt, welche daraufhin eine niederaffine Bindung des IL-12R β 1 an IL-23 vermittelt. Im Gegensatz zu anderen Zytokinrezeptoren scheint hierbei die Interaktion der extrazellulären Domänen des IL-23R und des IL-12R β 1 für die anschließende Signaltransduktion nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (92). Zwar widersprechen neuere Studien diesen Affinitätsmessungen, jedoch wurde auch hier eine vom „*site 1-2-3 model*“ abweichende Bindungsform analysiert: Lay *et al.* postulierten zwar eine höhere Affinität von IL-23 zum IL-12R β 1 als zum IL-23R, allerdings zeigen auch deren Ergebnisse ein alternatives Bindungsverhalten auf. Die Koexpression vom IL-23R und IL-12R β 1 führte zur Bildung einer hochaffinen Bindungsstelle für IL-23, welche die Affinitäten der einzelnen Rezeptoren zu IL-23 bei weitem überstieg. Die Bindung von IL-23 an den präformierten IL-23R-IL12R β 1 Rezeptorkomplex führte anschließend zur Konformationsänderung und somit zur Signaltransduktion (93).

In der Zusammenschau der verschiedenen Studien und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist für die Rekrutierung von IL-23R Homodimeren somit unter anderem eine Dimerisierung von IL-23 vorstellbar, welches auf diese Weise über je eine seiner p19-Untereinheiten jeweils einen IL-23R ansteuern und somit die Aneinanderlagerung eines homodimeren IL-23 Rezeptorkomplexes vermitteln könnte (siehe Abb. 27B).

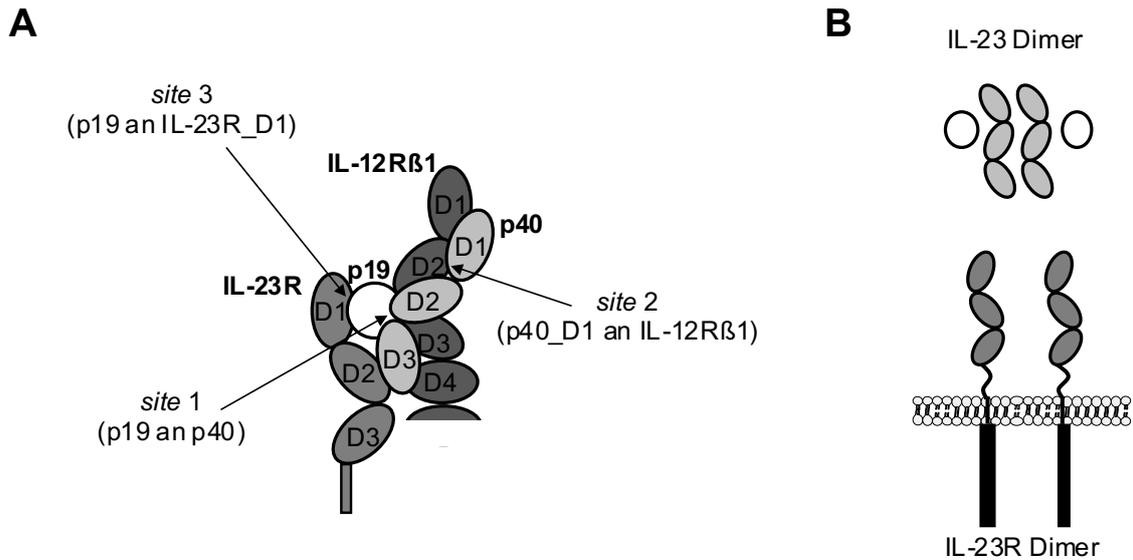


Abb. 27: Schematische Darstellung der physiologischen (A) und der homodimeren (B) IL-23 Rezeptorrekrutierung. A IL-23 bindet den IL-23R über die *site 3* Bindungsstelle, welche durch die Interaktion von p19 mit der D1 Domäne des IL-23R gebildet wird. Über die *site 2* Bindungsstelle interagiert IL-23 mit dem IL-12Rβ1 (p40_D1 bindet IL-12Rβ1). Die *site 1* Bindungsstelle wird durch die Interaktion der p19 und p40 Untereinheiten von IL-23 gebildet. Modifiziert nach Scheller *et al.* 2021 (94). B Schematische Darstellung einer möglichen Rekrutierung von IL-23R Homodimeren durch die Dimerisierung von IL-23. Modifiziert nach Floss *et al.* 2017 (73).

Die funktionelle Aktivität eines monomeren IL-23R ist auszuschließen, da auf diese Weise keine Transphosphorylierung der rezeptorassoziierten Januskinasen stattfinden und somit keine IL-23 spezifische Signaltransduktion induziert werden kann (95). Diese besteht in der gegenseitigen Phosphorylierung der rezeptorassoziierten Januskinasen nach Oligomerisation der Zytokinrezeptoren, welche die weitergehende Signaltransduktion samt STAT-Aktivierung induziert (96). Ferner benötigt die Rekrutierung des IL-23R durch IL-23 stets p40 zusätzlich zur p19 Untereinheit, sodass eine funktionell aktive Rekrutierung von IL-23R Homodimeren durch p19 Homodimere ebenfalls auszuschließen ist (74,97).

4.3 Der IL-12Rβ2 bildet funktionell aktive Homodimere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden synthetische murine und humane des IL-12Rβ2 generiert. Hierfür wurde analog zur Herstellung der synthetischen IL-23 Zytokinrezeptoren vorgegangen, indem Anteile der extrazellulären Domäne des IL-12Rβ2 gegen GFP- bzw. mCherry-spezifische *nanobodies* ausgetauscht wurden (vgl. Abschnitt 3.2.1). Auf diese Weise sollte die, in der Literatur bereits für die Stimulation mit IL-35 beschriebene, funktionell aktive Homodimerisierung des IL-12Rβ2 durch Einsatz des SyCyR-Systems bestätigt werden. Interessanterweise wurde im Rahmen dieser Arbeit die funktionell aktive Homodimerisierung des IL-12Rβ2 ebenfalls für die Stimulation mit IL-12 nachgewiesen.

Der IL-12R β 2 bildet einerseits zusammen mit dem IL-12R β 1 den heterodimeren IL-12 Rezeptorkomplex (vgl. Abschnitt 1.1.2), andererseits ist er auch Bestandteil verschiedener IL-35 Rezeptorkomplexe (12) (siehe Abb. 26). IL-35 stellt ein 2007 identifiziertes Zytokin der IL-12 Familie dar, welches aus der α -Untereinheit p35 und der β -Untereinheit EB13 besteht und sich als inhibitorisches, immunsuppressives Zytokin in vielen Aspekten von anderen Zytokinen der IL-12 Familie unterscheidet (98). Es ist ein nicht-kovalent gebundenes heterodimeres Zytokin und benötigt die Koexpression seiner beiden Untereinheiten innerhalb einer Zelle um regelrecht sezerniert werden zu können (99). IL-35 entfaltet seine immunsuppressive Wirkung unter anderem nach Sekretion durch IL-35-produzierende regulatorische B- (i35-Breg) sowie T-Zellen (iTR35), die infolge einer IL-35 Sekretion im Sinne einer positiven Rückkopplung proliferieren (100,101). Eine Sonderstellung innerhalb der IL-12 Familie nimmt IL-35 auch aufgrund seiner Rezeptorkomplexe ein, welche sowohl von Homodimeren aus IL-12R β 2 oder gp130, sowie den Heterodimeren IL-12R β 2/gp130 und IL-12R β 2/WSX-1 gebildet werden. Nach Aktivierung kommt es über eine Heterodimerisierung von STAT1 und STAT4 zu einer vermehrten Expression von IL-35 (positive Rückkopplung) (98). Anfangs wurde ausschließlich die Phosphorylierung von STAT1 und nicht von STAT3 durch IL-35 beschrieben (102). Weitere Studien konnten jedoch aufdecken, dass IL-35 entsprechend den weiteren Zytokinen der IL-12 Familie ebenfalls sowohl STAT1 als auch STAT3 phosphoryliert (73). In verschiedenen tierexperimentellen Studien konnte bereits die immunsuppressive Wirkung von IL-35 bezüglich Uveitiden, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie Arthritiden nachgewiesen und somit das Interesse an der Ausweitung der IL-35 Forschung gesteigert werden (99).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen (vgl. Abschnitt 3.2.3) ergaben sowohl für die physiologischen als auch für die synthetischen murinen und humanen Rezeptorvarianten des IL-12R β 2 den Nachweis einer funktionell aktiven Homodimerisierung. Eine nennenswerte Besonderheit der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Ba/F3-Zellen ist ihre geringe STAT4-Expression (83). Aus diesem Grund wurde auf die Analyse von STAT4, welches physiologischerweise zur IL-12 Sekretion führt, aber auch IL-12 abhängig exprimiert wird und in T- und NK-Zellen zur IFN γ -Sekretion führt, verzichtet (103).

Da für IL-12 weder proliferative Wirkungen auf Ba/F3-Zellen, noch eine mögliche gp130-Interaktion, wohl aber die Interaktion mit IL-12R β 2 beschrieben ist (vgl. Abschnitt 1.1.2), lässt sich die Aktivität der Zellen unter Stimulation mit HIL-12 am ehesten auf die Homodimerisierung des IL-12R β 2 zurückführen. Analog zu den ausgeführten Überlegungen bezüglich der Homodimerisierung des IL-23R, speziell dem Abweichen vom „*site 1-2-3*

model“ (vgl. Abschnitt 4.2), sind auch im Falle der vermuteten Homodimerisierung des IL-12R β 2 IL-12 Dimere vorstellbar, welche für die Rezeptorhomodimerisierung verantwortlich sein könnten. Die p35-Untereinheit von IL-12 bindet physiologischerweise an den IL-12R β 2 (vgl. Abb. 1), sodass hier analog zu den vorangegangenen Überlegungen bezüglich des IL-23R (vgl. Abschnitt 4.2) eine mögliche Dimerisierung von IL-12 durch Bindung von jeweils einer p35-Untereinheit an einen IL-12R β 2 zu der Homodimerisierung zweier IL-12R β 2 führen könnte (20,21).

Ferner ist bezüglich des IL-12R β 2 die monomere Aktivität des Rezeptors auszuschließen, da auf diese Weise, wie ebenfalls beim IL-23R, keine Transphosphorylierung der IL-12R β 2-assoziierten Januskinasen stattfinden kann (95).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine funktionell aktive Homodimerisierung des IL-12R β 2 *in vitro* neben IL-35 auch durch IL-12 induziert werden kann. Eine in diesem Zusammenhang spannende Fragestellung ist, ob IL-12 und IL-35 auch *in vivo* simultane Signale induzieren könnten. Hierbei würde eine mögliche Kreuzreaktivität unterhalb der miteinander verwandten Zytokine am ehesten über die gemeinsame, IL-12R β 2 spezifische, p35-Untereinheit vermittelt werden (104). Ein monoklonaler Antikörper, welcher spezifisch p35 bindet und somit wertvolle Erkenntnisse diesbezüglich liefern könnte, existiert derzeit noch nicht. Einen aktuellen Meilenstein innerhalb der Interleukinforschung stellt allerdings die Generierung muriner, spezifisch gegen IL-12 gerichteter, monoklonaler Antikörper dar. Diese Antikörper interagieren ausschließlich mit IL-12 und nicht mit den einzelnen Untereinheiten, sodass keinerlei Interaktion mit IL-23 oder IL-35 stattfindet (105). Hieraus resultieren neue Möglichkeiten bezüglich der grundlegenden IL-12 Analyse sowie der Einführung neuer spezifischer Therapeutika gegen IL-12 vermittelte Erkrankungen. Fortschreitende Untersuchungen und Inventionen dieser Art werden die Frage einer möglichen Kreuzreaktivität von IL-12 und IL-35 über eine Homodimerisierung des IL-12R β 2 in Zukunft beantworten können.

4.4 Der IL-12R β 1 bildet keine funktionell aktiven Homodimere

Der IL-12R β 1 ist sowohl gemeinsam mit dem IL-12R β 2 Bestandteil des IL-12 Rezeptorkomplexes, als auch mit dem IL-23R Bestandteil des IL-23 Rezeptorkomplexes (12). Im Zuge der Signaltransduktion bindet der IL-12R β 1 direkt die p40 Untereinheit von IL-12 und unterscheidet sich diesbezüglich vom Bindungsverhalten entsprechend des „*site 1-2-3 model*“ (21,74,82). Der ubiquitär und konstitutiv exprimierte IL-12R β 1 ist vorrangig der Ligandenbindung von Zytokinen und weniger ihrer Signaltransduktion zugeschrieben (8). In

Abwesenheit von p35 oder p19 liegen allerdings vermehrt aktive p40 Monomere und, über Disulfidbrücken verbundene, p40 Homodimere (p80) vor, die nach Anlagerung an den IL-12R β 1 dessen Internalisierung unterbinden und somit anti-autoimmune Eigenschaften aufweisen (102,106). Der therapeutische Einsatz von p40 konnte in verschiedenen Tiermodellen bereits gute Wirksamkeiten in der Therapie der EAE und der autoimmunvermittelten Arthritis erzielen (106,107). Interessanterweise induziert der IL-12R β 1 allerdings auch eine gewisse, IL-12 unabhängige, eigenständige Signaltransduktion, die zur Einwanderung von Makrophagen in entsprechende Gewebe sorgt. Dieses pro-inflammatorische Geschehen wird über die Bindung von p80 an IL-12R β 1 vermittelt und konnte im Rahmen von *Asthma bronchiale* und viral bedingten respiratorischen Infekten nachgewiesen werden (108). Ferner kommt es nach Pathogenexposition mit beispielsweise *Mycobacterium tuberculosis* zur vermehrten p80-Sekretion, welches wiederum über den auf DCs ausgeprägten IL-12R β 1 zu einer adaptiven Immunreaktion und Migration der DCs in die Lymphknoten des betroffenen Areals führt (109) (siehe Abb. 28).

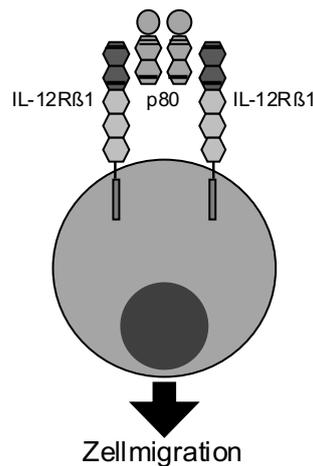


Abb. 28: Schematische Darstellung des möglichen strukturellen Ablaufs der durch p80 vermittelten Immunzellmigration. Die Rekrutierung eines IL-12R β 1 Homodimers durch ein p40 Homodimer (p80) führt zur anschließenden Zellmigration von Immunzellen, wie beispielsweise Makrophagen und DCs. Anders als bei der Rekrutierung des IL-12R β 1 durch IL-12 kommt es hierbei zu keiner Heterodimerisierung mit anderen Zytokinrezeptoren, sondern zu einer Homodimerisierung des IL-12R β 1. Hierin begründet sich die zur IL-12 induzierten abweichende Aktivität des IL-12R β 1.

Aufgrund der zuvor beschriebenen, p80 induzierten, Aktivität war von einer funktionell aktiven Homodimerisierung des IL-12R β 1 nach Bindung jeweils einer p40-Untereinheit des p40-Homodimers an jeweils einen IL-12R β 1 auszugehen. Zur Überprüfung dieser Hypothese, für die bisher keine detaillierten biochemischen Studien vorliegen, wurde im Rahmen dieser Arbeit der IL-12R β 1 Wildtyprezeptor sowie dessen synthetische Zytokinrezeptorvariante hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens unter spezifischer Stimulation analysiert (siehe Abb. 20). Einzig die mit der cDNA des hIL-12R β 1 und hIL-12R β 2 transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen

(Positivkontrolle) zeigten in diesem Versuchsansatz eine IL-12 abhängige Zellproliferation. Weder kam es bei den, den physiologischen oder synthetischen hIL-12R β 1 exprimierenden Zellen, noch bei der beide Rezeptorvarianten tragenden Zelllinie zur vermehrten Zellproliferation nach IL-12 oder 2xGFP Stimulation. Für die IL-12 Stimulation des Wildtyprezeptors war dieses Ergebnis zu erwarten, da die p35-Untereinheit als Interaktionspartner des IL-12R β 2 fungiert und somit IL-12 bei ausschließlich vorkommendem IL-12R β 1 keine vollwertige Bindung mit eben diesem eingehen kann (12). Geht man allerdings, wie zuvor beschrieben (vgl. Abschnitt 4.3), von einer möglichen Dimerisierung von IL-12 aus, wäre eine Homodimerisierung von IL-12R β 1 durchaus in Betracht zu ziehen. Dies würde eine strukturelle, jedoch funktionell nicht aktive Homodimerisierung des IL-12R β 1 möglich erscheinen lassen.

Die anfangs in diesem Abschnitt beschriebene, mögliche Interaktion von p80 und dem IL-12R β 1, welche durch Homodimerisierung des IL-12R β 1 die weitere Signaltransduktion induziert, konnte somit im Rahmen dieser Arbeit nicht über eine IL-12 Stimulation erzeugt werden. Hierfür wurden jedoch GFP-spezifische synthetische hIL-12R β 1 Rezeptorvarianten retroviral in Ba/F3-gp130-Zellen transduziert und nach Stimulation mit 2xGFP untersucht. Wie bei den zuvor an synthetischen Zytokinrezeptorvarianten von hIL-23R, hIL-12R β 2 und mIL-12R β 2 durchgeführten Experimenten (vgl. Abschnitt 3.2.4) war auch hier von einer durch den synthetischen Liganden induzierten Homodimerisierung der Rezeptoren auszugehen. Auf diese Weise sollte es zu einer Interaktion der, durch das 2xGFP Dimer gebundenen, extrazellulären Rezeptoranteile des synthetischen hIL-12R β 1 Rezeptors kommen, welche eine weitere Signaltransduktion induzieren könnte. Im Rahmen der Experimente am synthetischen hIL-12R β 1 Zytokinrezeptor kam es jedoch zu keinerlei Proliferation der Zellen. Die für die anderen synthetischen Zytokinrezeptorvarianten nachgewiesene funktionell aktive Homodimerisierung (vgl. Abschnitt 3.2.4) konnte somit nicht für den synthetischen hIL-12R β 1 Zytokinrezeptor nachgewiesen werden. Somit bleibt hinsichtlich der p80 induzierten Signaltransduktion der genaue strukturelle Prozess der Signaltransduktion des hIL-12R β 1 weiterhin unklar. Eine funktionell aktive Homodimerisierung des hIL-12R β 1 erscheint nach den im Rahmen dieser Arbeit generierten Ergebnissen somit nicht für die zuvor beschriebenen, p80 induzierten, immunologischen Effekte verantwortlich zu sein.

Untersuchungen mit chimären IL-12R β 1 Varianten, die intrazellulär die Regionen von gp130 oder IL-23R besitzen, könnten beweisen, dass eine Homodimerisierung des IL-12R β 1 grundsätzlich möglich ist.

4.5 Schlussfolgerungen

Diese Arbeit diene vorrangig der ausführlichen Analyse der IL-23 Signaltransduktion. Die zuvor beobachtete funktionell aktive IL-23R Homodimerisierung sollte in verschiedenen Ansätzen überprüft und belegt werden. Zusätzlich wurden die humanen Zytokinrezeptoren IL-12R β 1 und IL-12R β 2 sowie der murine IL-12R β 2 in die vorliegende Arbeit mit einbezogen. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der Großteil der Analysen sowohl an physiologischen als auch an synthetischen Zytokinrezeptorvarianten. Somit wurden ebenfalls Unterschiede der physiologischen und der synthetischen Ansteuerung der verschiedenen Rezeptoren vergleichend analysiert.

Zusammenfassend bestätigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Hypothese, dass IL-23 über die Bildung von IL-23R Homodimeren eine regelrechte Signaltransduktion vermitteln kann. Fraglich bleibt, inwiefern dieser neu beschriebene IL-23R/IL-23R Rezeptorkomplex sich in seiner Formierung und Aktivität *in vitro* und *in vivo* unterscheidet. Sollte auch *in vivo* die Bildung dieses Rezeptorhomodimeres stattfinden, müsste dessen Bedeutung in verschiedenen IL-23 abhängigen Krankheitsgeschehen sowie in deren Therapien, beziehungsweise der Generierung neuer Therapeutika, eventuell erneut evaluiert werden. Außerdem sollten fortschreitende Analysen bezüglich der Ligandenbindung bei IL-23R Homodimeren durchgeführt werden, um die IL-23 Ligandenbindung endgültig verstehen zu können.

Ferner belegten die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse, dass die p80 abhängige und IL-12R β 1 vermittelte Signaltransduktion nicht analog zur IL-23R oder IL-12R β 2 Homodimerisierung abläuft, sondern ein anderer, bisher noch nicht geklärter struktureller Prozess in diesem Falle für die Signaltransduktion verantwortlich sein muss.

Die sich, aus der in dieser Arbeit nachgewiesenen funktionell aktiven Homodimerisierung des IL-12R β 2, ergebende Fragestellung einer möglichen Kreuzreaktivität zwischen IL-12 und IL-35 *in vivo* kann ebenfalls nur durch weitere Analysen geklärt werden. Ein wichtiger Schritt zur Klärung dieser Fragestellung wurde allerdings bereits durch die Herstellung eines IL-12 spezifischen monoklonalen Antikörpers gelegt (105). Sollte es in Zukunft gelingen auch p35 spezifische mAbs zu generieren, würde das ebenfalls einen Meilenstein der IL-12 Forschung darstellen und zum besseren Verständnis der IL-12 Signaltransduktion beitragen.

Ferner wurde in einer aktuellen Studie gezeigt, dass primäre CLL- (chronisch lymphatische Leukämie) Zellen unstimuliert den IL-23R, nicht jedoch den IL-12R β 1 exprimieren (110). Hier könnten weitere Versuche ansetzen, welche die Hypothese der funktionellen IL-23R

Homodimerisierung bestätigen und gleichzeitig neue Erkenntnisse im Verständnis des Krankheitsbildes CLL hervorbringen könnten.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol.* 2011;164(4):1079–106.
2. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018;233(9):6425–40.
3. Vaillant AAJ, Qurie A. Interleukin. StatPearls Publ LLC, Treasure Isl. 2019;1–13.
4. Reyes P, Brown KN. Physiology, Cellular Messengers. StatPearls Publ LLC, Treasure Isl. 2020;1–9.
5. Tang P, Hung MC, Klostergaard J. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry.* 1996;35(25):8216–25.
6. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(2 SUPPL. 2):460–75.
7. Hirahara K, Schwartz D, Gadina M, Kanno Y, O'Shea JJ. Targeting cytokine signaling in autoimmunity: back to the future and beyond. *Curr Opin Immunol.* 2016;43:89–97.
8. Tait Wojno ED, Hunter CA, Stumhofer JS. The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery. *Immunity.* 2019;50(4):851–70.
9. Vignali DAA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol.* 2012;13(8):722–8.
10. Vignali LLJ and DAA. Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunol Res.* 2008;23(1):1–7.
11. Bacon CM, Petricoin EF, Ortaldo JR, Rees RC, Larner AC, Johnston JA, O'Shea JJ. Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(16):7307–11.
12. Floss DM, Moll JM, Scheller J. IL-12 and IL-23-Close relatives with structural homologies but distinct immunological functions. *Cells.* 2020;9(10):1–24.
13. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, Klunker S, Meyer N, O'Mahony L, Palomares O, Rhyner C, Quaked N, Schaffartzik A, Van De Veen W, Zeller S, Zimmermann M, Akdis CA. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(3):701-721.e70.
14. Bastian D, Wu Y, Betts BC, Yu XZ. The IL-12 cytokine and receptor family in graft-

- vs.-host disease. *Front Immunol.* 2019;10:1–13.
15. Gee K, Guzzo C, Mat NFC, Ma W, Kumar A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy - Drug Targets.* 2009;8(1):40–52.
 16. Teng MWL, Bowman EP, McElwee JJ, Smyth MJ, Casanova JL, Cooper AM, Cua DJ. IL-12 and IL-23 cytokines: From discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Med.* 2015;21(7):719–29.
 17. Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu CY, Gately MK, Gubler U. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two β -type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(24):14002–7.
 18. de Vos AM. Crystal structure of the complex between human growth hormone and the extracellular domain of its reception. *Biomed Pharmacother.* 1993;47(1):46–7.
 19. Wu C you, Wang X, Gadina M, O’Shea JJ, Presky DH, Magram J. IL-12 Receptor β 2 (IL-12R β 2)-deficient mice are defective in IL-12-mediated signaling despite the presence of high affinity IL-12 binding sites. *J Immunol.* 2000;165(11):6221–8.
 20. Esch A, Masiarz A, Mossner S, Moll JM, Grötzinger J, Schröder J, Scheller J, Floss DM. Deciphering site 3 interactions of interleukin 12 and interleukin 23 with their cognate murine and human receptors. *J Biol Chem.* 2020;295(30):10478–92.
 21. Glassman CR, Mathiharan YK, Jude KM, Su L, Panova O, Lupardus PJ, Spangler JB, Ely LK, Thomas C, Skiniotis G, Garcia KC. Structural basis for IL-12 and IL-23 receptor sharing reveals a gateway for shaping actions on T versus NK cells. *Cell.* 2021;184(4):983-999.e24.
 22. Gubler U, Chua AO, Schoenhaut DS, Dwyer CM, McComas W, Motyka R, Nabavi N, Wolitzky AG, Quinn PM, Familletti PC, Gately MK. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(10):4143–7.
 23. Dawson K, Stansby G, Platts A, Hamilton G. Thrombolysis - A challenge for radiologists and surgeons. *Clin Radiol.* 1990;42(6):447–8.
 24. Ueno H. The IL-12-STAT4 axis in the pathogenesis of human systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol.* 2020;50(1):10–6.
 25. Hu J, Roy SK, Shapiro PS, Rodig SR, Reddy SPM, Plataniias LC, Schreiber RD, Kalvakolanu D V. ERK1 and ERK2 activate CCAAAT/enhancer-binding protein- β -dependent gene transcription in response to interferon- γ . *J Biol Chem.* 2001;276(1):287–97.

26. Ma X, Chow JM, Gri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF, Dzialo R, Trinchieri G. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon γ in monocytic cells. *J Exp Med.* 1996;183(1):147–57.
27. Yan J, Smyth MJ, Teng MWL. Interleukin (IL)-12 and IL-23 and their conflicting roles in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;(II).
28. Wong U, Cross RK. Expert opinion on interleukin-12/23 and interleukin-23 antagonists as potential therapeutic options for the treatment of inflammatory bowel disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 2019;28(5):473–9.
29. Jeon C, Sekhon S, Yan D, Afifi L, Nakamura M, Bhutani T. Monoclonal antibodies inhibiting IL-12, -23, and -17 for the treatment of psoriasis. *Hum Vaccin Immunother.* 2017;13(10):2247–59.
30. Pope RM, Shahrara S. Possible roles of IL-12-family cytokines in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9(4):252–6.
31. 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 ru, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu YJ, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, De Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 2000;13(5):715–25.
32. Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O’Farrell AM, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, de Waal Malefyt R, Moore KW. A Receptor for the Heterodimeric Cytokine IL-23 Is Composed of IL-12R β 1 and a Novel Cytokine Receptor Subunit, IL-23R. *J Immunol.* 2002;168(11):5699–708.
33. Hummel TM, Ackfeld T, Schönberg M, Ciupka G, Schulz F, Oberdoerster A, Grötzinger J, Scheller J, Floss DM. Synthetic deletion of the interleukin 23 receptor (IL-23R) stalk region led to autonomous IL-23R homodimerization and activation. *Am Soc Microbiol.* 2017;37(17):1–19.
34. Kobayashi BYM, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G. Identification and purification of natural killer cells stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med.* 1989;170:827–45.
35. 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. *Mol Biol Cell*. 2016;27(14):2301–16.
36. Chen Z, Laurence A, Kanno Y, Pacher-Zavisin M, Zhu BM, Tato C, Yoshimura A, Hennighausen L, O’Shea JJ. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(21):8137–42.
 37. 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. *Nat Commun*. 2018;9(1).
 38. 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. *J Biol Chem*. 2013;288(27):19386–400.
 39. Lin Sun, Chang He, Lekha Nair, Justine Yeung and CEE. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. *Physiol Behav*. 2016;176(1):100–106.
 40. Noster R, Riedel R, Mashreghi MF, Radbruch H, Harms L, Haftmann C, Chang HD, Radbruch A, Zielinski CE. IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells. *Sci Transl Med*. 2014;6(241).
 41. Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, Wu C, Kleinewietfeld M, Kunder S, Hafler DA, Sobel RA, Regev A, Kuchroo VK. Induction and molecular signature of pathogenic T H 17 cells. *Nat Immunol*. 2012;13(10):991–9.
 42. Zenobia C, Hajishengallis G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol 2000*. 2015;69(1):142–59.
 43. Griffiths CEM, Strober BE, van de Kerkhof P, Ho V, Fidelus-Gort R, Yeilding N, Guzzo C, Xia Y, Zhou B, Li S, Dooley LT, Goldstein NH, Menter A. Comparison of Ustekinumab and Etanercept for Moderate-to-Severe Psoriasis. *N Engl J Med*. 2010;362(2):118–28.
 44. Floss DM, Schröder J, Franke M, Scheller J. Insights into IL-23 biology: From structure to function. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(5):569–78.
 45. Almradi A, Hanzel J, Sedano R, Parker CE, Feagan BG, Ma C, Jairath V. Clinical trials of IL-12/IL-23 inhibitors in inflammatory bowel disease. *BioDrugs*. 2020;34(6):713–21.
 46. Armstrong AW, Read C. Pathophysiology, clinical presentation and treatment of psoriasis: A review. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;323(19):1945–60.
 47. Jegatheeswaran J, Turk M, Pope JE. Comparison of Janus kinase inhibitors in the

- treatment of rheumatoid arthritis: a systemic literature review. *Immunotherapy*. 2019;11(8):737–54.
48. Cameron DE, Bashor CJ, Collins JJ. A brief history of synthetic biology. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(5):381–90.
 49. Porcar M, Peretó J. Nature versus design: synthetic biology or how to build a biological non-machine. *Integr Biol (United Kingdom)*. 2016;8(4):451–5.
 50. Hemmann U, Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Kurapkat G, Grötzinger J, Wollmert 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. *J Biol Chem*. 1996;271(22):12999–3007.
 51. Firor AE, Jares A, Ma Y. From humble beginnings to success in the clinic: Chimeric antigen receptor-modified T-cells and implications for immunotherapy. *Exp Biol Med*. 2015;240(8):1087–98.
 52. Magee MS, Snook AE. Challenges to chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy for cancer. *Discov Med*. 2014;18(100):265–71.
 53. Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauerhff A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Boyer O, Seman M, Licea A, Serreze D V., Goldbaum FA, Haag F, Koch-Nolte F. Single domain antibodies: Promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol*. 2009;198(3):157–74.
 54. Muyldermans S. Nanobodies: Natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*. 2013;82:775–97.
 55. De Meyer T, Muyldermans S, Depicker A. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends Biotechnol*. 2014;32(5):263–70.
 56. Harmsen MM, Fijten HPD. Improved functional immobilization of lama single-domain antibody fragments to polystyrene surfaces using small peptides. *J Immunoass Immunochem*. 2012;33(3):234–51.
 57. Debie P, Lafont C, Defrise M, Hansen I, van Willigen DM, van Leeuwen FWB, Gijsbers R, D’Huyvetter M, Devoogdt N, Lahoutte T, Mollard P, Hernot S. Size and affinity kinetics of nanobodies influence targeting and penetration of solid tumours. *J Control Release*. 2020;317(2019):34–42.
 58. Van Audenhove I, Gettemans J. Nanobodies as versatile tools to understand, diagnose, visualize and treat cancer. *EBioMedicine*. 2016;8:40–8.

59. Jamnani FR, Rahbarizadeh F, Shokrgozar MA, Ahmadvand D, Mahboudi F, Sharifzadeh Z. Targeting high affinity and epitope-distinct oligoclonal nanobodies to HER2 over-expressing tumor cells. *Exp Cell Res.* 2012;318(10):1112–24.
60. Scully M, Cataland SR, Peyvandi F, Coppo P, Knöbl P, Kremer Hovinga JA, Metjian A, de la Rubia J, Pavenski K, Callewaert F, Biswas D, De Winter H, Zeldin RK. Caplacizumab treatment for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 2019;380(4):335–46.
61. Low S, Wu H, Jerath K, Tibolla A, Fogal B, Conrad R, MacDougall M, Kerr S, Berger V, Dave R, Villalona J, Pantages L, Ahlberg J, Li H, Van Hoorick D, Ververken C, Broadwater J, Waterman A, Singh S, Kroe-Barrett R. VHH antibody targeting the chemokine receptor CX3CR1 inhibits progression of atherosclerosis. *MAbs.* 2020;12(1):1–12.
62. Amy E. Palmer, Yan Qin, Jungwon Genevieve Park and JEM. A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires. *Nat Methods.* 2014;(11):1253–60.
63. Mhatre V. Ho, Ji-Ann Lee and KCM. Design and application of genetically encoded biosensors. *Trends Biotechnol.* 2011;23(1):144–52.
64. Shimomura O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein: Introduction. *J Microsc.* 2005;217(1):3–15.
65. Hecce HD, Deng W, Helma J, Leonhardt H, Cardoso MC. Visualization and targeted disruption of protein interactions in living cells. *Nat Commun.* 2013;4:1–8.
66. Morsut L, Roybal KT, Xiong X, Gordley RM, Coyle SM, Thomson M, Lim WA. Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. *Cell.* 2016;164(4):780–91.
67. Roybal KT, Williams JZ, Morsut L, Rupp LJ, Kolinko I, Choe JH, Walker WJ, McNally KA, Lim WA. Engineering T Cells with Customized Therapeutic Response Programs Using Synthetic Notch Receptors. *Cell.* 2016;167(2):419-432.e16.
68. Scheller J, Engelowski E, Moll JM, Floss DM. Immunoreceptor engineering and synthetic cytokine signaling for therapeutics. *Trends Immunol.* 2019;40(3):258–72.
69. Stripecke R, Del Carmen Villacres M, Skelton DC, Satake N, Halene S, Kohn DB. Immune response to green fluorescent protein: Implications for gene therapy. *Gene Ther.* 1999;6(7):1305–12.
70. Wu J, Greely HT, Jaenisch R, Nakauchi H, Rossant J, Belmonte JCI. Stem cells and interspecies chimaeras. *Nature.* 2016;540(7631):51–9.
71. Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Hemmann U, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Horn

- F, Heinrich PC, Graeve L. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130: I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem.* 1996;271(22):12991–8.
72. Kawahara M, Shimo Y, Sogo T, Hitomi A, Ueda H, Nagamune T. Antigen-mediated migration of murine pro-B Ba/F3 cells via an antibody/receptor chimera. *J Biotechnol.* 2008;133(1):154–61.
73. 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. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–13.
74. Schröder J, Moll JM, Baran P, Grötzinger J, Scheller J, Floss DM. Non-canonical interleukin 23 receptor complex assembly: P40 protein recruits interleukin 12 receptor β 1 via site II and induces P19/interleukin 23 receptor interaction via site III. *J Biol Chem.* 2015;290(1):359–70.
75. 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. *J Biol Chem.* 2016;291(20):10551–61.
76. Mossner S, Floss DM, Scheller J. Pro- and anti-apoptotic fate decisions induced by di- and trimeric synthetic cytokine receptors. *iScience.* 2021;24(5).
77. Suthaus J, Tillmann A, Lorenzen I, Bulanova E, Rose-John S, Scheller J. Forced homo- and heterodimerization of all gp130-type receptor complexes leads to constitutive ligand-independent signaling and cytokine-independent growth. *Mol Biol Cell.* 2010;21(15):2797–807.
78. Ketteler R, Glaser S, Sandra O, Martens UM KU. Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther.* 2002;9:477–87.
79. Beier S. Konzentrationsabhängige Effekte der Interleukin-23 Signaltransduktion in Ba / F3 Zellen. 2017. Masterarbeit am Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
80. Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff JPG, Kallen K josef, Wollmer A, Grotzinger J, Rose-john S. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Publ Gr.* 1997;15.

81. Horstmeier FC. Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion von IL-23 und eines möglichen Einflusses von SOCS3 und CIB2. 2022. Verfügbar unter: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=60262>.
82. Georgy J, Arlt Y, Moll JM, Ouzin M, Weitz HT, Gremer L, Willbold D, Grötzinger J, Thives-Kurenbach F, Scheller J, Floss DM. Tryptophan (W) at position 37 of murine IL-12/IL-23 p40 is mandatory for binding to IL-12R β 1 and subsequent signal transduction. *J Biol Chem*. 2021;297(5):101295.
83. Zou J, Presky DH, Wu CY, Gubler U. Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits β 1 and β 2 and JAK kinases. *J Biol Chem*. 1997;272(9):6073–7.
84. Schneider A. Konstruktion synthetischer Zytokinrezeptoren zur Vermittlung einer IL-23- artigen Signaltransduktion. 2020. Verfügbar unter: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=55331>.
85. Baldo BA. Side Effects of Cytokines Approved for Therapy. *Drug Saf*. 2014;37(11):921–43.
86. Moraga I, Spangler JB, Mendoza JL, Gakovic M, Wehrman TS, Krutzik P, Garcia KC. Synthekines are surrogate cytokine and growth factor agonists that compel signaling through non-natural receptor dimers. *Elife*. 2017;6:1–22.
87. Vazquez-Lombardi R, Roome B, Christ D. Molecular engineering of therapeutic cytokines. *Antibodies*. 2013;2(4):426–51.
88. Hutmacher C, Neri D. Antibody-cytokine fusion proteins: Biopharmaceuticals with immunomodulatory properties for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019;141:67–91.
89. Behzadi P, Behzadi E, Ranjbar R. Il-12 family cytokines: General characteristics, pathogenic microorganisms, receptors, and signalling pathways. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2016;63(1):1–25.
90. Warmuth M, Kim S, Gu XJ, Xia G, Adrián F. Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery. *Curr Opin Oncol*. 2007;19(1):55–60.
91. Gearing DP, Ziegler SF, Comeau MR, Friend D, Thoma B, Cosman D, Park L, Mosley B. Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(3):1119–23.
92. 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

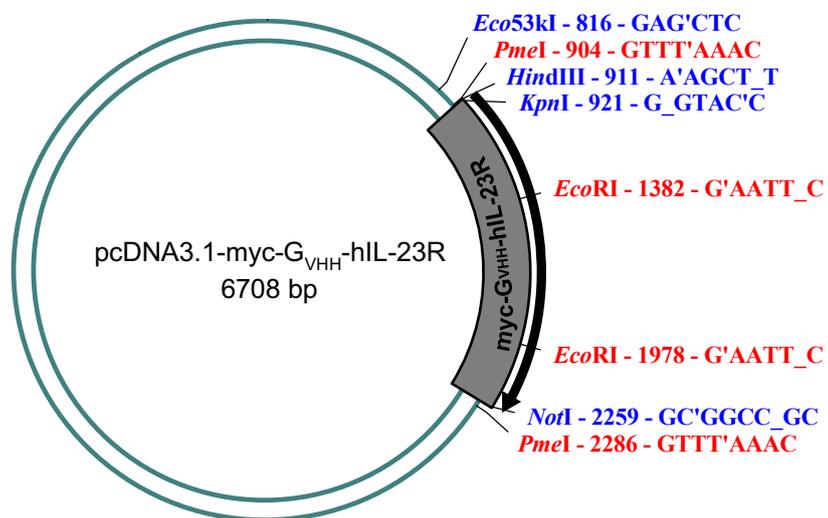
- SN. Structural activation of pro-inflammatory human cytokine IL-23 by cognate IL-23 receptor enables recruitment of the shared receptor IL-12R β 1. *Immunity*. 2018;48(1):45-58.e6.
93. Lay CS, Bridges A, Goulding J, Briddon SJ, Soloviev Z, Craggs PD, Hill SJ. Probing the binding of interleukin-23 to individual receptor components and the IL-23 heteromeric receptor complex in living cells using NanoBRET. *Cell Chem Biol*. 2021;1–11.
94. Scheller J, Berg A, Moll JM, Floss DM, Jungesblut C. Current status and relevance of single nucleotide polymorphisms in IL-6-/IL-12-type cytokine receptors. *Cytokine*. 2021;155550.
95. Hubbard SR. Mechanistic insights into regulation of JAK2 tyrosine kinase. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;8:1–7.
96. Wang X, Lupardus P, LaPorte SL, Garcia KC. Structural biology of shared cytokine receptors. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:29–60.
97. Meier S, Bohnacker S, Klose CJ, Lopez A, Choe CA, Schmid PWN, Bloemeke N, Rührnöbl F, Haslbeck M, Bieren JE von, Sattler M, Huang PS, Feige MJ. The molecular basis of chaperone-mediated interleukin 23 assembly control. *Nat Commun*. 2019;10(1):1–12.
98. 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. *Nat Immunol*. 2012;13(3):290–9.
99. Charles E. Egwuagu, Cheng-Rong Yu, Lin Sun and RW. Interleukin 35: Critical regulator of immunity and lymphocyte-mediated diseases. *Physiol Behav*. 2018;176(5):139–48.
100. Wang RX, Yu CR, Dambuza IM, Mahdi RM, Dolinska MB, Sergeev Y V., Wingfield PT, Kim SH, Egwuagu CE. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med*. 2014;20(6):633–41.
101. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DAA. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450(7169):566–9.
102. Aparicio-Siegmund S, Moll JM, Lokau J, Grusdat M, Schröder J, Plöhn S, Rose-John S, Grötzinger J, Lang PA, Scheller J, Garbers C. Recombinant p35 from bacteria can form interleukin (IL-)12, but not IL-35. *PLoS One*. 2014;9(9):1–13.

103. Zundler S, Neurath MF. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(5):559–68.
104. Collison LW, Vignali DAA. Interleukin-35: Odd one out or part of the family? *Immunol Rev.* 2008;226(1):248–62.
105. Gaignage M, Uyttenhove C, Jones LL, Bourdeaux C, Chéou P, Mandour MF, Coutelier J, Vignali DAA, Van Snick J. Novel antibodies that selectively block mouse IL-12 enable the re-evaluation of the role of IL-12 in immune protection and pathology. *Eur J Immunol.* 2021;1–12.
106. Mondal S, Kundu M, Jana M, Roy A, Rangasamy SB, Modi KK, Wallace J, Albalawi YA, Balabanov R, Pahan K. IL-12 p40 monomer is different from other IL-12 family members to selectively inhibit IL-12R β 1 internalization and suppress EAE. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(35):21557–67.
107. Lee SY, Jung YO, Kim DJ, Kang CM, Moon YM, Heo YJ, Oh HJ, Park SJ, Yang SH, Kwok SK, Ju JH, Park SH, Sung YC, Kim HY, Cho ML. IL-12p40 Homodimer ameliorates experimental autoimmune arthritis. *J Immunol.* 2015;195(7):3001–10.
108. 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 β 1. *J Immunol.* 2003;171(12):6866–74.
109. Slight, Samantha R.; Lin, Yinyao; Messmer, Michelle; Khader SA. Francisella tularensis LVS-induced Interleukin-12 p40 cytokine production mediates Dendritic cell migration through IL-12 Receptor β 1. *Cytokine.* 2011;55(3):372–9.
110. Unit H, Martino PS, Martino PS, Unit CP, Unit CP, Martino S, Unit CP, Policlinico O, Martino S, Emilia R, Unit MT, Hospital AV, Jerusalem E, Policlinico O, Martino S. MiR-146b-5p regulates il-23 receptor complex expression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood Adv - Am Soc Hematol.* 2022;

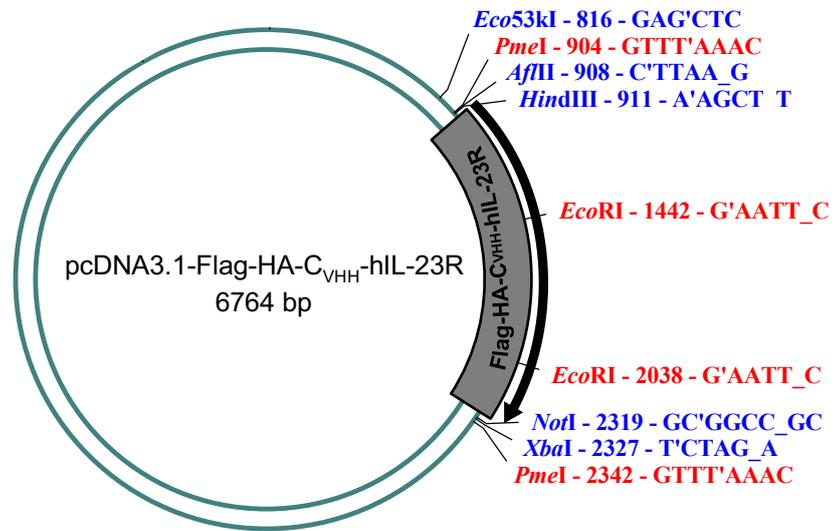
6 Anhang

6.1 Vektorkarten

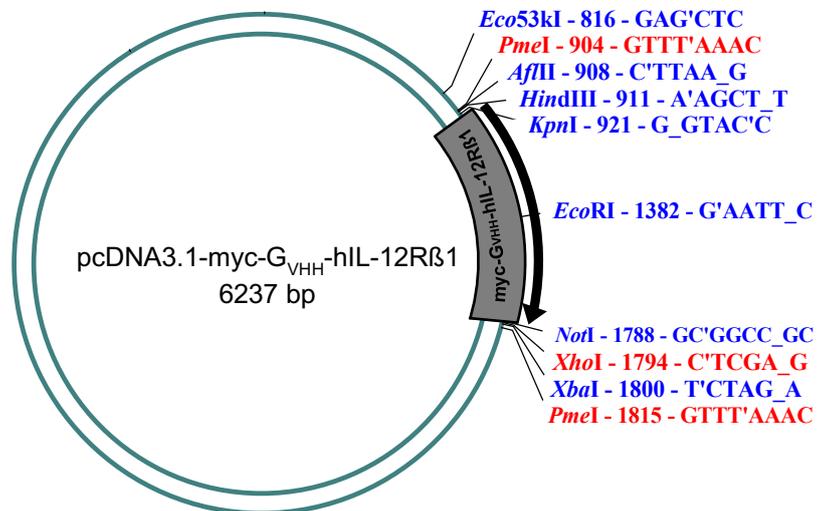
Die in dieser Arbeit verwendeten pcDNA3.1 Vektorkarten sind im Folgenden dargestellt. DNA-Abschnitte, die für die entsprechenden Rezeptoren codieren, sind grau und wichtige Restriktionsschnittstellen farblich markiert. Die Vektorengröße ist jeweils in bp angegeben.



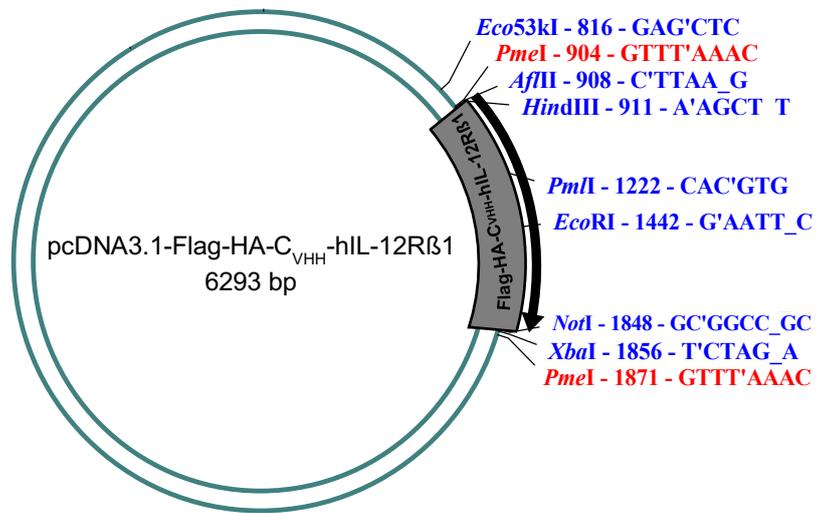
Ergänzende Abb. 1: Vektorkarte von pcDNA3.1-myc-G_{VHH}-hIL-23R (vgl. Abschnitt 3.2.1)



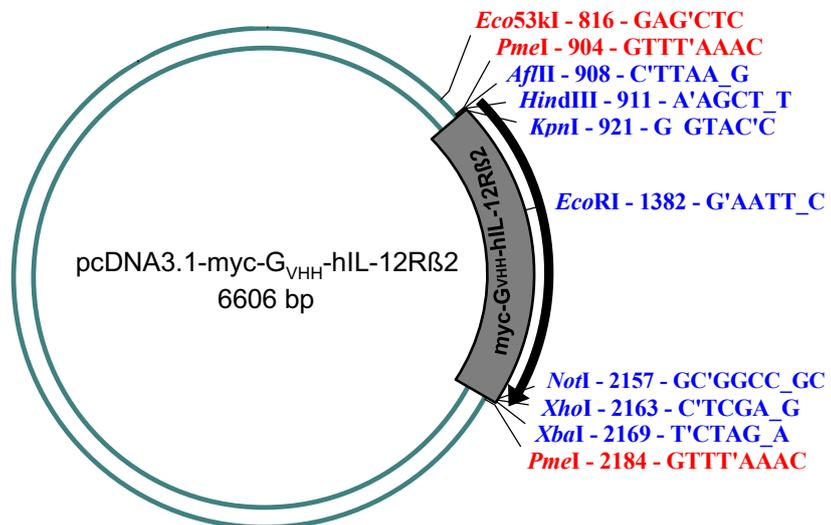
Ergänzende Abb. 2: Vektorkarte von pcDNA3.1-Flag-HA-C_{VHH}-hIL-23R (vgl. Abschnitt 3.2.1)



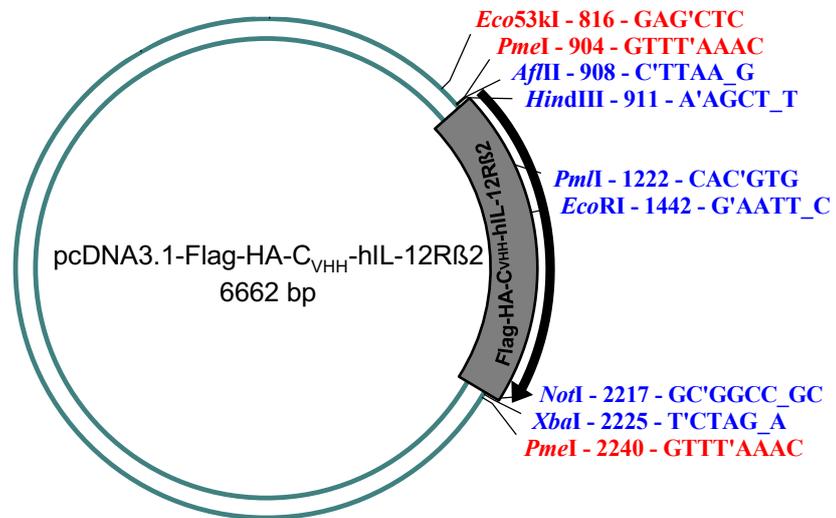
Ergänzende Abb. 3: Vektorkarte von pcDNA3.1-myc-G_{VHH}-hIL-12Rβ1 (vgl. Abschnitt 3.2.1)



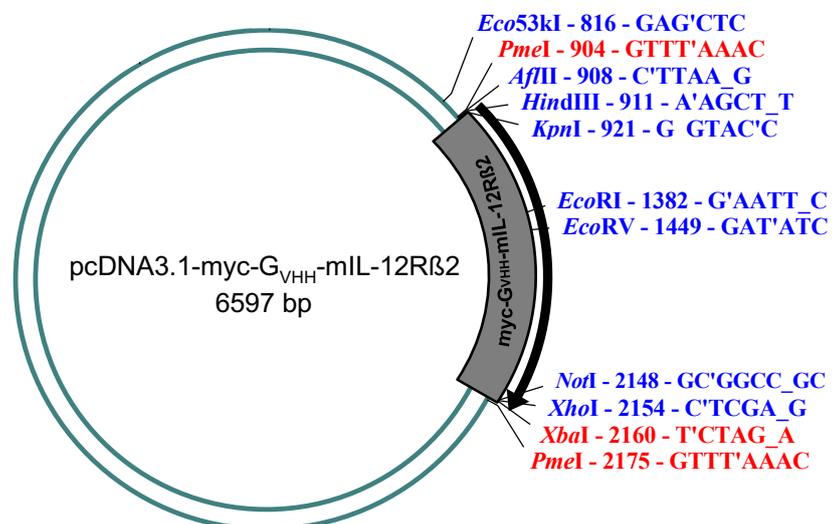
Ergänzende Abb. 4: Vektorkarte von pcDNA3.1-Flag-HA-C_{VHH}-hIL-12Rβ1 (vgl. Abschnitt 3.2.1)



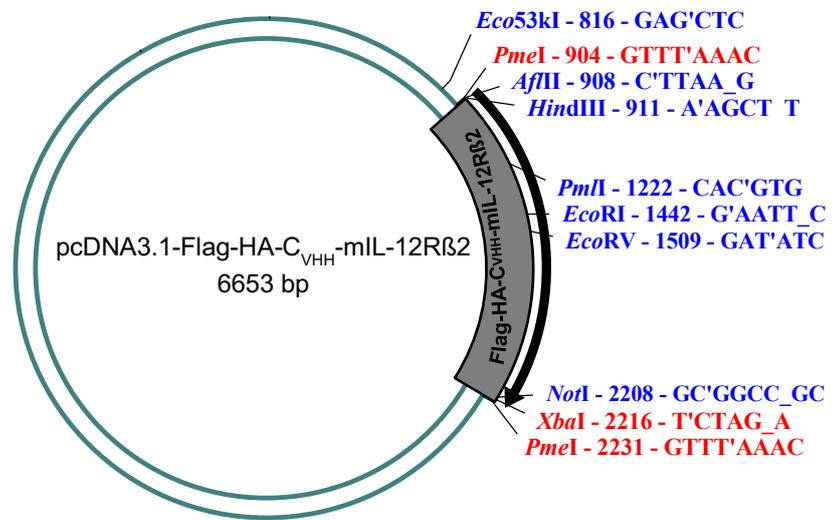
Ergänzende Abb. 5: Vektorkarte von pcDNA3.1-myc-G_{VHH}-hIL-12Rβ2 (vgl. Abschnitt 3.2.1)



Ergänzende Abb. 6: Vektorkarte von pcDNA3.1-Flag-HA-C_{VHH}-hIL-12Rβ2 (vgl. Abschnitt 3.2.1)



Ergänzende Abb. 7: Vektorkarte von pcDNA3.1-myc-G_{VHH}-mIL-12Rβ2 (vgl. Abschnitt 3.2.1)



Ergänzende Abb. 8: Vektorkarte von pcDNA3.1-Flag-HA-C_{VHH}-mIL-12Rβ2 (vgl. Abschnitt 3.2.1)

Danksagung

Ich möchte allen Personen, die mich auf dem Weg zur Vollendung dieser Dissertation begleitet haben, von ganzem Herzen danken.

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Scheller für die Möglichkeit dieses Einblicks in das wissenschaftliche Arbeiten danken. Vielen Dank für die stets direkte und menschliche Betreuung.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin PD Dr. Doreen M. Floss. Ihre unerschütterliche Fürsorglichkeit und Geduld sowie einzigartige Hingabe innerhalb der Betreuung legten den Grundstein zum Absolvieren dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei allen damaligen und aktuellen Mitarbeitern der AG Scheller, die mir stets wertvolle Ratschläge und Unterstützung boten, danken.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und dem stetigen Interesse an den Fortschritten meiner Arbeit danken. Insbesondere meine Mutter fand auch in persönlich schwierigen Zeiten stets die richtigen Worte und Ratschläge, um die Fertigstellung dieser Arbeit voranzutreiben.