

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

Funktionelle Charakterisierung der *site II* Interaktion
zwischen IL-12/IL-23p40 und IL-12R β 1

Dissertation

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

vorgelegt von
Jacqueline Georgy

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: PD Dr. rer. nat. Doreen M. Floss

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Stefanie Scheu

Drittgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Stefan Zielonka

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Georgy J, Arlt Y, Moll JM, Ouzin M, Weitz HT, Gremer L, Willbold D, Grötzinger J, Thives-Kurenbach F, Scheller J, and Floss DM (2021) 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. *Journal of Biological Chemistry* 297:101295.

Eine weitere Publikation, die thematisch nicht mit meiner Dissertation verknüpft ist:

Hampel N, Georgy J, Mehrabipour M, Lang A, Lehmkuhl I, Scheller J, Ahmadian MR, Floss DM, and Piekorz RP (2023) CoCl₂-triggered pseudohypoxic stress induces proteasomal degradation of SIRT4 via polyubiquitination of lysines K78 and K299. *FEBS Open Bio* 12:2187-2199.

Zusammenfassung

Interleukin (IL)-12 und IL-23 sind proinflammatorische Zytokine der IL-12 Familie und sind strukturell ähnlich aufgebaut. Allerdings haben sie unterschiedliche Funktionen im Immunsystem. Währenddessen IL-12 an der Differenzierung von T_H1-Zellen und an der Abwehr von Tumorzellen beteiligt ist, spielt IL-23 bei der Regulierung der T_H17-Antwort und bei der Pathogenese verschiedener Autoimmunkrankheiten eine entscheidende Rolle.

IL-12 (p35/p40) und IL-23 (p19/p40) bestehen beide aus der gemeinsamen β -Untereinheit p40 und einer zytokinspezifischen α -Untereinheit, p35 oder p19. Die Signaltransduktion erfolgt über den gemeinsamen IL-12 Rezeptor β 1 (IL-12R β 1) und den zytokinspezifischen IL-12 Rezeptor β 2 (IL-12R β 2) oder IL-23 Rezeptor (IL-23R). Die Signaltransduktion von IL-12 und IL-23 führt u.a. zur Aktivierung des JAK-STAT-Weges und MAPK-Weges. In Abwesenheit von der α -Untereinheit kann p40 Homodimere bilden, die p80 genannt werden.

Der Aufbau des IL-12 und IL-23 Zytokinrezeptorkomplex folgt dem *site I-II-III* Paradigma mit einer nicht-kanonischen *site II*. Im IL-23 Zytokinrezeptorkomplex bindet p19 über *site I* an p40. Die Interaktion von p19 mit dem IL-23R erfolgt über *site III*. An *site II* ist p19 nicht beteiligt. Stattdessen interagiert p40 mit IL-12R β 1. Für *site I* und *site III* konnten bereits kritische Aminosäuren identifiziert werden. Des Weiteren konnten durch Mutation einzelner kritischer Aminosäuren von *site I* und *site III* inaktive IL-12 und IL-23 Varianten generiert werden.

Es konnten bereits kritische Aminosäuren in p40 für die *site II* Interaktion identifiziert werden: H216, K217, K219, W37 und F82. Um eine inaktive IL-23 Variante zu generieren, wurde zunächst die N-terminale Domäne von Hyper-IL-23, einem Fusionsprotein aus p19 und p40, näher analysiert. Nach der Stimulation von Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen mit konditionierten Zellkulturüberständen der p40-Deletionsvariante Δ M23-P39 im HIL-23 Fusionsprotein zeigte sich keine Proliferation der Zellen und keine Aktivierung der intrazellulären Signalwege. Des Weiteren kann Δ M23-P39 im HIL-23 Fusionsprotein nicht den IL-12R β 1 binden. Daher sollten durch Generierung verschiedener Mutationen die N-terminalen Aminosäuren von p40 analysiert werden. Durch Punktmutation von Tryptophan 37 zu Lysin (W37K) in p40 konnte die Proliferation von Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen und die Aktivierung der intrazellulären Signalwege signifikant reduziert werden. Auch konnte p40 W37K nicht an IL-12R β 1 binden. Durch Kombination der Punktmutationen W37K in p40 mit den benachbarten Aminosäuren D36K und T38K in p40 von HIL-23 und HIL-12 wurden inaktive IL-23 und IL-12 Varianten generiert, die weder die zelluläre Proliferation noch die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen induzieren konnten. Auch wurde keine Interaktion mit dem IL-12R β 1 nachgewiesen. P40 Homodimere, p80, binden mit hoher Affinität an IL-12R β 1, allerdings konnte bisher keine funktionelle Aktivität des IL-12R β 1 Homodimer gezeigt werden. P80 kann unter bestimmten Bedingungen die Signaltransduktion von IL-12 und IL-23 inhibieren. Nach Einbringung der Mutationen D36K/W37K/T38K in p80 zeigte sich keine Inhibition der Signaltransduktion von IL-12 und IL-23.

Zusammenfassend wurde W37 in p40 als kritische Aminosäure der *site II* zwischen p40 und dem IL-12R β 1 bestätigt und die Mutationen p40 D36K/W37K/T38K führte in IL-12, IL-23 und p80 zu einer inaktiven Variante. Genaue Kenntnisse über den Aufbau des IL-12 und IL-23 Zytokinrezeptorkomplexes und für die Interaktion wichtige Aminosäuren können neue Ansatzpunkte in der Therapie von Krebs und Autoimmunkrankheiten darstellen.

Summary

IL-12 and IL-23 are proinflammatory cytokines and members of the IL-12 family. They have a similar structure but different functions in the immune system. IL-12 is involved in the differentiation of T_H1-cells and in defense of tumor cells. IL-23 is important for T_H17-cell differentiation and plays an important role in the pathogenesis of autoimmune diseases.

IL-12 (p35/p40) and IL-23 (p19/p40) consist of the common β -subunit p40 and the specific α -subunit p35 or p19. IL-12 and IL-23 signal via the common IL-12 receptor β 1 (IL-12R β 1) and the specific IL-12 receptor β 2 (IL-12R β 2) or IL-23 receptor (IL-23R). For example, they activate the JAK-STAT pathway and the MAPK pathway. In absence of p19 and p35, p40 can form homodimers, which are called p80.

Structure of IL-12 and IL-23 cytokine receptor complex follows the site I-II-III paradigm with a non-canonical site II interaction. In the IL-23 cytokine receptor complex p19 binds to p40 via site I and p19 binds to IL-23R via site III. The α -subunit p19 is not part of site II interaction. Instead, p40 binds to IL-12R β 1 via site II. Critical amino acids have been identified for site I and III interaction. Point mutations of critical site I and site III amino acids led to inactive IL-12 and IL-23 variants.

In p40 critical amino acids for site II interaction have been identified: H216, K217, K219, W37 and F82. To generate an inactive site II variant, the N-terminal region of Hyper IL-23, a fusion protein combining p40 and p19, has been analysed. Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R cells did not proliferate and intracellular pathways were not activated after stimulation with p40 deletion variant Δ M23-P39 in fusion protein HIL-23. In co-immunoprecipitation studies Δ M23-P39 in HIL-23 does not interact with IL-12R β 1. Hence, amino acids of the N-terminal domain in p40 should be analysed through generation of point mutants in p40. Proliferation of Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R cells and activation of signaling pathway was significantly reduced after stimulation with cell culture supernatant of W37 mutated p40. In co-immunoprecipitation studies HIL-23 W37 does not interact with IL-12R β 1. Combination of W37K in p40 with point mutations of surrounding amino acids D36K and T38K in p40 leads to an inactive IL-12 and IL-23 variant, which could not induce proliferation and activation of signaling pathways and does not interact with IL-12R β 1. P40 homodimers, p80, bind with high affinity to IL-12R β 1. In functional analysis, IL-12R β 1 homodimers are not biologically active. Under specific conditions p80 inhibits signal transduction of IL-12 and IL-23. p80 D36K/W37K/T38K could not inhibit signal transduction of IL-12 and IL-23.

Summarizing, p40W37 was confirmed as a critical amino acid for site II interaction with IL-12R β 1. Interestingly, HIL-23 D36K/W37K/T38K, HIL-12 D36K/W37K/T38K and p80 D36K/W37K/T38K were identified as inactive IL-23, IL-12 and p80 variants. Precise knowledge of the structure of IL-23 and IL-12 cytokine receptor complex is important to develop therapeutic strategies against autoimmune diseases and cancer.

Abkürzungsverzeichnis

Δ	Deletion
AK	Antikörper
AG	Arbeitsgruppe
BLI	<i>bio-layer interferometry</i>
Blimp-1	<i>B-lymphocyte induced maturation protein-1</i>
bzw	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CHO-Zellen	<i>chinese hamster ovary cells</i>
CHR	<i>cytokine-binding homology region</i>
D	Domäne
DC	dendritic cell
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBI3	<i>epstein-barr virus-induced gene 3</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EU	Europäische Union
Fab	<i>antigen-binding fragment</i>
GATA-3	<i>GATA-binding-protein 3</i>
GH	growth hormon
gp	<i>glycoprotein</i>
h	human
HEK293T	<i>human embryonic kidney cell line, SV40-transformiert</i>
HIL-23	Hyper-IL-23
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN-γ	Interferon-γ
JAK	Januskinase
m	murin
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Nb	<i>nanobody</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NO	Stickstoffmonoxid
p	Protein
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB/AKT	Proteinkinase B
R	Rezeptor
r	rekombinant
RORγt	<i>retinoic acid receptor-related orphan receptor-γt</i>
s.	siehe
Satb1	<i>special AT-rich sequence-binding protein-1</i>
SH2	<i>Src homology domain 2</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
T-bet	<i>T-box expressed in T-cells</i>
T_H-Zelle	T-Helferzelle
TYK	Tyrosinkinase der Janus-Familie
UE	Untereinheit
u.a	unter anderem
USA	<i>United States of America</i>
WSX-1	<i>WSXWS type I cytokine receptor</i>

Aminosäuren werden nach dem Einbuchstabencode abgekürzt. Englische Fachbegriffe werden nicht übersetzt und kursiv geschrieben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zytokine und ihre Rolle im Immunsystem	1
1.2	Überblick über die IL-12 Familie	1
1.3	Aufbau des Zytokinrezeptorkomplexes - Das <i>site I-II-III</i> Paradigma	3
1.4	Signaltransduktion von IL-12 und IL-23	8
1.5	Die Rolle von IL-12 und IL-23 im Immunsystem	9
1.5.1	IL-12 und IL-23 in aktuellen Therapiestrategien	11
1.6	Das p40 Homodimer: Agonist oder Antagonist von IL-12/IL-23?	12
1.7	Ziele der Doktorarbeit	13
2	Publikation	15
2.1	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, Georgy J, Arlt Y, Moll JM, Ouzin M, Weitz HT, Gremer L, Willbold D, Grötzinger J, Thives-Kurenbach F, Scheller J, and Floss DM. <i>Journal of Biological Chemistry</i> , 297:101295, (2021)	15
3	Diskussion	16
3.1	Die N-terminale Domäne von p40 ist wichtig für <i>site II</i>	16
3.2	Tryptophan (W) 37 in p40 ist wichtig für die <i>site II</i> Interaktion	17
3.3	p40 D36K/W37K/T38K führt zu einer inaktiven murinen HIL-23 Variante	19
3.4	p40 D36K/W37K/T38K führt zu einer funktionellen Inaktivierung von HIL-12	21
3.5	p40 D36/W37/T38 ist für die Bindung von p80 an IL-12R β 1 wichtig	22
3.6	Struktureller Vergleich der <i>site II</i> innerhalb der IL-6/IL-12 Familie	22
3.7	Klinische Relevanz der charakterisierten <i>site II</i> von p40	26
4	Literaturverzeichnis	27
5	Abbildungsverzeichnis	33
6	Tabellenverzeichnis	34
7	Anhang	35
7.1	Alignments	35
7.2	Nutzungsrechte der Publikation	44
8	Danksagung	45

1 Einleitung

1.1 Zytokine und ihre Rolle im Immunsystem

Das menschliche Immunsystem wird durch vielfältige Zellkommunikation mittels Zell-Zell-Interaktionen und löslichen Botenstoffen, den Zytokinen aufrechterhalten [1]. Zytokine werden von Immunzellen meist autokrin oder parakrin sezerniert [2]. Sie sind an der Immunantwort gegen Antigene und an der Regulation der Immunreaktion beteiligt [3]. Die Klassifikation der Zytokine kann anhand von Struktur, Funktion oder den jeweiligen Rezeptoren erfolgen [2]. Anhand der Klassifikation nach ihren Rezeptoren werden sieben Zytokinfamilien unterschieden: Rezeptortyrosinkinase, Klasse I/II Zytokinrezeptoren, Tumornekrosefaktor-Rezeptorfamilie, IL-1/Toll-like-Rezeptorfamilie, IL-17 Rezeptorfamilie, Serin/Threonin-Kinasen und die Chemokine [4]. Die größte Familie ist die Familie der Klasse I Zytokinrezeptoren, die auch Hämatopoietinfamilie genannt wird [2, 4]. Zu dieser Familie zählt auch die Interleukin (IL)-12 Familie [4].

1.2 Überblick über die IL-12 Familie

Kennzeichnend für die IL-12 Familie ist, dass die Zytokine und ihre Rezeptoren Heterodimere sind [2]. Die Untereinheiten werden von mehreren Zytokinen und Rezeptoren genutzt [2]. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten zu der IL-6 Familie, wird die IL-12 Familie häufig mit der IL-6 Familie zusammengefasst und als IL-6/IL-12 Familie bezeichnet [5].

Tabelle 1: Die Mitglieder der IL-12 Familie.

		α -Untereinheit		
		p35	p19	p28
β -Untereinheit	p40	IL-12	IL-23	IL-Y
	EBI3	IL-35	IL-39	IL-27

Durch Kombination der α -Untereinheiten mit den β -Untereinheiten ergeben sich theoretisch sechs Mitglieder der IL-12 Familie. Modifiziert nach Floss *et al.* [6].

Die murine IL-12 Familie besteht aktuell aus fünf Mitgliedern: IL-12 [7-11], IL-23 [12], IL-27 [13], IL-35 [14, 15] und IL-39 [16-18]. Die Zytokine setzen sich aus einer α - (p19, p28, p35) und einer β -Untereinheit (p40 und Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3)) zusammen (s. Abb. 1, Tabelle 1) [2]. Das theoretische Zytokin IL-Y wurde bis jetzt weder *in vivo* noch *in vitro* nachgewiesen und besteht aus der α -Untereinheit p28 und der β -Untereinheit p40 [19, 20]. Ebenso wird die Existenz von IL-39 diskutiert, welches zunächst nur in B-Zellen von Mäusen nachgewiesen wurde [18, 21]. Murines IL-39 ist in der Pathogenese von murinem Systemischen Lupus Erythematodes beteiligt [22]. IL-39 konnte nun auch im humanen Serum zum Beispiel im Rahmen eines Myokardinfarktes oder bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen werden [23].

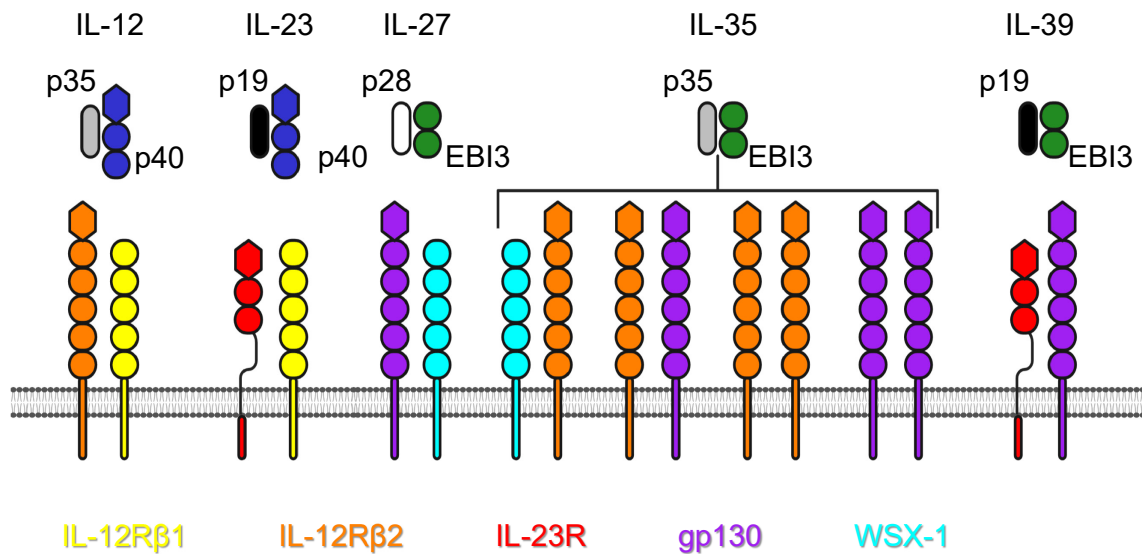


Abb. 1: Übersicht über die Zytokine der IL-12 Familie und deren Rezeptoren. IL-12 setzt sich aus den Untereinheiten p35 und p40 zusammen und bindet an die Rezeptoren IL-12Rβ1 und IL-12Rβ2 [11, 24]. IL-23 besteht aus den Untereinheiten p19 und p40 und interagiert mit den Rezeptoren IL-12Rβ1 und IL-23R [12, 25]. IL-27 besteht aus den Untereinheiten p28 und EBI3 und bindet an die Rezeptoren gp130 und WSX-1 [13, 26]. Durch die Interaktion der Untereinheiten p35 und EBI3 entsteht das Zytokin IL-35 [15]. Es konnten vier mögliche Rezeptorkomplexe identifiziert werden: WSX-1/IL-12Rβ2, gp130/IL-12Rβ2, IL-12Rβ2/IL-12Rβ2 und gp130/gp130 [27]. IL-39 besteht aus den Untereinheiten p19 und EBI3 und bindet an die Rezeptoren gp130 und IL-23R [20]. Ig-ähnliche Domänen als Kreise dargestellt. Modifiziert nach Floss *et al.* [6]. Die Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com erstellt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Zytokine IL-12 sowie IL-23 genauer analysiert. Die Struktur der zytokinspezifischen α -Untereinheiten p19 und p35 stellt ein α -helikales Vier-Helix-Bündel mit einer *up-up-down-down* Topologie dar [3]. Die Bündel stehen über Schleifen miteinander in Verbindung [28]. Beide Proteine weisen eine zu 15% übereinstimmende homologe Aminosäuresequenz auf [2, 28].

Die gemeinsame β -Untereinheit von IL-12 und IL-23 ist p40, welche β -Faltblattstrukturen aufweist. P40 zeigt eine strukturelle Ähnlichkeit mit den extrazellulären Domänen der Klasse I/II Zytokinrezeptoren [21]. Die Domäne D1 von p40 ist eine Immunglobulin-ähnliche (Ig-ähnliche) Domäne, D2 und D3 sind Fibronectin Typ III Domänen und bilden die *cytokine-binding homology region* (CHR) zur Bindung an p19 oder p35 [3, 29]. Innerhalb der Domäne D2 befinden sich konservierte Cysteinreste, welche für die Ausbildung von Disulfidbrücken verantwortlich sind [3]. Die Domäne D3 enthält das konservierte WSXWS Motiv (Tyr-Ser-X-Try-Ser), welches u.a. die Tertiärstruktur stabilisiert [3]. Das X entspricht einer variablen Aminosäure [3]. Die konservierten Cysteinreste und das WSXWS Motiv sind typische Merkmale für Klasse I Zytokinrezeptoren [4]. Die jeweiligen α und β -Untereinheiten von IL-12 und IL-23 werden durch Disulfidbrücken verbunden [3, 19, 28]. Die Disulfidbrücken werden zwischen humanem p40 C199 und p35 C96 oder p19 C73 ausgebildet [2].

Folgende Rezeptoren werden von Zytokinen der IL-12 Familie genutzt: IL-12Rβ1, IL-12Rβ2, IL-23R, WSX-1 sowie gp130 [30]. Der Rezeptorkomplex von IL-12 und IL-23 besteht aus dem

IL-12R β 1 und jeweils einem zytokinspezifischen Rezeptor: dem IL-12R β 2 und dem IL-23R [12, 24, 25, 31]. Die Rezeptoren sind Typ I Rezeptoren mit einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus [32]. Extrazellulär besitzen die Rezeptoren eine *cytokine-binding homology region* (CHR), die aus zwei Fibronectin Typ III Domänen besteht [4]. Der IL-12R β 1 besteht ebenfalls wie Glykoprotein (gp) 130 und der IL-12R β 2 aus fünf Fibronectin Typ II und III Domänen, allerdings hat der IL-12R β 1 keine Ig-ähnliche Domäne [31, 33]. Der IL-23R besitzt statt drei Fibronectin Typ III Domänen eine unstrukturierte *stalk* Region (s. Abb. 1) [25, 33].

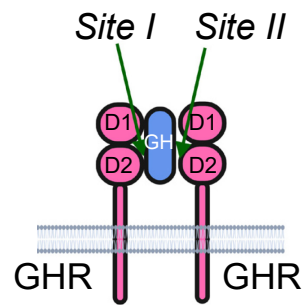
1.3 Aufbau des Zytokinrezeptorkomplexes - Das *site I-II-III* Paradigma

Die Zytokinuntereinheiten binden an die jeweiligen Rezeptoren und bilden somit einen Zytokinrezeptorkomplex [32]. Dabei binden die Seiten der Zytokinhelices an die Fibronectin-III-Domänen der jeweiligen Rezeptoren [32]. Die Bindungsstellen werden *sites* genannt [32]. Bei Zytokinen der IL-12 Familie folgt diese Bindung dabei dem *site I-II-III* Paradigma [34].

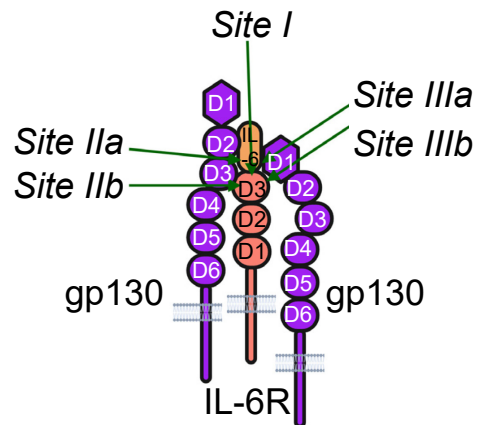
Das *site I-II* Paradigma wurde zuerst bei dem *growth hormon* Rezeptorkomplex beschrieben [32]. Dabei bindet das *growth hormon* über *site I* an einen *growth hormon* Rezeptor und über *site II* an den anderen *growth hormon* Rezeptor. Die Bindungsstellen der *site I* und *II* sind unterschiedlich (s. Abb. 2A) [32, 35].

Dieses Paradigma lässt sich auf die IL-6 Familie übertragen [28]. Die IL-6 Familie besteht aus folgenden Mitgliedern: IL-6, IL-11, IL-27, IL-31, *oncostatin M* (OSM), *cardiotrophin-1* (CT-1), *cardiotrophin-like cytokine factor 1* (CLCF1), *ciliary neutrophilic factor* (CNTF) und dem *leukemia-inhibitor factor* (LIF) [36]. In Tabelle A1 ist eine Übersicht über einige Zytokine der IL-6 Familie und deren Rezeptoren dargestellt (s. Tabelle A1). Es konnte für IL-6 und die weiteren Mitglieder der IL-6 Familie IL-11, CNTF, CLCF1, OSM und IL-27 mittels Cryo-Elektronenmikroskopie der Aufbau des Zytokinrezeptorkomplexes gezeigt werden [36, 37]. Kennzeichnend für die IL-6 Familie ist die zusätzliche *site III* [38]. Dabei interagiert die Spitze des helikalen Zytokins mit der Ig-ähnlichen Domäne eines Rezeptors und bildet so einen Zytokinrezeptorkomplex entsprechend dem *site I-II-III* Paradigma [38]. Grundsätzlich zeigte sich für das *site I-II-III* Paradigma, dass das Zytokin über *site I* an seinen nicht-signaltransduzierenden α -Rezeptor (IL-6R α , IL-11R α , EBI3 und CNTFR α) bindet, um anschließend die jeweiligen signaltransduzierenden β -Rezeptoren (gp130, LIFR, WSX-1 und OSMR) binden zu können (*site II*, *site III*) [36, 37]. In dem Zytokinrezeptorkomplex von IL-6, IL-11 und IL-27 ist die *site II* und *III* zweiteilig aufgebaut (*site II/IIa* und *III/IIIb*) [36-38]. Besonderheiten im Aufbau des Zytokinrezeptorkomplexes zeigen sich bei CNTF und CLCF1 durch eine fehlende *site IIIb* und bei α -Rezeptor-unabhängigen Zytokine der IL-6 Familie (CT-1, LIF, OSM und IL-31) durch eine fehlende *site I* [36, 37].

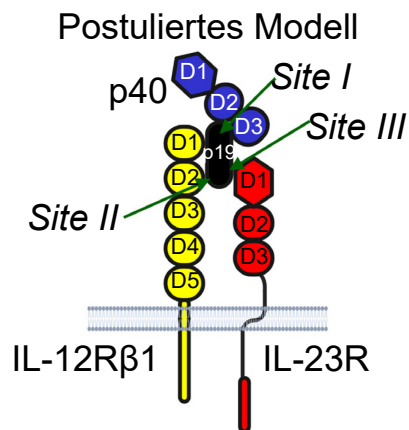
A



B



C



D

Experimentell validiertes Modell

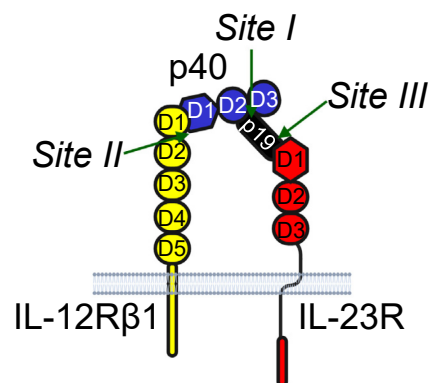


Abb. 2: Überblick über die Entwicklung des *site I-II-III* Paradigmas. **A:** Das *site I-II* Paradigma wurde zunächst für das *growth hormon* als Mitglied der Hämatopoetinfamilie beschrieben. Dabei interagiert das *growth hormon* über *site I* und *II* mit zwei *growth hormon* Rezeptoren [32, 35]. Modifiziert nach Grötzinger [32]. **B:** Dieses Paradigma konnte auf IL-6 übertragen werden. IL-6 nimmt im Zytokinrezeptorkomplex eine zentrale Rolle ein und interagiert über *site I* mit IL-6R, über *site II* mit gp130 und über *site III* mit dem zweiten gp130 Rezeptor [38, 39]. Modifiziert nach Scheller *et al.* [40] **C:** Es wurde postuliert, dass sich dieses Paradigma ebenfalls auf IL-12/IL-23 übertragen lässt. Dabei übernimmt p19 die zentrale Rolle im Zytokinrezeptorkomplex und interagiert über *site I* mit p40, über *site II* mit IL-12R β 1 und über *site III* mit IL-23R [28]. Modifiziert nach Scheller *et al.* [40]. **D:** Experimentell konnte bestätigt werden, dass *site I* zwischen p19 und p40 und die *site III* zwischen p19 und IL-23R ausgebildet wird. Des Weiteren konnte eine *site II* identifiziert werden. Hierbei interagiert p40 mit IL-12R β 1 und p19 ist an dieser Interaktion nicht beteiligt [34]. Modifiziert nach Scheller *et al.* [40] Darstellung der Zytokine und Rezeptoren modifiziert nach Langrish *et al.* [41]. Die Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com erstellt.

In Abb. 2 ist beispielhaft der Zytokinrezeptorkomplex von IL-6 dargestellt (s. Abb. 2B). Zunächst bindet IL-6 über *site I* an IL-6R α . Anschließend interagiert Helix A und C von IL-6 mit gp130 (*site IIa*) [37]. Diese Interaktion wird durch die *site IIb* Interaktion von IL-6R α mit gp130 stabilisiert [37]. Helix D von IL-6 bindet anschließend über *site IIIa* an den zweiten gp130 Rezeptor [37]. Auch diese Interaktion wird durch eine *site IIIb* Interaktion zwischen der Domäne 2 von IL-6R α und der Spitze von gp130 stabilisiert [37].

2008 postulierten Lupardus und Garcia, dass sich das *site I-II-III* Paradigma von dem Zytokinrezeptorkomplex der IL-6 Familie auf die IL-12 Familie aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit übertragen lässt [28]. Demnach wurde hier die Hypothese aufgestellt, dass p19 als Zytokin zunächst über *site I* an p40, den α -Rezeptor, bindet [28]. Die Helix A und B von p19 interagieren anschließend mit der *site II* von IL-12R β 1, sodass die Helix D von p19 für die *site III* Interaktion an IL-23R bindet (s. Abb. 2C) [28]. 2015 konnten Schröder *et al.* für IL-23 zeigen, dass zwar über die *site I* p40 und p19 miteinander interagieren und die *site III* für die Bindung zwischen p19 und IL-23R verantwortlich ist, jedoch p19 nicht an der *site II* des IL-23 Zytokinrezeptorkomplexes beteiligt ist [34]. Stattdessen wird die *site II* Interaktion zwischen D1D2p40 und IL-12R β 1 ausgebildet [34]. Dieses experimentell validierte Paradigma lässt sich auf den Zytokinrezeptorkomplex von IL-12 übertragen (s. Abb. 2D) [34, 42].

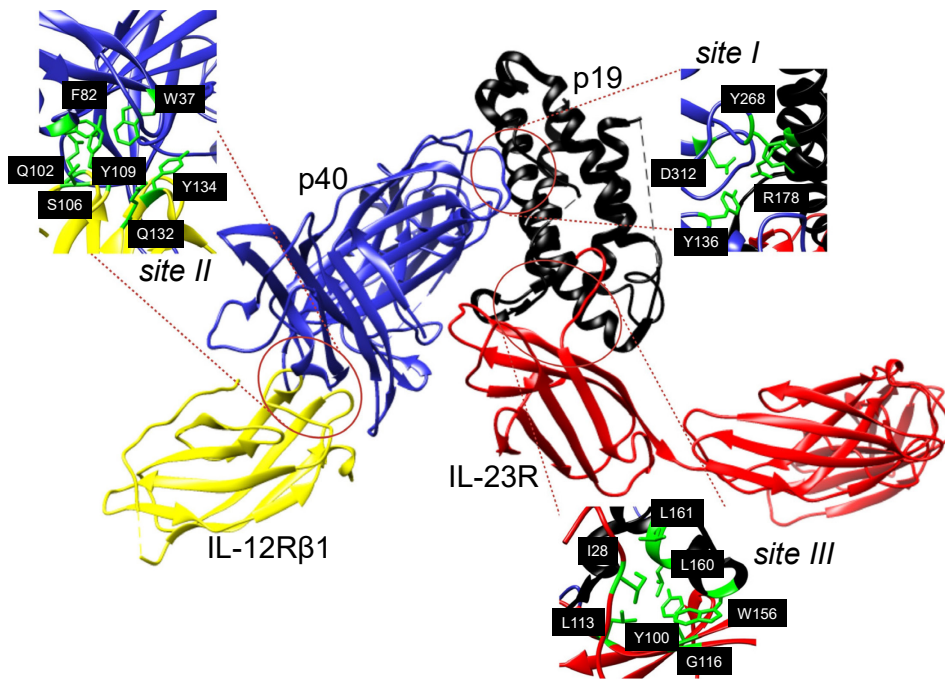


Abb. 3: Strukturmodell des humanen IL-23 Zytokinrezeptorkomplexes. Darstellung des humanen IL-23 Zytokinrezeptorkomplexes auf Grundlage von PDB 6WDQ (<https://www.rcsb.org/>). P19 ist schwarz, p40 blau, IL-12Rβ1 gelb und IL-23R rot gefärbt. Die kritischen Aminosäuren des *site I-II-III* Paradigmas sind ebenfalls abgebildet. **Site I:** Kritisch für *site I* ist die Guanidinogruppe von Arginin (R) 178 in p19. Diese bildet eine Salzbrücke zu D312 in p40 und Wasserstoffbrückenbindungen zu Y136, D312 und Y268 von p40 aus [28, 29]. **Site II:** Es interagieren p40 W37 und F82 mit IL-12Rβ1 Q102, S106, Y109, Q132, Y134 [42]. **Site III:** Die kritischen Aminosäuren in IL-23R G116, Y100, L113 und I28 binden an p19 W156, L160 und L161 [43]. Abbildung modifiziert nach Glassman *et al.* [42]. Die Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com und UCSF Chimera erstellt.

Bei dem humanen IL-23 Zytokinrezeptorkomplex interagieren die Schleifen 1 und 3 von Domäne 2 und die Schleifen 5 und 6 von Domäne 3 von p40 mit den Helices A und D, sowie einem Teil der AB-Schleife von p19 und bilden so die *site I* [28]. Die an *site I* beteiligten Aminosäuren in p40 bilden eine Bindungstasche, an dessen Basis die kritische Aminosäure D312 liegt [28]. In diese Bindungstasche ragt Helix D von p19 [28]. Kritisch für *site I* in p19 ist die Guanidinogruppe von Arginin (R) 178 [28]. Diese bildet eine Salzbrücke zu D312 in p40 sowie Wasserstoffbrückenbindungen zu Y136, D312 und Y268 in p40 aus (s. Abb. 3 *site I*) [28]. In der Bindungstasche von p40 befinden sich außerdem die aromatischen Aminosäuren Y134 und Y315, die durch Van-der-Waals-Kräfte mit den Helices A und D von p19 interagieren [28]. Des Weiteren wird *site I* in der Peripherie der Interaktionsfläche durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen p19 und p40 stabilisiert [28]. Die kritischen Aminosäuren sind im murinen IL-23 Zytokinrezeptorkomplex konserviert (s. Abb. A1, Abb. A3). Durch Generierung von Punktmutationen der Aminosäuren I176, A178, R179 in murinen p19 und Y265, Y318 in murinen p40 konnten inaktive IL-23 Varianten generiert werden [34].

Die *site I* Interaktion im IL-12 Zytokinrezeptorkomplex basiert auf dem oben beschriebenen Prinzip [44]. P19 ist im Vergleich zu p35 räumlich näher zu Domäne 2 von p40 gedreht [28]. Dies führt dazu, dass im Vergleich zum IL-23 Zytokinrezeptorkomplex die Wahrscheinlichkeit der Interaktionen zwischen p40 und der AB-Schleife von p35 geringer ist [28]. P40 verwendet

zur Interaktion mit p35 dieselbe Bindungstasche wie mit p19 [28]. In die Bindungstasche ragt die Guanidinogruppe der konservierten Aminosäure Arginin: hp35 R211 oder mp35 R207 hinein (s. Abb. A2) [28, 29]. Durch Mutagenesestudien konnte die funktionelle Relevanz der kritischen Aminosäuren in p40 für die *site I* Interaktion mit p35 entschlüsselt werden: Y136, Y268, Y314 und Y315 [29].

IL-12R β 1 bindet mit der CHR an die Rückseite von Domäne 1 und 2 von p40 und bildet so *site II* [42]. Die *site II* Interaktion basiert auf der Bindung der positiv geladenen Aminosäuren H216, K217 und K219 in p40 an die negativ geladenen Aminosäuren E28, D58 und D101 in IL-12R β 1 [42]. Des Weiteren bilden die aromatischen Aminosäuren W37 und F82 in p40 ein hydrophobes Areal, das von den polaren Aminosäuren Q102, S106, Y109, Q132, Y134 in IL-12R β 1 umgeben ist [42]. Auf diese Weise werden zwischen der Untereinheit p40 und dem IL-12R β 1 Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet (s. Abb. 3 *site II*) [42]. Durch eine Analyse des Strukturmodells des IL-23 Zytokinrezeptorkomplexes wurde eine weitere Interaktion postuliert. Diese befindet sich zwischen der Aminosäure E108 von p40 und der Aminosäure R54 von IL-12R β 1 [40]. Schröder *et al.* konnten durch Kombination der Punktmutationen der Aminosäuren V116E/L117E/S118E und V116E/L117E/S118E/Y143E in murinem IL-12R β 1 die Interaktion von IL-12R β 1 mit p40 inhibieren [34]. Diese Aminosäuren entsprechen in humanem IL-12R β 1 den kritischen Aminosäuren V107, L108, Y109 und Y134 (s. Abb. A4) [42].

Die *site III* wird durch Interaktion von der AB-Schleife und den Helices B und D von p19 mit der N-terminalen Ig-Domäne von IL-23R gebildet [43, 45]. Im Zentrum von *site III* des humanen IL-23 Zytokinrezeptorkomplexes steht der Indolring von Tryptophan W156 in p19 [46]. Eine weitere kritische Aminosäure im humanen p19 ist L160 [46]. Die hydrophoben Aminosäuren W156, L160 und L161 von p19 interagieren mit den kritischen Aminosäuren von IL-23R G116, Y100, L113 sowie I28 (s. Abb. 3 *site III*) [43]. Eine weitere hydrophobe Wechselwirkung wird zwischen p19 L56 und IL-23R T102 ausgebildet [40]. Im murinen IL-23 Zytokinrezeptorkomplex sind folgende kritische Aminosäuren konserviert: p19 W157, L161 und IL-23R L113 und I28. An der Position von Y100 befindet sich im murinen IL-23R die Aminosäure H77, welche aber nicht mit L161 in der Untereinheit p19 interagiert (s. Abb. A3, Abb. A6) [43]. Die daraus resultierende Schlussfolgerung war, dass im murinen IL-23 Zytokinrezeptorkomplex zur Generierung einer funktionell inaktiven Variante nur die Aminosäure W157 in p19 mutiert werden muss [43]. Im humanen IL-23 führt die Kombination der Mutationen von W156 und L160 in p19 ebenfalls zu einer funktionell inaktiven Variante [43].

Auch im IL-12 Zytokinrezeptorkomplex befindet sich eine aromatische Aminosäure im Zentrum der *site III* Interaktion: hp35 Y189 und mp35 Y185 (s. Abb. A2) [40, 43]. Hierbei bildet Y189 zusammen mit I193 in p35 eine hydrophobe Tasche [40]. IL-12R β 2 F99 und A27 ragen in diese Tasche und interagieren mit dieser [40, 45]. Sie entsprechen Y100 und I28 in IL-23R [40]. Außerdem interagiert Y189 mit IL-12R β 2 G115, Q112 und V100 (s. Abb. A5) [2]. Im

Vergleich zu IL-23R ist die N-terminale Domäne von IL-12R β 2 kürzer und interagiert nur mit der Spitze der Helix D von p35 [45]. Zusätzlich zu den Interaktionen der N-terminalen Domäne von IL-12R β 2 wurde eine weitere Interaktion von p35 mit Domäne 2 von IL-12R β 2 identifiziert [45]. Durch Mutation des hp35 Y189 und mp35 Y185 konnten weitere funktionell inaktive IL-12 Varianten generiert werden [43].

Durch Vergleich der Struktur von ungebundenem IL-12 mit der Struktur von IL-12 im Zytokinrezeptorkomplex konnten Bloch *et al.* zeigen, dass durch Bildung des Zytokinrezeptorkomplexes eine Konformationsänderung in p40 und p35 stattfindet [45]. Auch im IL-23 Zytokinrezeptorkomplex findet eine Konformationsänderung von p19 statt. Allerdings ist diese im Vergleich zu p35 weniger ausgeprägt [45]. Die genauen strukturellen Kenntnisse über den Aufbau des Zytokinrezeptorkomplexes sind essenziell, um neue Ansätze für Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

1.4 Signaltransduktion von IL-12 und IL-23

Die Signaltransduktion der IL-12 Familie erfolgt u.a. über den JAK-STAT-Weg [2, 47]. Da die Rezeptoren IL-12R β 1, IL12R β 2 sowie IL-23R als Typ I/II Rezeptoren keine intrinsische Kinaseaktivität besitzen, werden zur Signaltransduktion die assoziierten Tyrosinkinassen Januskinasen 2 (JAK2) und Tyrosinkinase 2 (TYK2) benötigt [2]. TYK2 interagiert mit dem IL-12R β 1 und JAK2 mit IL-12R β 2 bzw. IL-23R [2, 25]. Die IL-12 Rezeptoren assoziieren mit den Tyrosinkinassen über die klassischen Box1 und Box2 Motive [48]. Die identifizierte JAK2-Bindungsseite in IL-23R zeigt keine Ähnlichkeit zu den Box1 oder Box2 Motiven, sodass eine nicht-kanonische Bindungsseite in IL-23R vorliegt [48]. Nach der Zytokinbindung dimerisieren die Rezeptoren, sodass eine Transaktivierung der JAKs erfolgt. Im Zuge dessen phosphorylieren sie die Tyrosine in der intrazellulären Domäne des Rezeptors [49]. An diese phosphorylierten Aminosäurereste können die STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) über die *Src homology 2* (SH2) Domäne binden und werden ebenfalls durch die JAKs phosphoryliert [49]. Durch die Phosphorylierung wird die Dimerisierung von verschiedenen STATs induziert [50]. IL-12 und IL-23 aktivieren STAT1, STAT3, STAT4 und STAT5, wobei IL-12 am stärksten STAT4 und IL-23 STAT3 aktiviert [25]. Die dimerisierten STATs wirken im Zellkern als Transkriptionsfaktor [50] und induzieren die Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel durch STAT3 *retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ t* (ROR γ t), *B-lymphocyte induced maturation protein-1* (Blimp-1), *T-box expressed in T-cells* (T-bet), *special AT-rich sequence-binding protein-1* (Satb1), *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) und *GATA binding protein 3* (GATA-3) [47]. An die phosphorylierten Tyrosine in der intrazellulären Domäne des Rezeptors können Proteine mit SH2 oder Phosphotyrosinbindungsdomänen binden [51]. Dadurch können weitere Signalwege wie der *mitogen-activated protein*-Kinase-Weg (MAPK-Weg), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) /Proteinkinase B (AKT)-Weg und NF κ B-Weg aktiviert werden [2, 51]. Die NF κ B-Familie reguliert die Expression von Genen, die an Immunantwort, Entzündungen und Entstehung von Tumoren beteiligt sind [52]. Die Aktivierung des MAPK-

Wegs induziert Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Inflammation und Apoptose [53]. Durch Induktion des PI3K/AKT-Weges wird Zellproliferation, Zellwachstum und Zelldifferenzierung induziert [53].

Der JAK-STAT Weg wird durch *suppressors of cytokine signaling* (SOCS) Proteine reguliert [3]. Diese können ebenfalls über ihre SH2 Domäne an die phosphorylierten Tyrosine im Rezeptor binden [3]. Sie konkurrieren mit den STATs um die Bindung an den Rezeptor und einige SOCS fungieren zudem als Pseudosubstrate für JAKs [47]. Sie hemmen so den JAK-STAT-Weg kompetitiv [47]. Aufgrund der nicht-kanonischen Bindungsseite von JAK2 an IL-23R erfolgt durch SOCS keine Inhibition der Signaltransduktion von IL-23 [54].

1.5 Die Rolle von IL-12 und IL-23 im Immunsystem

IL-12 und IL-23 sind strukturell ähnlich aufgebaut und wirken regulatorisch in der Immunantwort [2]. Allerdings haben sie unterschiedliche Funktionen [2].

T-Zellen entstehen aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark [55]. Zur weiteren Differenzierung wandern die T-Zellen in den Thymus [55]. Nach verschiedenen Differenzierungsschritten wandern die naiven T-Zellen in die sekundären Lymphgewebe wie zum Beispiel Lymphknoten [55]. Nach Präsentation des Antigens durch antigenpräsentierende Zellen werden naive *cluster of differentiation* (CD)4⁺-T-Zellen aktiviert und sind in der Lage, sich in Abhängigkeit von Zytokinen in Effektorzellen zu differenzieren [56]. IL-12 induziert die Proliferation von aktivierten T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) [57]. Zudem fördert es die Differenzierung von naiven CD4⁺-T-Zellen zu T_H1-Zellen [57]. Da die IL-12 Rezeptoren hauptsächlich auf aktivierten T-Zellen und NK-Zellen exprimiert werden, wird die Differenzierung der CD4⁺-T-Zellen durch Interferon-γ (IFN-γ) induziert [58, 59]. IFN-γ aktiviert seinerseits STAT1 und führt zur Expression des Transkriptionsfaktors T-bet [59]. T-bet induziert die Expression von IL-12Rβ2 [59]. Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten und *dendritic cells* (DCs) sezernieren IL-12 [59]. Die Signaltransduktion von IL-12 und die daraus resultierende Aktivierung von STAT4 führt zur klonalen Expansion von T_H1-Zellen, die IFN-γ sezernieren (s. Abb. 4) [59]. IFN-γ fördert wiederum die Sekretion von IL-12 durch antigenpräsentierende Zellen, sodass die T_H1-Antwort durch einen positiven Feedbackmechanismus verstärkt wird [59]. IL-12 induziert auf diese Weise eine effektive Immunantwort gegen Bakterien, intrazelluläre Protozoen und Pilze [59]. IFN-γ, welches durch IL-12 aktiviert wird, wirkt toxisch auf Tumorzellen und verhindert die Neoangiogenese von Gefäßen zur Tumorversorgung [59]. So ist IL-12 also auch wichtig bei der Tumorerabwehr [59].

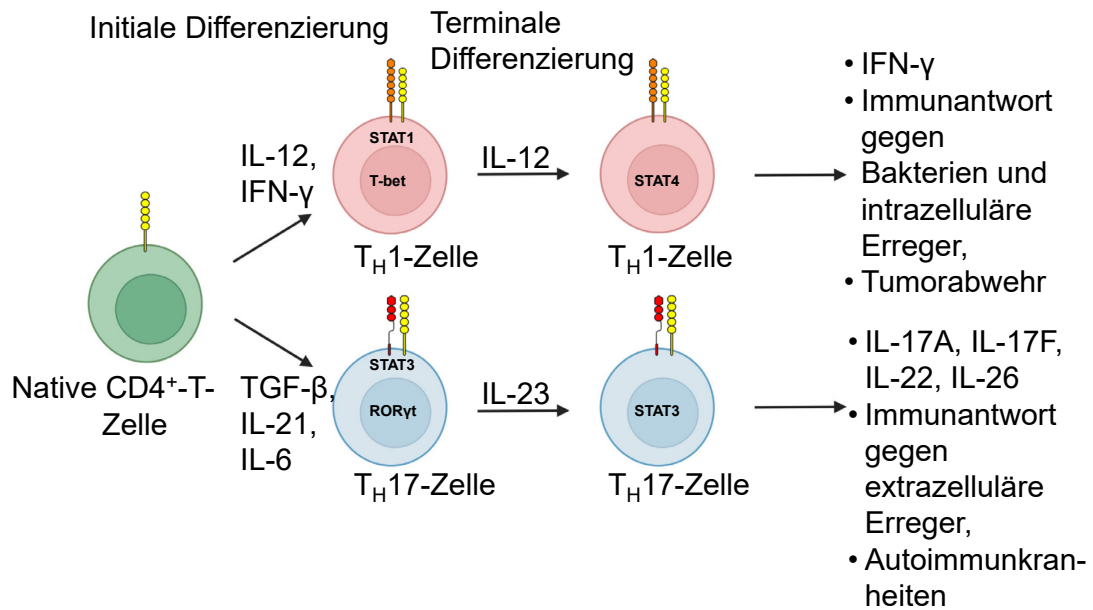


Abb. 4: Differenzierung von naiven CD4⁺-T-Zellen zu TH1-Zellen und TH17-Zellen. Die initiale Differenzierung zu TH1-Zellen wird durch IFN-γ induziert [59]. Durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors T-bet wird IL-12Rβ2 exprimiert [59]. Die Signaltransduktion von IL-12 und Phosphorylierung von STAT4 führt zur klonalen Expansion von TH1-Zellen [59]. Diese sind an der Immunantwort gegen intrazelluläre Erreger und an der Tumorerabwehr beteiligt [59]. Die initiale Differenzierung zu TH17-Zellen wird durch IL-6, IL-21 und TGF-β induziert [60]. Durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors RORγt wird der IL-23R auf der Oberfläche von TH17-Zellen exprimiert [60]. Die Signaltransduktion von IL-23 und die Phosphorylierung von STAT3 führen zur klonalen Expansion der TH17-Zellen [60]. Diese sind an der Immunantwort gegen extrazelluläre Erreger beteiligt und spielen eine Rolle in der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten [56, 60]. Modifiziert nach DiCesare *et al.* [56]. Die Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com erstellt.

IL-23 ist an der terminalen Differenzierung von naiven T-Zellen zu TH17-Zellen beteiligt [60]. Hauptsächlich auf aktivierten T-Zellen, Gedächtniszellen und NK-Zellen wird IL-23R dabei exprimiert [41]. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT3 und RORγt führt zur Expression des IL-23R [60]. Die Expression von STAT3 und RORγt wird durch IL-6 und IL-21 induziert [60]. *Transforming growth factor-β* (TGF-β) induziert in geringen Konzentrationen ebenfalls RORγt [60]. IL-23 wird durch Monozyten, Makrophagen, DCs, T-Zellen, B-Zellen und Endothelzellen sezerniert [56]. Durch Interaktion von IL-23 mit seinem Rezeptor kommt es zur terminalen Differenzierung von TH17-Zellen [56]. Die Signaltransduktion von IL-23 führt zu einer Induktion von RORγt, sodass es durch diesen positiven Feedbackmechanismus zu einer verstärkten Expression des IL-23R kommt [60]. Die TH17-Zellen induzieren die Expression von IL-17, IL-17F, IL-22 und IL-26 (s. Abb. 4) [56]. Diese Zytokine sind zum Beispiel wichtig in der Immunantwort gegen extrazelluläre Bakterien [56]. Auch konnte gezeigt werden, dass IL-23 an Autoimmunerkrankungen beteiligt ist [60], da p19-defiziente Mäuse aufgrund der fehlenden TH17-Zellen resistent gegen experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) sind [56]. Zusätzlich wurden verschiedene Autoimmunkrankheiten wie Psoriasis, rheumatoide Arthritis und Morbus Crohn mit einer Überproduktion von TH17-Zellen assoziiert [56].

1.5.1 IL-12 und IL-23 in aktuellen Therapiestrategien

Aktuell gibt es verschiedene Möglichkeiten, um die IL-23 Zytokinrezeptorkomplexbildung und dessen Signaltransduktion zu inhibieren [61]. Hierfür können monoklonale Antikörper (anti-p40, anti-p19) und small molecules verwendet werden (s. Abb. 5) [61, 62]. Die ersten Möglichkeiten wurden entwickelt, ohne den genaueren strukturellen Aufbau von IL-12 und IL-23 zu kennen [61].

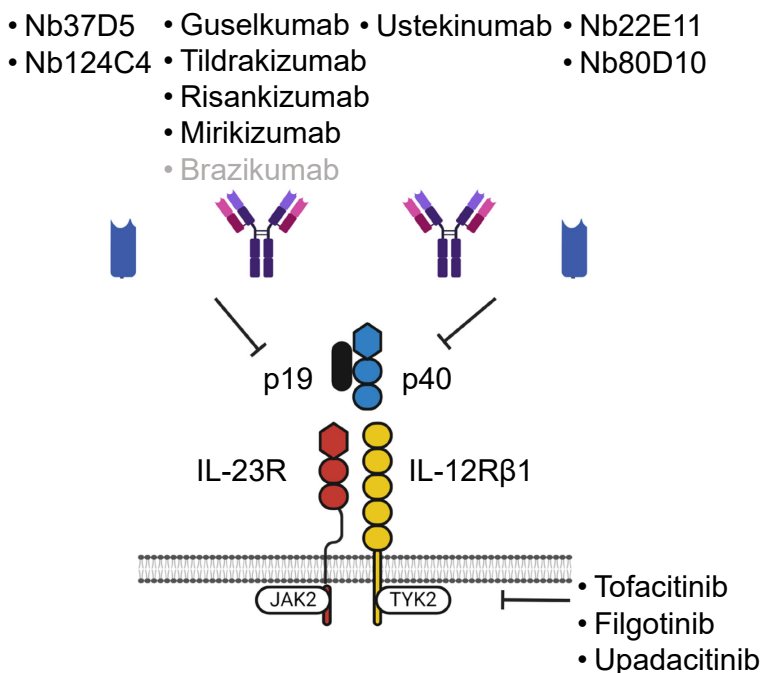


Abb. 5: IL-12 und IL-23 in aktuellen Therapiestrategien. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Ausbildung des Zytokinrezeptorkomplexes zu inhibieren: Antikörper und Nanobodies [61]. Des Weiteren wird zwischen Strategien unterschieden, die an p40 binden und so die Signaltransduktion von IL-12 und IL-23 inhibieren oder an p19 binden, wodurch die Signaltransduktion von IL-23 inhibiert wird [61]. Zu den p19 spezifischen Antikörpern zählen Guselkumab, Tildrakizumab, Risankizumab, Mirikizumab und Brazikumab. Die klinischen Studien bezüglich Brazikumab wurden eingestellt [63]. p19 spezifische Nanobodies sind Nb37D5 und Nb124C4 [62, 64, 65]. Des Weiteren wurden Antikörper (Ustekinumab) und Nanobodies (Nb22E11 und Nb80D10) entwickelt, die an p40 binden [61]. Eine weitere Möglichkeit die Signaltransduktion von IL-12 und IL-23 zu inhibieren, sind Januskinaseinhibitoren. Dies sind zum Beispiel Tofacitinib, Filgotinib und Upadacitinib. Modifiziert nach Korta *et al.* [66]. Diese Abbildung wurde mithilfe von Bio Render.com erstellt.

Einer der ersten monoklonalen Antikörper, die zugelassen wurden, war Ustekinumab (Zulassung 2009 in der EU und USA) [67-69]. Dies ist ein humaner IgG1κ-Antikörper, der zur ersten Generation gehört und an die Domäne 1 von p40 bindet [66, 67]. Dadurch inhibiert Ustekinumab die Signaltransduktion von IL-12 und IL-23 (s. Abb. 5) [67]. Dieser Antikörper wurde zunächst für Psoriasis und Psoriasis Arthritis zugelassen und später auch für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Bei moderater bis schwerer Colitis ulcerosa zeigte sich im Vergleich zu TNF-α Blockern ein positiver Effekt mit verbessertem Nebenwirkungsprofil [70].

Des Weiteren wurden verschiedene Antikörper entwickelt, die als Zielstruktur p19 erkennen und so die spezifische Signaltransduktion von IL-23 inhibieren (2. Generation) [64]. Dies sind Guselkumab (Zulassung 2017 in den USA und der EU), Tildrakizumab (Zulassung 2018 in der

EU und den USA), Risankizumab (Zulassung 2019 in den USA und der EU), Mirikizumab (Zulassung 2023 in der EU und den USA) und Brazikumab (bisher keine Zulassung, 2023 wurden die Studien eingestellt) (s. Abb. 5) [63-65, 68, 69]. Guselkumab, Tildranzumab, Risankizumab sind für Psoriasis zugelassen [65, 68, 69]. Risankizumab und Guselkumab binden mit einer höheren Affinität an IL-23 als Tildrakizumab und blockieren die Bindung von IL-23 an IL-23R und die terminale Differenzierung von T_H17-Zellen vollständig [65]. Mirikizumab ist für die Behandlung von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn zugelassen [70]. Eine weitere Möglichkeit zur Inhibition von Zytokinen ist die Verwendung von *small molecules*, zum Beispiel *nanobodies* [62]. *Nanobodies* bestehen im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern nur aus dem variablen Teil einer schweren Kette, die sich von Kamelantikörpern (*heavy chain only* Antikörper) ableiten [71]. *Nanobodies* sind im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern spezifischer und stabiler [71]. Es existieren bereits einige, die gegen p40 gerichtet sind (Nb 22E11, Nb 80D10) oder andere, die p19 binden (Nb 37D5, Nb124C4) (s. Abb. 5) [62]. Bisher konnte kein *nanobody* der IL-12/IL-23 Familie für die therapeutische Anwendung zugelassen werden [68, 69]. Bereits 2020 konnte ein trivalenter anti-TNF α -Nanobody (Ozoralizumab) in Japan zugelassen werden [72].

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Januskinaseinhibitoren (3. Generation). Dies sind zum Beispiel Tofacitinib (Zulassung 2017 in den USA und der EU), Filgotinib (Zulassung 2023 in der EU) und Upadacitinib (Zulassung in der EU und den USA) [68, 69]. Sie inhibieren JAK1 und JAK3 [66]. Sie zeigten eine gute Wirksamkeit bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in klinischen Studien [66].

In klinischen Studien bezüglich der Verwendung von IL-12 in der Therapie von Tumoren zeigten sich bei klinischer Anwendung von rekombinanten IL-12 (reIL-12) schwere unerwünschte Wirkungen wie zum Beispiel hämorrhagische Colitis, Sepsis und Tod, was die therapeutische Anwendung erschwert [73]. Deshalb gibt es aktuell noch keine klinische Anwendung von IL-12 in der Therapie [73].

1.6 Das p40 Homodimer: Agonist oder Antagonist von IL-12/IL-23?

Die α -Untereinheiten p35 und p19 werden nur in Anwesenheit von p40 sezerniert [21]. Liegt die α -Untereinheit ungebunden vor, wird diese im endoplasmatischen Retikulum (ER) durch Chaperone abgebaut [21]. In Abwesenheit von p35 und p19 können p40 Homodimere gebildet werden (p80) [74]. Die beiden p40 Untereinheiten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden [74].

Heinzel *et al.* beschrieben 1997 zuerst, dass p80 *in vivo*, sowie *in vitro* als kompetitiver Antagonist von IL-12 und IL-23 fungiert und einen Selbstregulierungsmechanismus der Zytokinantwort darstellt [75]. Es wurde zunächst vermutet, dass die Signaltransduktion von p80 über ein Dimer aus zwei IL-12R β 1 erfolgt [76]. Allerdings konnte bis jetzt keine Aktivität des IL-12R β 1 Homodimers in funktionellen Analysen nachgewiesen werden [77]. Auf zellulärer Ebene inhibiert p80 die Aktivität von T-Zellen und NK-Zellen und dadurch die IFN- γ Produktion [78]. Es wurde allerdings auch gezeigt, dass p80 auch agonistische Effekte haben

kann. In Mikroglia und Makrophagen konnte gezeigt werden, dass p80 durch Interaktion mit IL-12R β 1 den NF κ B-Weg aktiviert und so Stickstoffmonoxid (NO) produziert wird [79] und die Sekretion weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-16 induziert [73]. Aufgrund dessen wurde die Hypothese aufgestellt, dass p80 eine Rolle in entzündlichen ZNS-Krankheiten spielt, da p40 bei diesen überexprimiert ist [79].

1.7 Ziele der Doktorarbeit

IL-12 und IL-23 bestehen beide aus der gemeinsamen Untereinheit p40, haben aber in der Immunreaktion unterschiedliche Funktionen [6]. IL-23 spielt eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie von Autoimmunkrankheiten und IL-12 weist eine inhibitorische Wirkung in Tumorzellen auf [59]. Ustekinumab, als einer der ersten gegen p40 gerichteten Antikörper, der zum Beispiel in der Therapie von rheumatischen Erkrankungen oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verwendet wird, wurde ohne genaue Kenntnisse über den strukturellen Aufbau des Zytokinrezeptorkomplexes von IL-12 und IL-23 entwickelt [61]. Ziel dieser Doktorarbeit war es daher, durch Charakterisierung von kritischen Aminosäuren der *site II* Interaktion zwischen p40 und IL-12R β 1 den Aufbau des Zytokinrezeptorkomplexes zu vervollständigen, um neue Therapieansätze zu finden.

Der Aufbau des IL-12 und IL-23 Zytokinrezeptorkomplexes folgt dem *site I-II-III* Paradigma [34]. Die kritischen Aminosäuren der *site I* und *III* wurden zu Beginn dieser Doktorarbeit durch die AG Scheller bereits charakterisiert [34, 43]. Daher sollte nun die *site II* näher charakterisiert werden.

Durch die strukturellen Ähnlichkeiten zum IL-6 Zytokinrezeptorkomplex wurde vermutet, dass die N-terminale Domäne von p40 relevant für *site II* ist [39]. Aufgrund dieser Vermutung werden verschiedene Deletionsvarianten sowie anschließende Punktmutationen in der N-terminalen Domäne des murinen HyperIL-23 (HIL-23) generiert. Diese werden in eukaryotischen Zellen exprimiert und mittels Co-Immunpräzipitation, Zellviabilitätsanalyse und Analyse der aktivierten Signalwege nach Zytokinstimulation untersucht. Zur funktionellen Analyse werden Ba/F3-gp130 Zellen genutzt, die nach bereits erfolgter retroviraler Transduktion, die beiden Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren [54].

IL-12 und IL-23 bestehen beide aus der β -Untereinheit p40 [2, 12]. Mit dem oben beschriebenen Vorgehen soll daher überprüft werden, ob die kritischen Aminosäuren des Zytokinrezeptorkomplexes von IL-23 denen des murinen IL-12 entsprechen. P40 wird unabhängig von p35 und p19 sezerniert [21] und ist in der Lage, Homodimere (p80) zu bilden [74], die unter bestimmten Bedingungen antagonistische Effekte aufweisen können [75]. Die Signaltransduktion von p80 erfolgt wahrscheinlich über IL-12R β 1 [76]. Es soll analysiert werden, ob die kritischen Aminosäuren des murinen IL-23 ebenfalls für die Interaktion zwischen p80 und IL-12R β 1 verantwortlich ist, auch wenn bis jetzt nicht nachgewiesen werden konnte, dass das IL-12R β 1 Homodimer funktionell aktiv ist [77].

Während der experimentellen Analysen identifizierten Glassman *et al.* verschiedene kritische Aminosäuren der *site II* mittels Cryo-Elektronenmikroskopie (Cryo-EM), wobei sie jedoch nicht näher auf ihre Funktionalität eingingen [42]. Schröder *et al.* und Esch *et al.* zeigten für IL-12 und IL-23 bei der Charakterisierung der *site I* und *III*, dass die Mutation einzelner kritischer Aminosäuren ausreichend ist, um eine funktionell inaktive IL-12 bzw. IL-23 Variante zu generieren [34, 43]. Deshalb werden einzelne kritische Aminosäuren in der N-terminalen Domäne von p40 näher auf ihre Funktionalität analysiert, um neue Ansatzpunkte für klinische Therapien zu finden.

2 Publikation

- 2.1 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, Georgy J, Arlt Y, Moll JM, Ouzin M, Weitz HT, Gremer L, Willbold D, Grötzinger J, Thives-Kurenbach F, Scheller J, and Floss DM. *Journal of Biological Chemistry*, 297:101295, (2021)**

Publiziert in: *Journal of Biological Chemistry*

Impact factor: 5,486 (2021)



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

Received for publication, April 30, 2021, and in revised form, October 4, 2021. Published, Papers in Press, October 9, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101295>

Jacqueline Georgy¹, Yvonne Arlt¹, Jens M. Moll¹, Meryem Ouzin¹, Hendrik T. Weitz¹, Lothar Gremer^{2,3}, Dieter Willbold^{2,3}, Joachim Grötzinger⁴, Felix Thives-Kurenbach¹, Jürgen Scheller¹, and Doreen M. Floss^{1,*}

From the ¹Institute of Biochemistry and Molecular Biology II, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; ²Institute of Biological Information Processing (IBI-7: Structural Biochemistry) and JuStruct: Jülich Center for Structural Biology, Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany; ³Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; ⁴Institute of Biochemistry, Medical Faculty, Christian-Albrechts-University Kiel, Kiel, Germany

Edited by Peter Cresswell

Interleukin (IL)-12 and IL-23 are composite cytokines consisting of p35/p40 and p19/p40, respectively, which signal via the common IL-12 receptor β 1 (IL-12R β 1) and the cytokine-specific receptors IL-12R β 2 and IL-23R. Previous data showed that the p40 component interacts with IL-12R β 1, whereas p19 and p35 subunits solely bind to IL-23R and IL-12R β 2, resulting in tetrameric signaling complexes. In the absence of p19 and p35, p40 forms homodimers and may induce signaling via IL-12R β 1 homodimers. The critical amino acids of p19 and p35 required for binding to IL-23R and IL-12R β 2 are known, and two regions of p40 critical for binding to IL-12R β 1 have recently been identified. In order to characterize the involvement of the N-terminal region of p40 in binding to IL-12R β 1, we generated deletion variants of the p40-p19 fusion cytokine. We found that an N-terminal deletion variant missing amino acids M23 to P39 failed to induce IL-23-dependent signaling and did not bind to IL-12R β 1, whereas binding to IL-23R was maintained. Amino acid replacements showed that p40W37K largely abolished IL-23-induced signal transduction and binding to IL-12R β 1, but not binding to IL-23R. Combining p40W37K with D36K and T38K mutations eliminated the biological activity of IL-23. Finally, homodimeric p40D36K/W37K/T38K did not interact with IL-12R β 1, indicating binding of homodimeric p40 to IL-12R β 1 is comparable to the interaction of IL-23/IL-12 and IL-12R β 1. In summary, we have defined D36, W37, and T38 as hotspot amino acids for the interaction of IL-12/IL-23 p40 with IL-12R β 1. Structural insights into cytokine-cytokine receptor binding are important to develop novel therapeutic strategies.

The interleukin (IL)-12 type cytokines IL-12 and IL-23 play critical roles in a variety of innate and acquired immune responses. Misregulation eventually causes chronic autoimmune responses, and Ustekinumab, an antibody blocking IL-12/IL-23 signaling, was recently approved for psoriasis, psoriatic

arthritis, Crohn's disease, and ulcerative colitis (1). Knowledge about structure and composition of the IL-12/IL-23 cytokine:receptor complexes, as well as signaling components, offered new possibilities for effective targeting strategies of both cytokines. In general, cytokines of the IL-6/IL-12 family activate the JAK/STAT pathway, the MAPK pathway, and the PI3K/AKT pathway. Albeit, STAT1, 3, 4, and 5 are activated by IL-12 and IL-23, STAT4 remains the dominant signaling molecule for IL-12 and STAT3 for IL-23 (2).

IL-12 cytokines function as heterodimers comprised of α and β subunits. IL-12 and IL-23 share their β subunit p40, which is linked to α subunits through disulfide bonds formed between C199 of p40 and C96 of p35 or C73 of p19 for human IL-12 and IL-23, respectively (3–5). Interactions of IL-12 type cytokines with their cognate receptors follow the “site 1-2-3” structural model based on the structure of IL-6, IL-6R and gp130 (6–8). p40 uses the same binding site 1 of domains 2 and 3 to interact with both p19 and p35 (9). Aside from the central cysteine residues, R207 and Y211 in murine p35, R211 and Y215 in human p35 are critical for association with p40 (10). For murine IL-23, mutations in I176, A178, and R179 of p19 prevent the formation of IL-23 (11).

The receptor complex interfaces between the cytokine subunits of IL-12/IL-23, and the respective receptors IL-12R β 1 and IL-12R β 2 or IL-23R are named site 2 and site 3, respectively. Based on the structure of IL-23, our work showed that murine p19W157 is the hotspot amino acid for site 3 interaction with murine IL-23R (9, 11). For p40, the domains D2 and D3 are also required to correctly position the binding site 3 of IL-23 to IL-23R (11). In 2018, the crystal structure of human IL-23:IL-23R in complex with a single-domain VHH camelid antibody targeting human IL-23 (Nb22E11) was solved (12). This finding allowed us to show that combined substitutions of W156A and L160E result in an inactive human p19 cytokine variant on cells expressing human IL-23 receptors. For site 3 interaction between IL-12 and IL-12R β 2, we demonstrated that the p19-analogous site 3 substitution Y189R in human p35 abolishes binding to IL-12R β 2 in a cross-species manner (13).

* For correspondence: Doreen M. Floss, doreen.floss@uni-duesseldorf.de.

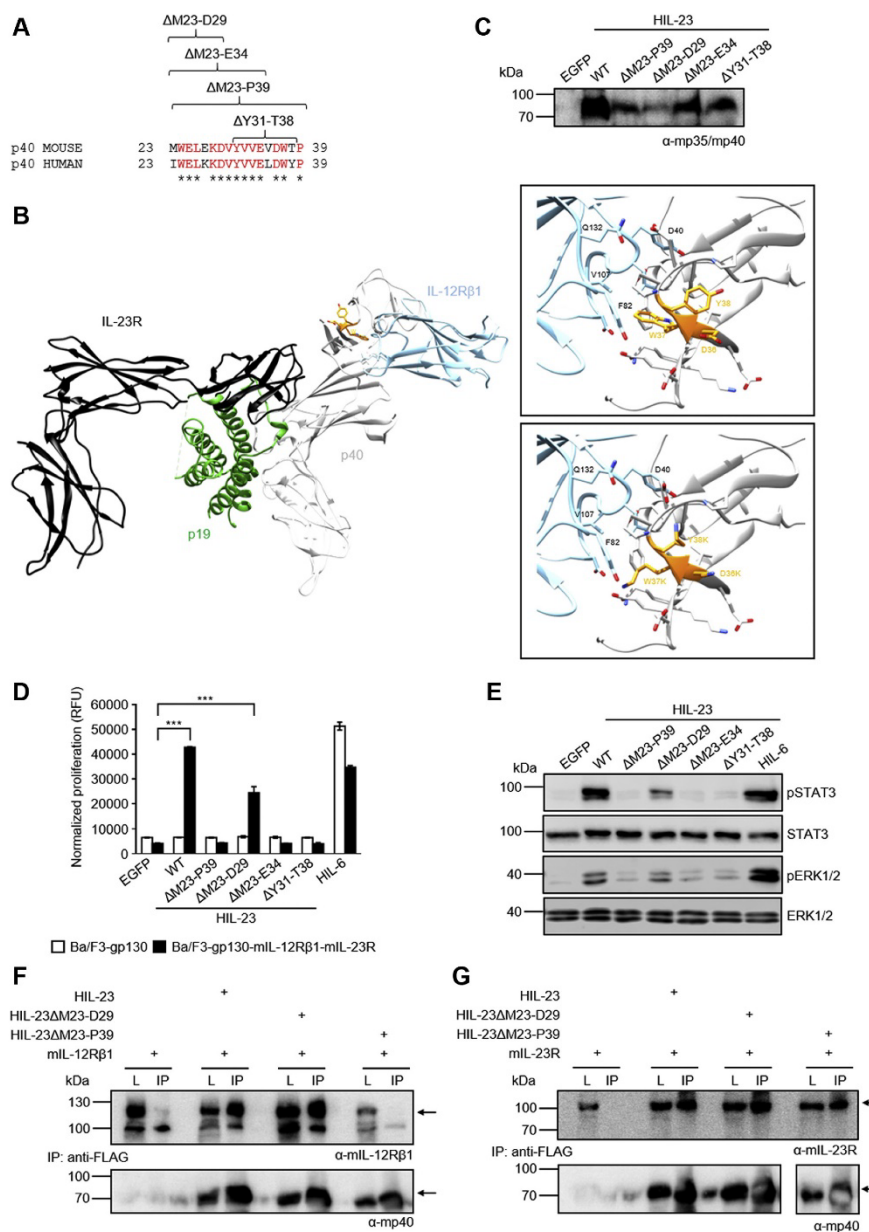
p40W37 substitution and site 2 interaction

Figure 1. The N-terminal region of murine p40 from Y31 to T38 mediates binding to murine IL-12Rβ1. A, alignment of murine and human p40 N-terminal amino acids with analyzed mp40 deletion variants. B, crystal structure of the IL-23:IL-23R:IL-12Rβ1 complex (PDB 6WDQ). Insets show zoomed in views on the area surrounding residues D36-Y38. D36-Y38 are depicted in orange stick representation. p40 and IL-12Rβ1 residues in contact with D36-Y38 are displayed in stick representation. p40 mutations D36K, W37K and Y38K were visualized in the second inset. C, Western blot analysis of secreted murine IL-23 variants from transfected CHO-K1 cells. D, cellular proliferation of Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R cells. The cells were cultured for 3 days in the presence of 10 ng/ml HIL-6 or with the indicated cytokines (10% conditioned cell culture supernatant of transfected CHO-K1 cells). Parental Ba/F3-gp130 cells were used as controls. The results of one representative experiment of four are shown. Error bars represent S.D. for technical replicates. Statistical analysis used a one-way ANOVA, followed by Bonferroni correction ($n = 3$). *** $p \leq 0.001$. E, analysis of STAT3 and ERK1/2 activation. Ba/F3-gp130-

p40W37 substitution and site 2 interaction

Typically, site 2 is mediated by the cytokine α subunit. However, interaction of p19/p35 with IL-12R β 1 is unlikely. Several data suggest that p19/p35 are dispensable for this interaction and that rather p40 directly interacts with IL-12R β 1. First of all, secreted p40 binds directly to IL-12R β 1 and is an effective antagonist of IL-12 and IL-23 (14–16). Additionally, p40 monomers require IL-12R β 1, but not IL-12R β 2, to attenuate autoimmune diseases (17). Second, IL-12 or IL-23 signaling is blocked by Ustekinumab. Ustekinumab binds to an epitope on domain 1 of human p40 consisting of three loops (W37-M45, L62-L69, T76-Y88, Fig. S1) and prevents interaction with IL-12R β 1 (18). These data suggest IL-12 and IL-23 bind to IL-12R β 1 *via* p40. Interestingly, the binding area of the anti-human p40 22E11 nanobody overlaps with the one of Ustekinumab (19). In 2015, we showed that deletion of D1 in murine p40 prevents interaction of p40D2D3/p19 with murine IL-12R β 1 suggesting p40 overtakes the site 2 interaction capacity of p19 (11). Recently, crystal structures of human IL-12R β 1 and the IL-23 receptor complex (IL-23/IL-23R/IL-12R β 1) have been reported by Glassman and colleagues (20). In addition, cryo-EM structures of complete IL-12 and IL-23 extracellular domain complexes have been determined (20). Based on these data, Glassman *et al.* hypothesize a single binding interface formed by a contiguous, positively charged loop in p40 (human: H216, K217, and K219) and a hydrophobic strip on p40 (W37 and F82) (Fig. S1). IL-12 and IL-23 variants with multiple alanine mutations (P39A/D40A/E81A/F82A) in two loops of p40 D1 reduce the potency of the cytokines. However, the impact of W37 has not been analyzed (20).

Here, we show that the N-terminal region of p40 constitutes the binding interface to IL-12R β 1. Furthermore, we confirm W37 of p40 as a mandatory amino acid for site 2 interaction.

Results**The amino acids Y31 to T38 of murine p40 are critically involved in binding of murine IL-23 to murine IL-12R β 1**

Considering that (i) the N-terminal region of gp130 is required for formation of the IL-6 receptor complex (21), and (ii) Ustekinumab neutralizes the activity of IL-12 and IL-23 *via* binding to D1 of p40 (18), we suggest that the N-terminal region of p40 is involved in binding to IL-12R β 1. In order to prove our hypothesis, we generated four N-terminal deletion variants of murine p40 (mp40) in murine Hyper-IL-23 (HIL-23). HIL-23 is a fusion protein of mp40 and murine p19 (mp19) connected by a flexible peptide linker (22, 23). This strategy largely prevents the formation of free p40 homodimers, which may have antagonistic properties in our assays as reported previously (15). Each of the four HIL-23 deletion variants (Δ M23-D29, Δ M23-E34, Δ M23-P39, and Δ Y31-T38,

Fig. S1) contains an Ig κ chain signal peptide and an N-terminal FLAG tag.

Alignment of the first 17 amino acids of secreted p40 shows 76.5% homology between mouse and men, while the overall homology of p40 is about 66.7% (Fig. 1A). The structure of IL-23 reveals that the N-terminus of p40 is freely accessible for interaction with IL-12R β 1 (Fig. 1B). p40 displays extensive domain flexibility manifested by a hinge-like motion of D1 or D3 of 5° to 10° with respect to D2 (12).

Proliferation of murine Ba/F3 cells stably transduced with gp130, murine IL-23R, and murine IL-12R β 1 depends on HIL-23 or Hyper-IL-6 (HIL-6) (23). Cell culture supernatants of CHO-K1 cells secreting HIL-23 or deletion variants thereof (Fig. 1C) were used to stimulate Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R cells. Proliferation was induced by HIL-23 Δ M23-D29 but not by the other three deletion variants (Fig. 1D). In total, 10% of conditioned cell culture supernatants from CHO-K1 cells have been used for cell stimulation to show activity of cytokines with lower secretion levels. Dose–response studies of Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R cells revealed that saturation of HIL-23-dependent cell proliferation is achieved with 1% of supernatant (Fig. S2). Analysis of STAT3 and ERK1/2 phosphorylation, which are part of the intracellular signal transducing machinery, showed that only HIL-23 Δ M23-D29 was able to initiate signaling (Fig. 1E), suggesting that the amino acids from Y31 to T38 are critical for signal transduction. To investigate whether binding of HIL-23 to mIL-12R β 1 is lost in the mutant version, cytokine/cytokine receptor immunoprecipitation studies with two deletion variants were performed. As a control, both cytokine variants should still bind mIL-23R. For coimmunoprecipitation studies, lysates with heterologous expressed murine IL-12R β 1 (mIL-12R β 1) and HIL-23 or variants thereof were combined. Precipitation of HIL-23 using FLAG mAbs resulted in coimmunoprecipitation of mIL-12R β 1 and mIL-23R (Fig. 1, F and G). While both HIL-23 Δ M23-D29 and HIL-23 Δ M23-P39 interacted with mIL-23R (Fig. 1G), interaction with mIL-12R β 1 was only seen for HIL-23 Δ M23-D29 and HIL-23 (Fig. 1F). Taken together, our data show that the N-terminal region of p40 from Y31 to T38 mediates binding to mIL-12R β 1.

The amino acid W37 is critically involved in binding of murine IL-23 to murine IL-12R β 1

Single hotspot amino acids within the amino acid sequence Y31 to T38 of p40 may contribute to IL-12R β 1 binding. Consequently, the following p40 point mutations were introduced in HIL-23: Y31E, E34K, D36K, W37K, T38K (Fig. 2A). Recently, the aromatic residue W37 was proposed as hotspot amino acid for interaction of p40 with IL-12R β 1 (20). W37 is at the center of a hydrophobic interface formed by residues

mIL-12R β 1-mIL-23R cells were washed, starved, and stimulated with the indicated cytokines (10% conditioned cell culture supernatant of transfected CHO-K1 cells) for 30 min. Cellular lysates were prepared, and equal amounts of total protein (50 μ g/lane) were loaded on SDS-PAGE gels, followed by immunoblotting using specific antibodies for phospho-STAT3, STAT3, phospho-ERK1/2, and ERK1/2. Western blotting data show results of one representative experiment of two. F, co-IP of FLAG-tagged murine HIL-23 variants (wild-type, Δ M23-D29, Δ M23-P39) and full-length mIL-12R β 1. The position of mIL-12R β 1 and HIL-23 variants is indicated by arrows. One of two independent experiments is shown. G, co-IP of FLAG-tagged murine HIL-23 variants (wild-type, Δ M23-D29, Δ M23-P39) and full-length mIL-23R. The position of mIL-23R and HIL-23 variants is indicated by arrows. One of two independent experiments is shown.

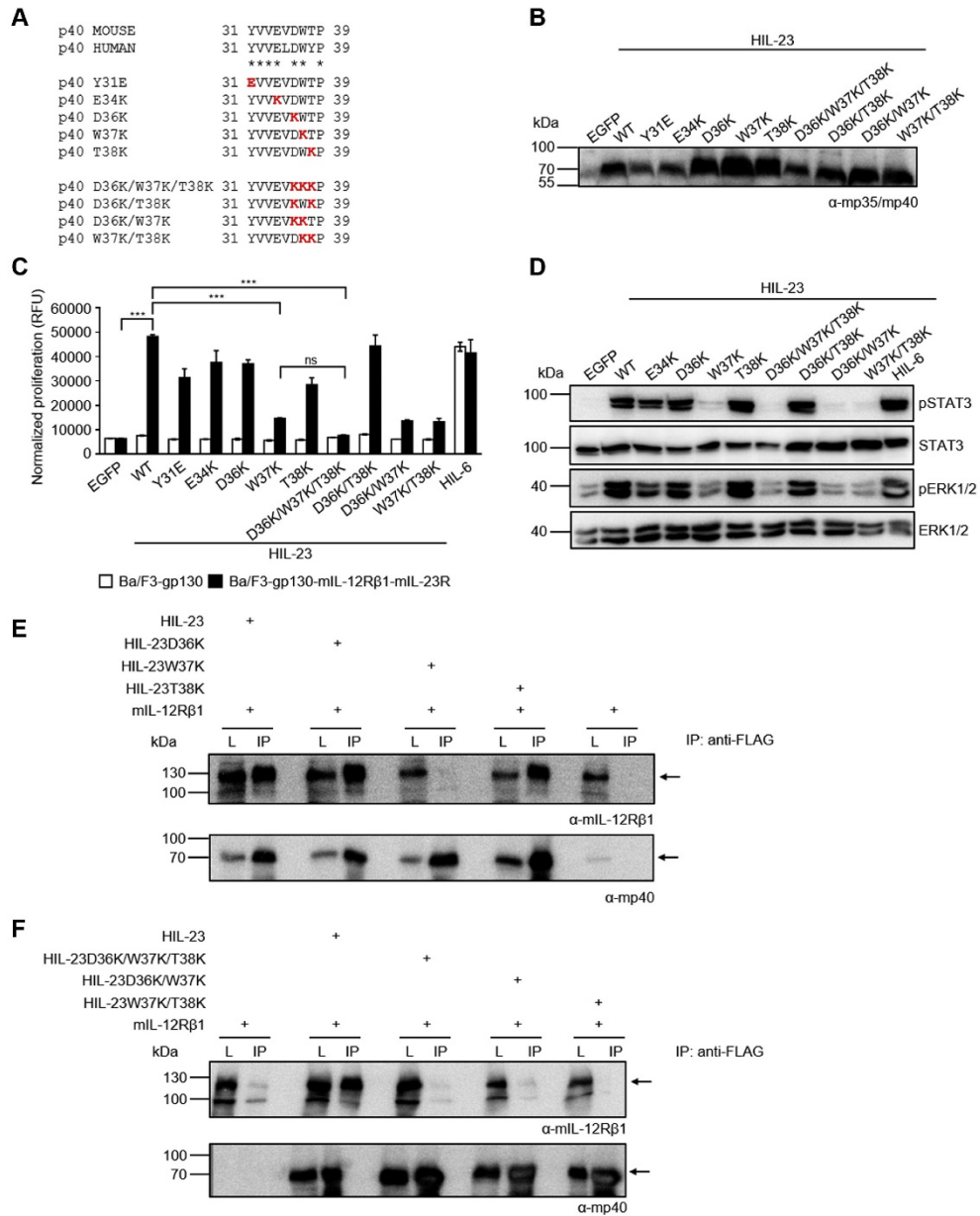
p40W37 substitution and site 2 interaction

Figure 2. W37 of murine p40 is important for binding of HIL-23 to murine IL-12Rβ1. A, alignment of murine and human p40 N-terminal amino acids Y31 to P39. Single, double, and triple substitutions within mp40 are highlighted in red. B, Western blot analysis of secreted murine HIL-23 variants from transfected CHO-K1 cells. C, cellular proliferation of Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R cells. The cells were cultured for 3 days in the presence of 10 ng/ml HIL-6 or with the indicated cytokines (10% conditioned cell culture supernatant of transfected CHO-K1 cells). Parental Ba/F3-gp130 cells were used as controls. The results of one representative experiment of three are shown. Error bars represent S.D. for technical replicates. Statistical analysis used a one-way ANOVA, followed by Bonferroni correction ($n = 3$), *** $p \leq 0.001$, ns not significant. D, analysis of STAT3 and ERK1/2 activation. Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R cells were washed, starved, and stimulated with the indicated cytokines (10% conditioned cell culture supernatant of transfected CHO-K1 cells) for 30 min. Cellular lysates were prepared, and equal amounts of total protein (50 μ g/lane) were loaded on SDS-PAGE gels, followed by immunoblotting using

p40W37 substitution and site 2 interaction

V107, L108, D101, and Y134 of the IL-12R β 1 as well as F82 of p40 (Fig. 1B) (20). In general, we introduced the positively charged amino acid lysine (K) to replace negatively charged (E34, D36), polar (T38), or hydrophobic (W37) amino acids except for Y31, where we replaced the polar amino acid Y into a negatively charged glutamic acid (E). Our aim was to achieve strong repulsion by introduction of a large, positively charged amino acid. Additionally, we generated three double (D36K/T38K; D36K/W37K; W37K/T38K) and one triple mutant (D36K/W37K/T38K, KKK) (Fig. 2A). Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R cells were stimulated with conditioned cell culture supernatants of CHO-K1 cells containing the HIL-23 mutation variants (Fig. 2B), and proliferation was quantified. The single mutant HIL-23W37K diminished cellular proliferation (Fig. 2C). Analysis of STAT3 and ERK1/2 phosphorylation confirmed reduced signaling for HIL-23W37K (Fig. 2D). Single mutation of p40 T38 or D36 has no influence on IL-23 activity. Changing D36/W37/T38 into D36K/W37K or W37K/T38K was comparable to the single mutation HIL-23W37K. Interestingly, substitution of all three amino acids into KKK completely prevented induction of cellular proliferation and STAT3/ERK1/2 phosphorylation by HIL-23 (Fig. 2, C and D).

Secondary structure analysis by circular dichroism (CD) spectroscopy ruled out the possibility that observed effects are due to a possible improper folding of the KKK mutant compared with wild-type.

Far-UV CD spectroscopy analysis of purified HIL-23 and HIL-23D36K/W37K/T38K (Figs. S3 and S4) indicated a mixed α -helical/ β -sheet structure characterized by a minimum of 209.4 nm (HIL-23) or 211.2 nm (HIL-23D36K/W37K/T38K) and an x-axis intercept of 200.5 nm (HIL-23) or 201.3 nm (HIL-23D36K/W37K/T38K), respectively, which is in good agreement with its crystal structure (Figs. 1B and S4, A and B). The overall secondary structure of HIL-23D36K/W37K/T38K is highly similar to the overall secondary structure of HIL-23 (Fig. S4) and indicates that the KKK mutation does not alter the overall structure of the protein. Furthermore, receptor-binding assays by surface plasmon resonance spectroscopy (SPR) revealed binding of HIL-23D36K/W37K/T38K to the IL-23R with comparable affinity to HIL-23 (Fig. S5 and Table 1).

A possible explanation for reduced binding found for the KKK variant to IL-12R β 1 may be T38K salt bridge formation with D40 (Fig. 1B). This may result in weakening the interaction of p40 to IL-12R β 1 through loss of D40 interaction with IL-12R β 1 Q132. D36K mutation will likely result in repulsion of T38K and D36K further increasing the likelihood of T38K interaction with D40. Despite binding to IL-23R (Fig. S6, A and B), introduction of W37K in HIL-23W37K, HIL-23D36K/W37K, HIL-23W37K/T38K, and HIL-23D36K/W37K/T38K resulted in abrogated binding to IL-12R β 1 (Fig. 2, E and F).

To ensure the importance of p40W37 in binding of IL-23 to the IL-12R β 1, we introduced alanine mutations at position D36, W37, or T38 and expressed the resulting HIL-23 variants in CHO-K1 cells (Fig. 3, A and B). Phosphorylation of STAT3 and ERK1/2 was tremendously reduced in Ba/F3-gp130 cells expressing mIL-23R and mIL-12R β 1 upon stimulation with HIL-23W37A and HIL-23D36A/W37A/T38A (AAA, Fig. 3C). Proliferation of Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R cells induced by HIL-23 was strongly reduced by the triple mutation D36A/W37A/T38A compared with wild-type HIL-23 (Fig. 3D). W37A mutation leads to a loss of the hydrophobic interactions formed with V107, L108, and Y134 of IL-12R β 1 and thus efficiently diminishes the biological activity of the AAA variant. This further highlights that W37 of p40 is mandatory for binding of IL-23 to IL-12R β 1.

Generally, we used HIL-23 fusion proteins for our analyses (Fig. 4A). However, to demonstrate the importance of p40D36/W37/T38 for binding of natural IL-23 to IL-12R β 1, we cotransfected p19 and p40 or p40D36K/W37K/T38K, respectively, into CHO-K1 cells (Fig. 4B). As anticipated, only p19/p40 induced cellular proliferation and STAT3/ERK1/2 phosphorylation of Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R cells (Fig. 4, C and D). Coimmunoprecipitation studies showed p19/p40 interaction with both receptors, whereas p19/p40D36K/W37K/T38K bound to IL-23R but not to IL-12R β 1 (Fig. 4E).

Summing up, we confirmed that the aromatic residue W37 is indispensable for p40 binding to mIL-12R β 1.

The amino acid sequence D36/W37/T38 is critically involved in binding of murine IL-12 to murine IL-12R β 1

IL-12 and IL-23 both interact with the IL-12R β 1 via the p40 subunit, whereas p35 interacts with IL-12R β 2 and p19 with the IL-23R. In order to test whether p40D36/W37/T38 is required for binding of IL-12 to IL-12R β 1, we introduced D36K/W37K/T38K into Hyper-IL-12 (HIL-12) (Fig. 5A) and expressed the proteins in CHO-K1 cells (Fig. 5B). Analogous to inactivating mutations introduced into HIL-23, we performed experiments to ensure proper folding and receptor binding via CD spectroscopy and SPR (Figs. S4 and S5). Far-UV CD spectra were characterized by a minimum of 209.4 nm (HIL-12) or 209.6 nm (HIL-12D36K/W37K/T38K) and an x-axis intercept of 200.9 nm (HIL-12) or 200.1 nm (HIL-12D36K/W37K/T38K), showing a mixed α -helical/ β -sheet structure in good agreement with the crystal structure of HIL-12 (Figs. 5A and S4, C and D). Like in case of HIL-23D36K/W37K/T38K, HIL-12D36K/W37K/T38K retained proper folding and demonstrated binding to IL-12R β 2 comparable to HIL-12 (Table 1 and Fig. S5).

specific antibodies for phospho-STAT3, STAT3, phospho-ERK1/2, and ERK1/2. Western blotting data show results of one representative experiment of three. E, co-IP of FLAG-tagged murine HIL-23 variants (wild-type, D36K, W37K and T38K) and full-length mIL-12R β 1. The position of mIL-12R β 1 and HIL-23 variants is indicated by arrows. One of two independent experiments is shown. F, co-IP of FLAG-tagged murine HIL-23 variants (wild-type, D36K/W37K/T38K, D36K/W37K, W37K/T38K) and full-length mIL-12R β 1. The position of mIL-12R β 1 and HIL-23 variants is indicated by arrows. One of two independent experiments is shown.

p40W37 substitution and site 2 interaction

Table 1
Kinetic parameters of the interaction between the cytokine and the respective receptor

Cytokine	Receptor	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)
HIL-23	IL-23R	3.0×10^4	1.2×10^{-3}	40
HIL-23D36K/W37K/T38K	IL-23R	1.9×10^4	1.1×10^{-3}	57
HIL-12	IL-12R β 2	1.9×10^6	1.9×10^{-3}	0.987
HIL-12D36K/W37K/T38K	IL-12R β 2	3.2×10^6	2.7×10^{-3}	0.840

SPR analysis of HIL-23 and HIL-12 variants binding to IL-23R-Fc and IL-12R β 2-Fc. IL-23R-Fc and IL-12R β 2-Fc were immobilized on a Protein A chip and increasing concentrations of HIL-23 or HIL-12 variants were injected at a flow rate of 30 μ l/min. Measurements were carried out on a Biacore X100 instrument.

We showed previously that IL-12 selectively induced activation of STAT1 and STAT3 in Ba/F3 cells (24), because Ba/F3 cells have very low STAT4 protein levels and cannot be used for analysis of IL-12-induced STAT4 activation (25). HIL-12D36K/W37K/T38K was biologically inactive on Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-12R β 2 cells (Fig. 5, C and D). Coimmunoprecipitation revealed interaction of HIL-12D36K/W37K/T38K with IL-12R β 2 but not with IL-12R β 1, whereas HIL-12 precipitated both IL-12R β 1 and IL-12R β 2 (Figs. 5E and S6C). As a control, we used site 3 variant HIL-12Y185R, which interacts with IL-12R β 1 and not IL-12R β 2 (13). In summary, our data indicate that D36/W37/T38 is mandatory in p40 for interaction with IL-12R β 1.

The amino acid sequence D36/W37/T38 is important for binding of homodimeric p40 to IL-12R β 1

If expressed without p19 or p35, p40 forms the covalently linked p40 homodimer p80, which interacts with IL-12R β 1

to antagonize IL-12 and IL-23. We expressed mp40 and mp40D36K/W37K/T38K in CHO-K1 cells and showed formation of p80 by (non-)reducing SDS-PAGE followed by detection of p40 (Fig. 6A). mp40D36K/W37K/T38K failed to interact with mIL-12R β 1 and neither mp40 nor mp40D36K/W37K/T38K bound to mIL-23R (Fig. 6B). These data were confirmed for human p40 (hp40) variants and their binding to human IL-12R β 1 and human IL-23R (Figs. 6C and S6D). The homology of murine and human p40 is visualized in Fig. S1.

HIL-12 and HIL-23-induced proliferation and STAT3/ERK1/2 phosphorylation of respective Ba/F3-gp130 cells were inhibited by recombinant mp40 but not by mp40D36K/W37K/T38K (Figs. 6, D–I and S3).

Irrespective of p40 being present in IL-12, IL-23, or as homodimeric p40 (p80), our data suggest that the binding mode of p40 to IL-12R β 1 is identical for all three proteins and strongly depends on the N-terminal amino acids D36/W37/T38.

Discussion

IL-12 and IL-23 are the key cytokines of the IL-12-type cytokine family and share main structural signatures. Both cytokines are composed of the β subunit p40, which mediates binding to the common IL-12R β 1. The specific receptors IL-12R β 2 and IL-23R bind to the α subunits p35 and p19, respectively (1). Interaction of p19/p35 and p40 is mediated by domains 2 and 3 of p40 indicating that these domains are dispensable for IL-12R β 1 interaction. Recently, crystal

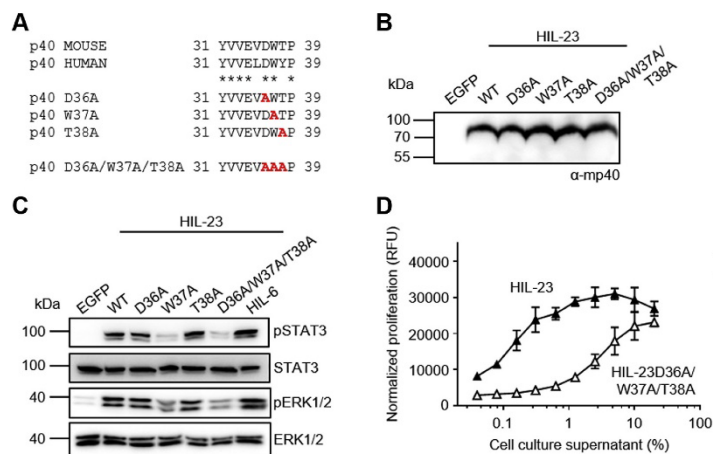


Figure 3. Alanine substitutions of p40 D36, W37 and T38 impaired HIL-23 activity. A, alignment of murine and human p40 N-terminal amino acids Y31 to P39. Single and triple substitutions within mp40 are highlighted in red. B, Western blot analysis of secreted murine HIL-23 variants from transfected CHO-K1 cells. Cytokine variants were transiently expressed with comparable efficiency. C, analysis of STAT3 and ERK1/2 activation. Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R cells were washed, starved, and stimulated with the indicated cytokines (10% conditioned cell culture supernatant of transfected CHO-K1 cells) for 30 min. Cellular lysates were prepared, and equal amounts of total protein (50 μ g/lane) were loaded on SDS-PAGE gels, followed by immunoblotting using specific antibodies for phospho-STAT3, STAT3, phospho-ERK1/2, and ERK1/2. Western blotting data show results of one representative experiment of three. D, cellular proliferation of Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R cells. The cells were cultured for 3 days in the presence of the indicated cytokines (0.04–20% conditioned cell culture supernatant of transfected CHO-K1 cells). The results of one representative experiment of four are shown. Error bars represent S.D. for technical replicates.

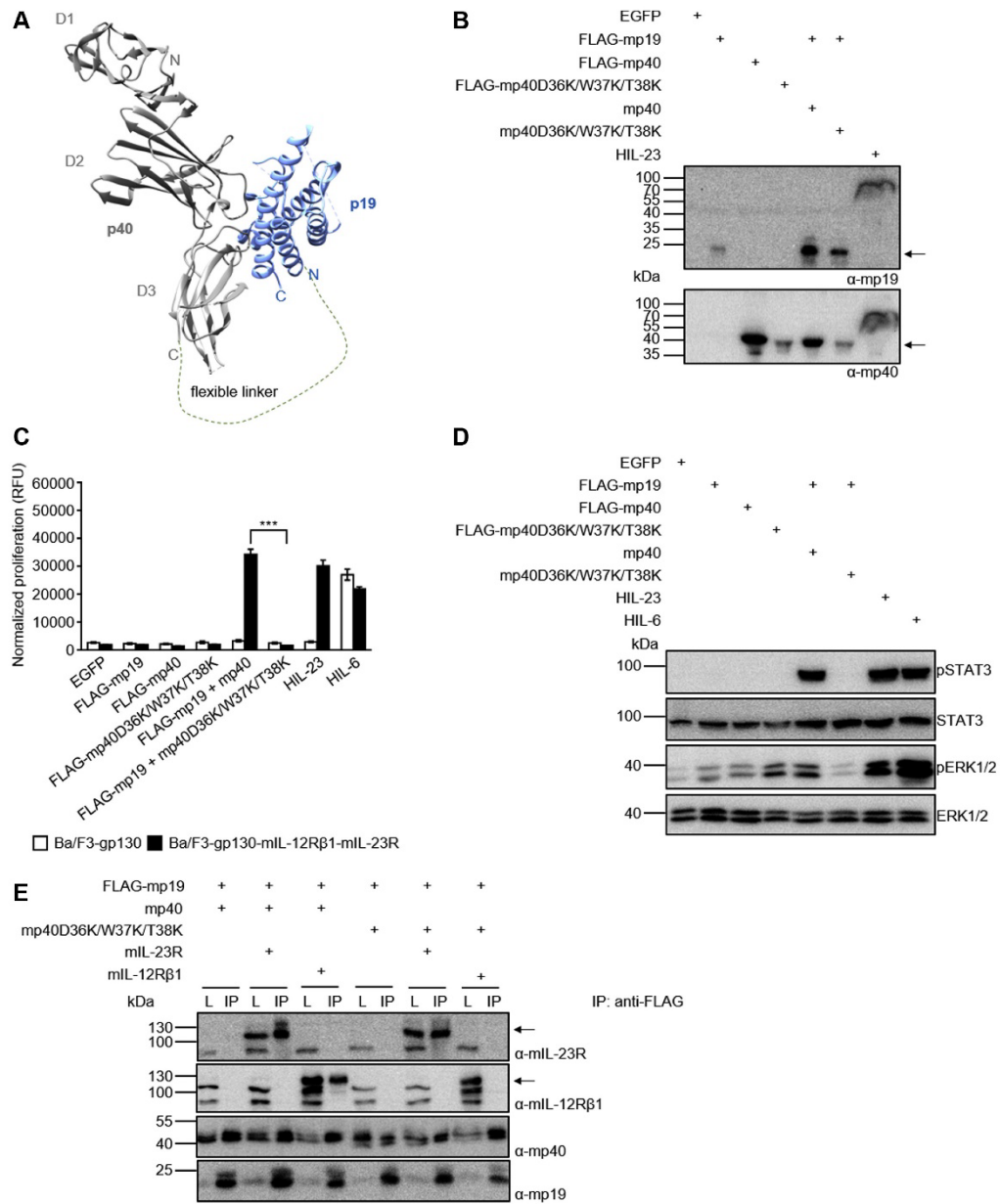
p40W37 substitution and site 2 interaction

Figure 4. Murine p40 with D36K/W37K/T38K substitutions interacts with murine p19 but not with murine IL-12Rβ1. A, structure of hIL-23 extracted from the structure of the IL-23:IL-23R complex structure (PDB 5mzv). A flexible linker sequence connecting p40 and p19 is indicated. B, Western blot analysis of secreted murine HIL-23, mp19 and mp40 variants from transfected CHO-K1 cells. The position of mp19 and mp40 variants is indicated by arrows. C, cellular proliferation of Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R cells. The cells were cultured for 3 days in the presence of 10 ng/ml HIL-6 or with the indicated cytokines (10% conditioned cell culture supernatant of transfected CHO-K1 cells). Parental Ba/F3-gp130 cells were used as controls. The results of one representative experiment of three are shown. Error bars represent S.D. for technical replicates. Statistical analysis used a one-way ANOVA, followed by Bonferroni correction (n = 3), ***p ≤ 0.001. D, analysis of STAT3 and ERK1/2 activation. Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R cells were washed, starved, and stimulated with the indicated cytokines (10% conditioned cell culture supernatant of transfected CHO-K1 cells) for 30 min. Cellular lysates were prepared,

p40W37 substitution and site 2 interaction

structure of the IL-23 receptor complex and cryo-EM maps of the complete IL-12 and IL-23 receptor complexes have been published (20). The shared p40 subunit directly interacts with IL-12R β 1 indicating a convergent function of p40 in mediating the assembly of IL-12 and IL-23 signaling complexes (20). The closely related IL-6 is a composite cytokine, which must interact with IL-6R before binding to gp130. In contrast to p40, IL-6R does not contribute to binding to gp130. However, the N-terminal region of gp130 is mandatory for interaction with IL-6 (21). Consequently, we analyzed the requirement of the N-terminus of p40 for binding to IL-12R β 1. Deletion of the first seven N-terminal amino acids (M23–D29) had no influence on the biological activity of hIL-23. However, deletion of adjacent p40 amino acids Y31 to T38 completely abolished IL-23 biological activity and binding to IL-12R β 1. This finding aligns with the structural data from Glassman and colleagues, where they hypothesized that the p40/IL-12R β 1 interface is formed by a charged loop and a hydrophobic strip on p40 due to the aromatic residues W37 and F82 (20). Furthermore, by deletion of amino acids Y31 to T38, we partially disrupted loop 1 in domain 1 of p40, which is important for binding of the IL-12/IL-23 cross-neutralizing monoclonal antibody Ustekinumab (18). Structural mapping of the p40 epitope of Ustekinumab showed interaction with some surface-exposed residues within the first three loops W37–M45, L62–L69, T76–Y88 of p40 domain 1. W37 was found to be the critical amino acid for the interaction of Ustekinumab with p40 (18). Based on these findings, we are able to pinpoint W37 and the surrounding amino acids D36 and T38 as hotspot amino acids for interaction with IL-12R β 1 via site 2. IL-12/IL-23 signaling and binding of p40 to IL-12R β 1 were diminished for p40W37K and completely abrogated for p40D36K/W37K/T38K. These amino acids are almost identical between mice (DWT) and men (DWY). Consequently, binding of murine and human p40 to IL-12R β 1 is largely identical in this area. For Ustekinumab, which binds to human but not to murine p40, at least 18 amino acids of p40 domain 1 mediate the binding interface (W37; D40; P42; G43; M45; L62; Q64; S65; E67; L69; I77; Q78; K80; E81; F82; G83; D84; Y88) (18). Amino acids of loop 2 (L62–L69) are largely different between mice and men (Fig. S1B), which may explain why Ustekinumab does not interact with murine p40. Mutational analysis showed that in particular M45, L62, S65, E67, E81, and D84 of the domain 1 are important residues within the binding epitope to Ustekinumab (18). In these studies, W37 has not been analyzed. This does, however, not necessarily mean that these amino acids (M45, L62, S65, E67, E81, and D84) are most critical for interaction with IL-12R β 1, because Ustekinumab may simply bind close to the p40/IL-12R β 1 interface and may block interaction by structural interference. Interestingly, the anti-human IL-23/IL-12 nanobody 22E11 interacts with

the N-terminal domain of human p40 and overlaps with the binding epitope of Ustekinumab (19). We confirmed the hypothesized aromatic W37 within p40 as a hotspot amino acid for interaction of p40 and IL-12R β 1 (20). In our studies, we did not mutate any other amino acids, which might be relevant for the interaction of IL-12R β 1 and p40. The goal of our study was to mutate one critical hotspot amino acid stretch to destroy interaction between p40 and IL-12R β 1 without hindering the interaction of p40:p40, p40:p19; p40:35 and the interaction of IL-12 and IL-23 with IL-12R β 2 and IL-23R, respectively. We are aware that introduction of amino acid exchanges may simply disrupt the overall configuration/folding within the mutated area and therefore, not directly involved in interaction with IL-12R β 1. However, we have good evidence supported by recently published structural data that the W37K variant switches the binding interface from binding into nonbinding mode. We show that p40 deletion and exchange variants are still secreted, soluble, correctly folded, and active in a way that enables binding to p19/p35 and, as a consequence, interaction with the second receptor chain IL-23R/IL-12R β 2. In conclusion, our study provides experimental evidence that W37 of p40 is responsible for direct interaction with IL-12R β 1 both in IL-12 and IL-23 and in the antagonistic p40 homodimer.

Experimental procedures

Cells and reagents

HEK293T (ACC-635) and CHO-K1 cells (ACC-110) were purchased from the Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Murine Ba/F3-gp130 cells transduced with mIL-12R β 1 and mIL-23R, or mIL-12R β 1 and mIL-12R β 2 were described previously (23, 24). All cell lines were grown in DMEM high-glucose culture medium (GIBCO, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% fetal calf serum (GIBCO, Thermo Fisher Scientific), 60 mg/l penicillin, and 100 mg/l streptomycin (Genaxxon bioscience GmbH) at 37 °C with 5% CO₂ in a water-saturated atmosphere. Proliferation of Ba/F3-gp130 cell lines was maintained by adding 0.2% of conditioned cell culture medium from a stable CHO-K1 clone secreting Hyper-IL-6 (final concentration 10 ng/ml as determined by ELISA). ExpiCHO-S and Expi293F cells were obtained from GIBCO (Thermo Fisher Scientific) and cultured according to manufacturer's standard protocol. Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7), STAT3 (124H6), phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr-202/Tyr-204) (D13.14.4E), and p44/42 MAPK (ERK1/2) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology. Peroxidase-conjugated secondary mAbs were obtained from Pierce (Thermo Fisher Scientific). Biotinylated mIL-23R (BAF1686), hIL-23R (BAF1400), mIL-12R β 1 (BAF1998), hIL-12R β 1 (BAF839), hIL-12R β 2 (BAF1959), mp40 (BAF499), mp35/

and equal amounts of total protein (50 μ g/lane) were loaded on SDS-PAGE gels, followed by immunoblotting using specific antibodies for phospho-STAT3, STAT3, phospho-ERK1/2, and ERK1/2. Western blotting data show results of one representative experiment of two. *E. coli* co-IP of FLAG-tagged murine mp19 coexpressed with either mp40 or mp40D36K/W37K/T38K and full-length mIL-12R β 1 or mIL-23R. The position of mIL-23R and mIL-12R β 1 is indicated by arrows. One of two independent experiments is shown.

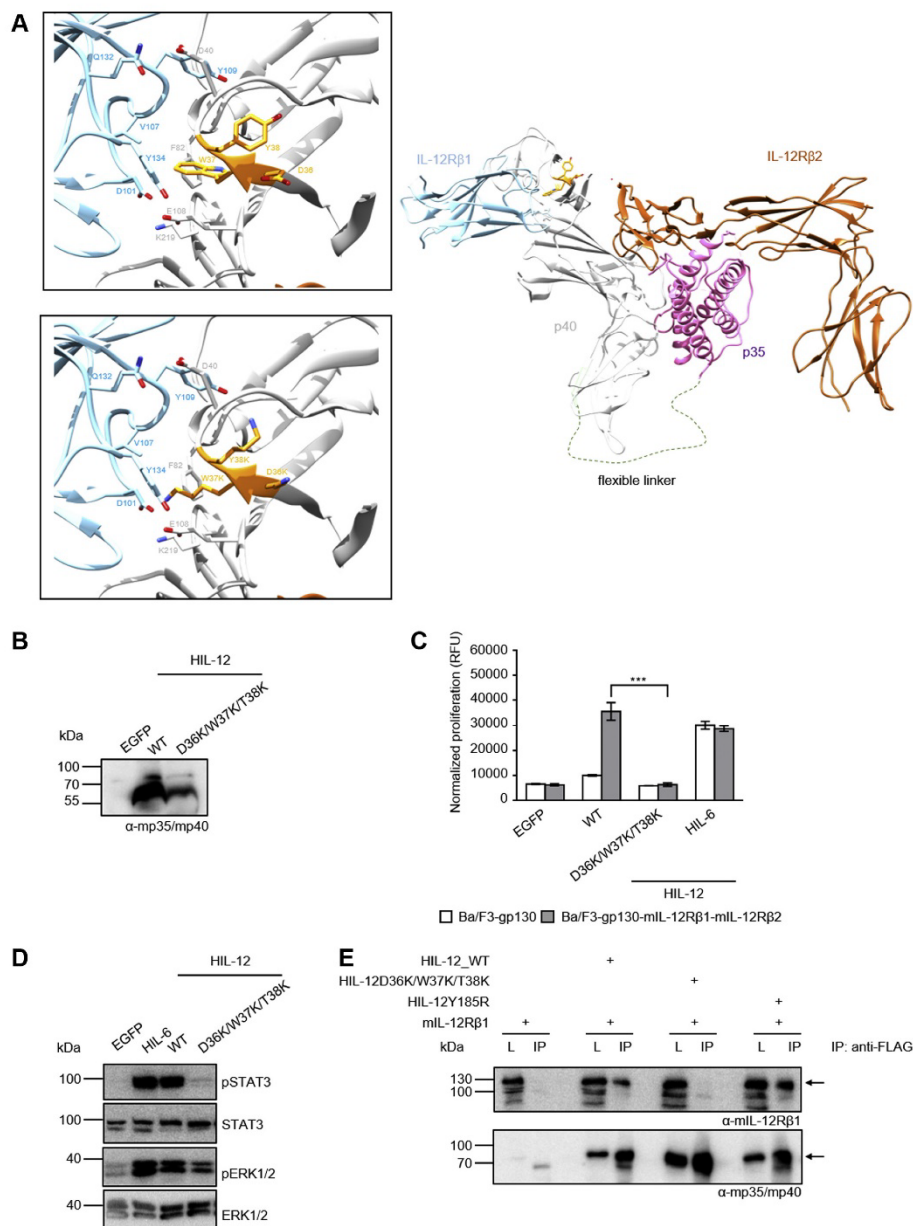
p40W37 substitution and site 2 interaction

Figure 5. Amino acid sequence D36/W37/T38 in murine p40 is critically involved in binding of murine IL-12 to IL-12Rβ1. A, model of the IL-12 signaling complex. A model of IL-12 (PDB 3HMX) in complex with models of IL-12Rβ1 and IL-12Rβ2 was generated based on the architecture of the IL-23:IL-23R:IL-12Rβ1 crystal structure (PDB 6WDQ). Insets show a zoomed in view on the area surrounding residues D36-Y38. Critical binding interface residues D36-Y38 of p40 are depicted in orange stick representation, IL-12Rβ1 and p40 residues in contact with D36-Y38 are displayed in stick representation. p40 mutations D36K, W37K, and Y38K were visualized in the second inset. B, Western blot analysis of secreted murine HIL-12 variants (wild-type, D36K/W37K/T38K) from transfected CHO-K1 cells. C, cellular proliferation of Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-12Rβ2 cells. The cells were cultured for 3 days in the presence of 10 ng/ml HIL-6 or with the indicated cytokines (10% conditioned cell culture supernatant of transfected CHO-K1 cells). Parental Ba/F3-gp130 cells were used as controls. The results of one representative experiment of three are shown. Error bars represent S.D. for technical replicates. Statistical analysis used a

p40W37 substitution and site 2 interaction

mp40 (BAF419), mp19 (BAF1619), hp40 (BAF219) mAbs, and streptavidin-HRP (DY998) were from R&D Systems. Recombinant mouse IL-23R-Fc chimera protein (1686-MR) and recombinant mouse IL-12R β 2-Fc chimera protein (7406-MR) were obtained from R&D Systems.

Cloning

Cloning of pcDNA3.1 expression vectors (Invitrogen) containing an N-terminal FLAG tag and a C-terminal His6 tag for murine Hyper-IL-23 (HIL-23), murine Hyper-IL-12 (HIL-12), murine p40 (FLAG-mp40), and murine p19 (FLAG-mp19) was described elsewhere (11, 23, 24). Standard cloning procedures were used for the generation of pcDNA3.1-mp40 and pcDNA3.1-FLAG-hp40. Mutations within murine/human p40, HIL-23, or HIL-12 were generated by PCR followed by DpnI digestion of methylated template DNA. Expression vectors with Twin-Strep-tag for purification of cytokines have been created by C-terminal insertion of coding sequence for WSHPQFEK-GGGSGGGSGG-SA-WSHPQFEK (Iba GmbH). Amino acids are numbered according to the database entry starting with the original signal peptide.

Generation of eukaryotic expression vectors p409 containing the cDNA encoding murine or human IL-23 receptors was described previously (23, 26). Cloning of mL-12R β 2 expression vector was described in (24).

Transfection of cells

CHO-K1 and HEK293T cells (2×10^6) were transiently transfected as indicated using TurboFect transfection reagent (Fermentas, Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. ExpiCHO-S and Expi293F cells were transfected according to the manufacturer's standard protocol (GIBCO, Thermo Fisher Scientific).

Cell viability assay

To remove the cytokines, Ba/F3-gp130 cell lines were washed three times with sterile PBS. 5×10^3 cells were suspended in DMEM supplemented with 10% FCS, 60 mg/l penicillin, and 100 mg/l streptomycin and cultured for 3 days in a final volume of 100 μ l with or without cytokines (applied as conditioned media from transfected CHO-K1 cells) as indicated. The CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Promega) was used to estimate viable cells by recording the fluorescence (excitation 560 nm, emission 590 nm) using the Infinite M200 PRO plate reader (Tecan) immediately after adding 20 μ l of reagent per well (time point 0) and up to 2 h after incubation under standard cell culture conditions. The fluorescent signal from the CellTiter-Blue Reagent is proportional to the number of viable cells. All values were measured in triplicates per

experiment. Fluorescence values were normalized by subtraction of time point 0 values. All experiments were performed at least two times, and one representative experiment was selected. Data are presented as means $\pm$ SD. For multiple comparisons, one-way ANOVA, followed by Bonferroni correction, was used (GraphPad Prism 6.0, GraphPad Software Inc). Statistical significance was set at the level of $p \leq 0.05$ (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

Stimulation assays

For analysis of STAT3 and ERK1/2 activation in Ba/F3-gp130 cell lines, cells were starved for at least 4 h in serum-free medium. This was followed by stimulation with cytokines as indicated. Subsequently, cells were harvested and lysed in 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM sodium vanadate, and 10 mM MgCl₂ supplemented with complete protease inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics). Protein concentration of cell lysates was determined by BCA protein assay (Pierce, Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Analysis of STAT3 and ERK1/2 activation was done by immunoblotting using 50 μ g proteins from total cell lysates and detection with phospho-STAT3 or phospho-ERK1/2 mAbs and STAT3 or ERK1/2 mAbs.

Coimmunoprecipitation (Co-IP)

For co-IP via ANTI-FLAG M2 affinity gel (Sigma Aldrich), transiently transfected HEK293T cells were lysed in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, and one complete protease inhibitor mixture tablet/50 ml buffer (Roche Diagnostics) supplemented with 1% Triton X-100 for 1 h on ice. Cytokine-containing lysates were mixed with those containing the full-length receptors. For negative control, cytokine variants were incubated without receptors and vice versa. In total, 30 μ l of ANTI-FLAG M2 affinity gel (Sigma Aldrich) was added and incubated overnight at 4 °C under gentle agitation. The samples were washed three times with the abovementioned buffer without 1% Triton X-100, and proteins were eluted by adding 50 μ l of 2.5 $\times$ Laemmli buffer, followed by incubation for 10 min at 95 °C. The resulting supernatants were subjected to Western blot analysis.

Western blotting

In total, 50 μ g of proteins from cell lysates or 20 μ l of conditioned cell culture supernatants were loaded per lane, separated by SDS-PAGE under reducing conditions, and transferred to PVDF membranes. The membranes were blocked in 5% fat-free dried skimmed milk in TBS-T (10 mM Tris HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Tween 20) and probed

one-way ANOVA, followed by Bonferroni correction ($n = 3$), *** $p \leq 0.001$. D, analysis of STAT3 and ERK1/2 activation. Ba/F3-gp130-mL-12R β 1-mL-12R β 2 cells were washed, starved, and stimulated with the indicated cytokines (10% conditioned cell culture supernatant of transfected CHO-K1 cells) for 30 min. Cellular lysates were prepared, and equal amounts of total protein (50 μ g/lane) were loaded on SDS-PAGE gels, followed by immunoblotting using specific antibodies for phospho-STAT3, STAT3, phospho-ERK1/2, and ERK1/2. Western blotting data show results of one representative experiment of three. E, co-IP of FLAG-tagged murine HIL-12 variants (wild-type, D36K/W37K/T38K, Y185R) and full-length mL-12R β 1. The position of mL-12R β 1 and HIL-12 variants is indicated by arrows. One of two independent experiments is shown.

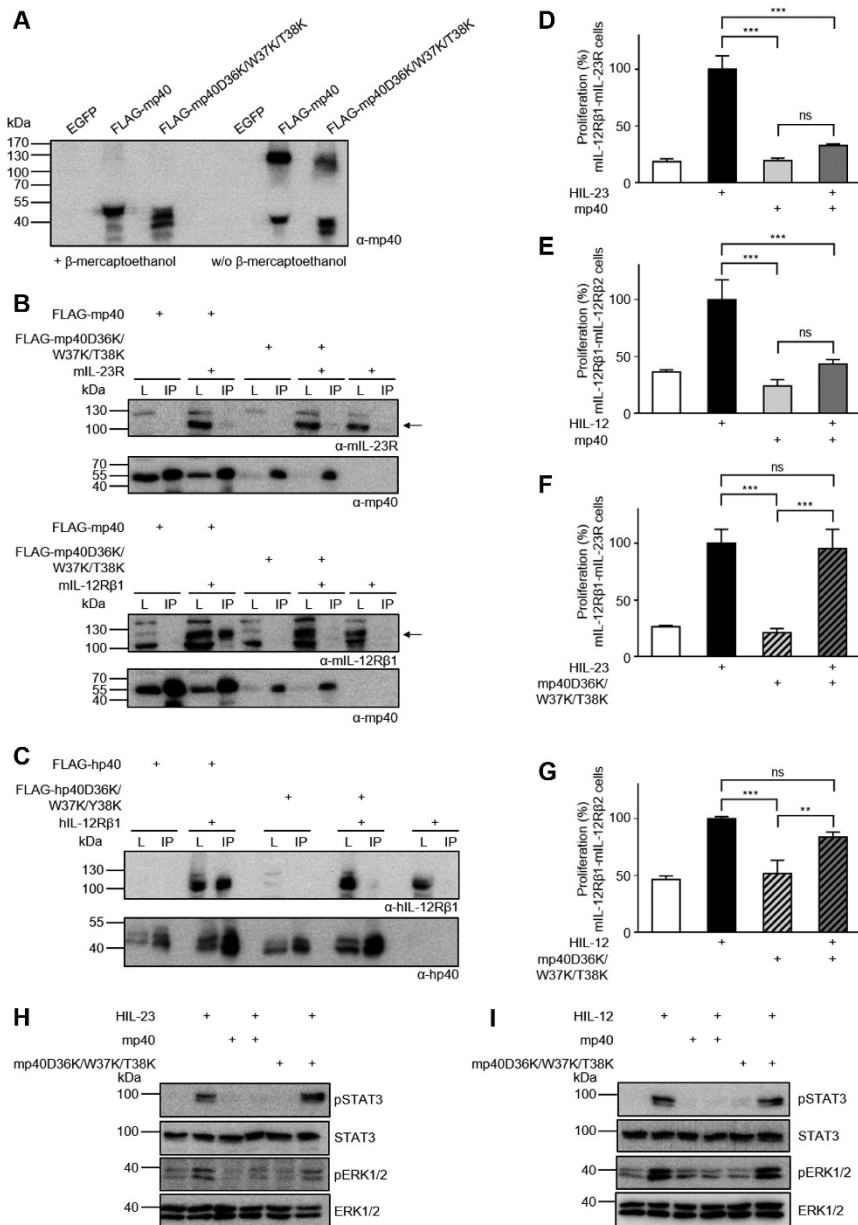
p40W37 substitution and site 2 interaction

Figure 6. Substitution of the amino acid sequence D36/W37/T38 diminished antagonistic properties of homodimeric p40. A, Western blot analysis of secreted mp40 and mp40D36K/W37K/T38K conditions. In total, 20 µl conditioned supernatant of transiently transfected CHO-K1 was separated by SDS-PAGE under (non-)reducing conditions, and proteins were visualized by Western blotting with a mp40-specific antibody. B, co-IP of FLAG-tagged murine p40 variants (wild-type, D36K/W37K/T38K) and full-length mIL-23R or mIL-12Rβ1. The position of mIL-23R and mIL-12Rβ1 is indicated by arrows. One of two independent experiments is shown. C, co-IP of FLAG-tagged human p40 variants (wild-type, D36K/W37K/Y38K) and full-length hIL-12Rβ1. One of two independent experiments is shown. D, cellular proliferation of Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R cells. The cells were cultured for 3 days in the presence of 7.5 ng/ml murine HIL-23 with or without 2 µg/ml mp40. The results of one representative experiment of two are shown. Error bars represent S.D. for technical replicates. Statistical analysis used a one-way ANOVA, followed by Bonferroni correction (n = 3), ***p ≤ 0.001, ns not significant. E, cellular

p40W37 substitution and site 2 interaction

with the indicated primary antibodies in 5% fat-free dried skimmed milk in TBS-T (STAT3 1:1000, ERK1/2 1:1000) or 5% BSA in TBS-T (pSTAT3 1:1000, pERK1/2 1:1000, mp40 1:1000, mp19 1:1000, mp35/mp40 1:1000, hp40 1:1000, mL-23R 1:1000, hIL-23R 1:1000, mL-12Rβ1 1:300, hIL-12Rβ1 1:300, hIL-12Rβ2 1:300) at 4 °C overnight. After washing, the membranes were incubated with secondary peroxidase-conjugated antibodies (1:5000) or streptavidin-HRP (1:200) diluted in 5% fat-free dried skimmed milk or BSA in TBS-T for 1 h at room temperature. The Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Chemicals GmbH) and the ChemoCam Imager (INTAS Science Imaging Instruments GmbH) were used for signal detection.

Protein purification

HmIL-12, HmIL-23, and mp40 variants were purified using Strep-TactinXT 4Flow columns according to the manufacturer's protocol (Iba GmbH, Göttingen). Elution was carried out by 50 mM biotin, which specifically competes for the biotin binding pocket. Buffer exchange to PBS was achieved using NAP-25 columns (GE Healthcare). Purified proteins have been analyzed by Coomassie brilliant blue staining.

Surface plasmon resonance (SPR)

For surface plasmon resonance experiments, a Biacore X100 instrument (Cytiva) was used. Analysis was performed in multi-cycle mode. Experiments were carried out at 25 °C in PBS pH 7.4, composed of 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM HPO_4^{2-} and H_2PO_4^- , and 0.05% (v/v) surfactant P20 (Cytiva). IL-23R-Fc and IL-12Rβ2-Fc variants were captured on a Protein A chip at a level of ~150 response units (RUs). HIL-12 or HIL-23 was injected at a flow rate of 30 µl/min at increasing concentrations (0.3–5 nM and 15–1000 nM, respectively). The association in each defined concentration was monitored in periods of 120 s, and the dissociation was measured in periods of 450 s. Final graphs were fitted using a 1:1 binding model.

Circular dichroism (CD) spectroscopy

Far-UV CD spectra were recorded on a Jasco J-715 spectropolarimeter from 196 to 320 nm with a 0.2 nm step size, 50 nm/min scan speed, and 2 nm bandwidth. Proteins (2.3–4.5 µM) in 0.5-fold PBS were measured by accumulation of ten scans per sample in 1 mm path-length quartz cuvettes at 25 °C. To calculate the mean residue ellipticity θ_{MRW} in deg ×

$\text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ the following formula was used: $\theta_{\text{MRW}} = (\theta_{\text{obs}} \times \text{MRW}) / (c \times d \times 10)$, where θ_{obs} observed ellipticity (in degrees); c, concentration (in g/ml); d, cell path length (in cm), MRW (mean residue weight), molecular weight divided by number of peptide bonds.

Modeling

IL-12Rβ2 domains D1 to D3 (UniProtKB - Q99665) and murine p40 (UniProtKB - P43432) were modeled using the Phyre2 web portal for protein modeling, prediction, and analysis (27). For modeling of the IL-12 signaling complex, a model of IL-12Rβ2 domains D1–D3 and the structure of hIL-12 (PDB 3HMX) were superpositioned using UCSF Chimera (28) onto the crystal structure of the IL-23:IL-23R:IL-12Rβ1 complex (6WDQ). To visualize the effect of p40D36K/W37K/Y38K mutation, these residues were mutated *in silico* using UCSF Chimera. Superpositioning of hp40 (PDB 5mzv) and a model of mp40 was done in UCSF Chimera.

Data availability

All data are contained within the article.

Supporting information—This article contains supporting information (18, 20).

Acknowledgments—Molecular graphics and analyses performed with UCSF Chimera, developed by the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, with support from NIH P41-GM103311. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

Author contributions—Jacqueline Georgy, Y. A., and M. O. formal analysis; Jacqueline Georgy, Y. A., and M. O. validation; Jacqueline Georgy, Y. A., and M. O. investigation; Jacqueline Georgy and J. S. writing—original draft; Jacqueline Georgy and D. M. F. writing—review and editing; J. M. M., H. T. W., L. G., D. W., Joachim Grötzinger, and F. T.-K. resources; J. M. M. and Joachim Grötzinger software; J. M. M. visualization; J. S. and D. M. F. conceptualization; J. S. funding acquisition; D. M. F. data curation; D. M. F. supervision; D. M. F. methodology; D. M. F. project administration.

Conflict of interest—The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article. All authors have read the manuscript and agreed to the final version.

proliferation of Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-12Rβ2 cells. The cells were cultured for 3 days in the presence of 5 ng/ml murine HIL-12 with or without 2 µg/ml mp40. The results of one representative experiment of three are shown. Error bars represent S.D. for technical replicates. Statistical analysis used a one-way ANOVA, followed by Bonferroni correction (n = 3), ***p ≤ 0.001, ns not significant. F, cellular proliferation of Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R cells. The cells were cultured for 3 days in the presence of 7.5 ng/ml murine HIL-23 with or without 2 µg/ml mp40D36K/W37K/T38K. The results of one representative experiment of two are shown. Error bars represent S.D. for technical replicates. Statistical analysis used a one-way ANOVA, followed by Bonferroni correction (n = 3), ***p ≤ 0.001, ns not significant. G, cellular proliferation of Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-12Rβ2 cells. The cells were cultured for 3 days in the presence of 5 ng/ml murine HIL-12 with or without 2 µg/ml mp40D36K/W37K/T38K. The results of one representative experiment of three are shown. Error bars represent S.D. for technical replicates. Statistical analysis used a one-way ANOVA, followed by Bonferroni correction (n = 3), ***p ≤ 0.001, **p ≤ 0.01, ns not significant. H and I, analysis of STAT3 and ERK1/2 activation. Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-23R or Ba/F3-gp130-mIL-12Rβ1-mIL-12Rβ2 cells were washed and starved for at least 4 h. One hour prior to stimulation 2 µg/ml mp40 or mp40D36K/W37K/T38K have been added. Cells were stimulated with the indicated cytokines (7.5 ng/ml HIL-23, 5 ng/ml HIL-12) for 30 min. Cellular lysates were prepared, and equal amounts of total protein (50 µg/lane) were loaded on SDS-PAGE gels, followed by immunoblotting using specific antibodies for phospho-STAT3, STAT3, phospho-ERK1/2, and ERK1/2. Western blotting data show results of one representative experiment of two.

p40W37 substitution and site 2 interaction

Abbreviations—The abbreviations used are: HIL-6, Hyper-IL-6; HIL-12, Hyper-IL-12; HIL-23, Hyper-IL-23; IL, interleukin; IL-12R β 1, interleukin 12 receptor β 1; IL-12R β 2, interleukin 12 receptor β 2; IL-23R, interleukin 23 receptor.

References

- Floss, D. M., Moll, J. M., and Scheller, J. (2020) IL-12 and IL-23-close relatives with structural homologies but distinct immunological functions. *Cells* **9**, 2184.
- Tait Wojno, E. D., Hunter, C. A., and Stumhofer, J. S. (2019) The immunobiology of the interleukin-12 family: Room for discovery. *Immunity* **50**, 851–870.
- Wolf, S. F., Temple, P. A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., and Hewick, R. M. (1991) Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J. Immunol.* **146**, 3074–3081.
- Gubler, U., Chua, A. O., Schoenhaut, D. S., Dwyer, C. M., McComas, W., Motyka, R., Nabavi, N., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M., Familletti, P. C., and Gately, M. K. (1991) Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 4143–4147.
- Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K. P., Vega, F., To, W., Wagner, J., O'Farrell, A. M., McClanahan, T., Zurawski, S., et al. (2002) 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.* **168**, 5699–5708.
- Jones, L. L., and Vignali, D. A. (2011) Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunol. Res.* **51**, 5–14.
- Vignali, D. A., and Kuchroo, V. K. (2012) IL-12 family cytokines: Immunological playmakers. *Nat. Immunol.* **13**, 722–728.
- Collison, L. W., Delgoffe, G. M., Guy, C. S., Vignali, K. M., Chaturvedi, V., Fairweather, D., Satoskar, A. R., Garcia, K. C., Hunter, C. A., Drake, C. G., Murray, P. J., and Vignali, D. A. (2012) The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nat. Immunol.* **13**, 290–299.
- Lupardus, P. J., and Garcia, K. C. (2008) The structure of interleukin-23 reveals the molecular basis of p40 subunit sharing with interleukin-12. *J. Mol. Biol.* **382**, 931–941.
- Jones, L. L., Chaturvedi, V., Uytendhoeve, C., Van Snick, J., and Vignali, D. A. (2012) Distinct subunit pairing criteria within the heterodimeric IL-12 cytokine family. *Mol. Immunol.* **51**, 234–244.
- Schröder, J., Moll, J. M., Baran, P., Grötzinger, J., Scheller, J., and Floss, D. M. (2015) 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.* **290**, 359–370.
- Bloch, Y., Bouchareychas, L., Merceron, R., Skladanowska, K., Van den Bossche, L., Detry, S., Govindarajan, S., Elewaut, D., Haerynck, F., Dullaers, M., Adamopoulos, I., and Savvides, S. (2018) 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* **48**, 45–58.
- Esch, A., Masiarz, A., Mossner, S., Moll, J. M., Grötzinger, J., Schröder, J., Scheller, J., and Floss, D. M. (2020) Deciphering site 3 interactions of interleukin 12 and interleukin 23 with their cognate murine and human receptors. *J. Biol. Chem.* **295**, 10478–10492.
- Mattner, F., Fischer, S., Guckes, S., Jin, S., Kaulen, H., Schmitt, E., Rude, E., and Germann, T. (1993) The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2202–2208.
- Gillessen, S., Carvajal, D., Ling, P., Podlaski, F. J., Stremlo, D. L., Familletti, P. C., Gubler, U., Presky, D. H., Stern, A. S., and Gately, M. K. (1995) Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: A potent IL-12 antagonist. *Eur. J. Immunol.* **25**, 200–206.
- Shimozato, O., Ugai, S., Chiyo, M., Takenobu, H., Nagakawa, H., Wada, A., Kawamura, K., Yamamoto, H., and Tagawa, M. (2006) The secreted form of the p40 subunit of interleukin (IL)-12 inhibits IL-23 functions and abrogates IL-23-mediated antitumor effects. *Immunology* **117**, 22–28.
- Mondal, S., Kundu, M., Jana, M., Roy, A., Rangasamy, S. B., Modi, K. K., Wallace, J., Albalawi, Y. A., Balabanov, R., and Pahan, K. (2020) 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.* **117**, 21557–21567.
- Luo, J., Wu, S. J., Lacy, E. R., Orlovsky, Y., Baker, A., Teplyakov, A., Obmolova, G., Heavner, G. A., Richter, H. T., and Benson, J. (2010) Structural basis for the dual recognition of IL-12 and IL-23 by ustekinumab. *J. Mol. Biol.* **402**, 797–812.
- Desmyter, A., Spinelli, S., Boutton, C., Saunders, M., Blachetot, C., de Haard, H., Denecker, G., Van Roy, M., Cambillau, C., and Rommelaere, H. (2017) Neutralization of human Interleukin 23 by multivalent nanobodies explained by the structure of cytokine-nanobody complex. *Front. Immunol.* **8**, 884.
- Glassman, C. R., Mathiharan, Y. K., Jude, K. M., Su, L., Panova, O., Lupardus, P. J., Spangler, J. B., Ely, I. K., Thomas, C., Skiniotis, G., and Garcia, K. C. (2021) Structural basis for IL-12 and IL-23 receptor sharing reveals a gateway for shaping actions on T versus NK cells. *Cell* **184**, 983–999.e924.
- Moritz, R. L., Ward, L. D., Tu, G. F., Fabri, L. J., Ji, H., Yasukawa, K., and Simpson, R. J. (1999) The N-terminus of gp130 is critical for the formation of the high-affinity interleukin-6 receptor complex. *Growth Factors* **16**, 265–278.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunt, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., et al. (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* **13**, 715–725.
- Floss, D. M., Mrotzek, S., Klöcker, T., Schröder, J., Grötzinger, J., Rose-John, S., and Scheller, J. (2013) Identification of canonical tyrosine-dependent and non-canonical tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor. *J. Biol. Chem.* **288**, 19386–19400.
- Floss, D. M., Klöcker, T., Schröder, J., Lamertz, L., Mrotzek, S., Strobl, B., Hermanns, H., and Scheller, J. (2016) Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor β 1 and interleukin 23 receptor to Janus kinases. *Mol. Biol. Cell* **27**, 2301–2316.
- Zou, J., Presky, D. H., Wu, C. Y., and Gubler, U. (1997) Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits β 1 and β 2 and JAK kinases. *J. Biol. Chem.* **272**, 6073–6077.
- Franke, M., Schröder, J., Monhasery, N., Ackfeld, T., Hummel, T. M., Rabe, B., Garbers, C., Becker-Pauly, C., Floss, D. M., and Scheller, J. (2016) Human and murine interleukin 23 receptors are novel substrates for a disintegrin and metalloproteases ADAM10 and ADAM17. *J. Biol. Chem.* **291**, 10551–10561.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., and Sternberg, M. J. (2015) The PyMol web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **10**, 845–858.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612.

3 Diskussion

IL-12 und IL-23 sind heterodimere Zytokine, die beide eine gemeinsame β -Untereinheit p40 besitzen, jedoch unterschiedliche Funktionen im Immunsystem aufweisen [2]. Während IL-12 wichtig für die Abwehr von intrazellulären Pathogenen und an der Tumorzellbekämpfung beteiligt ist [59], spielt IL-23 eine große Rolle für die Abwehr extrazellulärer Bakterien, Pilze und in der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten [56]. Daher sind IL-12 und IL-23 wichtige Angriffspunkte in der Antikörpertherapie [67]. Für zielgerichtete Therapien in der Medizin ist es wichtig, den genauen Aufbau des Zytokinrezeptorkomplexes zu kennen [4].

3.1 Die N-terminale Domäne von p40 ist wichtig für *site II*

Der Aufbau des Zytokinrezeptorkomplexes von IL-12 und IL-23 erfolgt nach dem *site I-II-III* Paradigma [34]. Dabei bindet p19 zunächst an p40 und bildet so *site I* [34]. *Site II* repräsentiert die Interaktion zwischen p40 und IL-12R β 1 und p19 interagiert über *site III* mit dem IL-23R [34]. Dieses *site I-II-III* Paradigma wurde von der IL-6 Familie abgeleitet, wobei *site II* von IL-12/IL-23 von dem klassischen Paradigma abweicht [28, 34]. Im IL-6 Zytokinrezeptorkomplex nimmt IL-6 eine zentrale Stellung ein und interagiert über *site I* mit dem IL-6R α , über *site II* mit der CHR von gp130 und über *site III* mit der Ig-ähnlichen Domäne des zweiten gp130 Rezeptors [38]. Auch IL-27 (p28/EBI3) (s. Abb. 1, Tabelle 1) folgt als Zytokin der IL-12 Familie dem klassischen *site I-II-III* Paradigma der IL-6 Familie [80-82]. Dabei interagiert p28 über *site I* mit EBI3, p28 über *site IIa* mit WSXWS *type I cytokine receptor* (WSX-1) und p28 über *site III* mit gp130 [80-82]. Die *site II* Interaktion wird durch die Bindung von EBI3 an WSX-1 stabilisiert (*site IIb*) [80-82]. Sowohl im Zytokinrezeptorkomplex von IL-6 als auch von IL-27 werden die N-terminalen Bereiche von gp130 bzw. WSX-1 zur Ausbildung der *site II* benötigt [39, 80-82].

2015 konnte Schröder *et al.* zeigen, dass die Deletionsvariante p40 Δ D3 in der Co-Immunopräzipitation IL-12R β 1 präzipitieren kann. Die Deletionsvariante p40 Δ D1 hingegen kann IL-12R β 1 nicht präzipitieren [34]. Es wurde daher vermutet, dass die kritischen Aminosäuren von *site II* im N-terminalen Bereich der Domäne 1 von p40 liegen. Anhand von Strukturanalyse durch Prof. Grötzinger wurden vier verschiedene Deletionsvarianten Δ M23-D29, Δ M23-E34, Δ M23-P39 und Δ Y31-T38 im murinen Hyper-IL-23 kloniert und exprimiert (s. Abb. A1). Alle Mutationen wurden in dem Hyperzytokin HIL-23 kloniert. Hyperzytokine sind Designerproteine, deren jeweiligen Zytokinuntereinheiten über einen flexiblen Linker verbunden sind [83]. Durch Verwendung von Hyperzytokinen wird u.a. verhindert, dass sich p40 Homodimere bilden, die antagonistische Eigenschaften haben können [84]. Außerdem wurde für Hyper IL-6, welches aus IL-6 und löslichem sIL-6R α besteht, gezeigt, dass im Vergleich zur Verwendung von IL-6 niedrigere Konzentrationen zur Stimulation notwendig sind [83]. Nach Transfektion in CHO-Zellen wurde der Zellkulturüberstand verwendet, um Ba/F3-gp130 Zellen mit den entsprechenden Rezeptoren funktionell zu analysieren. Die Zellen sind nur in der Lage, intrazelluläre Signalwege zu aktivieren und zu proliferieren, wenn die

Deletionsvarianten noch mit IL-12 β 1 interagieren. Die Analyse der Aktivierung der intrazellulären Signalwege wurde hinsichtlich des JAK-STAT-Weges und des MAPK-Weges durchgeführt. Die Deletionsvarianten wurden zudem mittels Co-Immunopräzipitation analysiert. Hierfür wurden die cDNAs der Deletionsvarianten, welche alle einen FLAG-Tag besitzen und die cDNAs von IL-12R β 1 in HEK293T-Zellen transfiziert. Nach Lyse der Zellen wurde das Lysat einer Deletionsvariante mit dem Lysat mit IL-12R β 1 gemischt. Durch Zugabe von FLAG-*Beads* binden die Deletionsvarianten durch den FLAG-Tag an diese. IL-12R β 1 kann nur durch die Deletionsvariante präzipitiert werden, wenn eine funktionelle *site II* ausgebildet wird.

Die Stimulation von Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen mit den Deletionsvarianten HIL-23 Δ M23-E34, Δ M23-P39 und Δ Y31-T38 zeigte keine Aktivierung der intrazellulären Signalwege und Proliferation [84]. Im Gegensatz dazu konnte durch Stimulation von Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen mit der Deletionsvariante HIL-23 Δ M23-D29 eine Proliferation der Zellen und Aktivierung der intrazellulären Signalwege induziert werden [84]. Dieses Ergebnis wurde mittels Co-Immunpräzipitation bestätigt [84]. Dabei konnte IL-12R β 1 nur durch die Deletionsvariante HIL-23 Δ M23-D29 präzipitiert werden [84]. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass durch Deletionen der Aminosäuren M23-E34, M23-P39 und Y31-T38 im murinen IL-23 die Ausbildung von *site II* inhibiert wird [84]. Die Deletion der Aminosäuren M23-D29 beeinträchtigt die *site II* Interaktion nicht [84]. Aufgrund der Daten wurde geschlussfolgert, dass der N-terminale Bereich von p40 wichtig für *site II* ist [84]. Die kritischen Aminosäuren liegen im Bereich von Y31-T38 von p40 [84]. Der monoklonale Antikörper Ustekinumab sowie der Nanobody Nb22E11 binden an die Domäne 1 von p40 und inhibieren so durch Inhibition von *site II* die Signaltransduktion von IL-23 [62, 67]. Durch Kristallisierung von IL-12 mit dem *antigen-binding fragment* (Fab) von Ustekinumab konnte das Epitop in p40 charakterisiert werden (s. Abb. A1) [67]. Dieses besteht aus drei Schleifen: W37-M45, L62-L69 und T76-Y88 [67]. Dieses Epitop überschneidet sich mit dem des Nanobody Nb22E11 [46]. Relevante Aminosäuren im Epitop in p40 für Nb22E11 sind D40, D63, F82, G83 und A85 [46]. Ustekinumab und Nb22E11 interagieren beide mit der N-terminalen Domäne von p40 [84]. Dies bestätigt unser Ergebnis, dass der N-terminale Bereich von p40 für *site II* relevant ist [84].

3.2 Tryptophan (W) 37 in p40 ist wichtig für die *site II* Interaktion

Um kritische Aminosäuren in dem Bereich zwischen Y31 und T38 von p40 identifizieren zu können, wurden nach Strukturanalysen durch Prof. Grötzinger die fünf Punktmutationen Y31E, E34K, D36K, W37K und T38K in p40 in murinem Hyper-IL-23 kloniert [84]. Die Punktmutationen wurden so gewählt, dass sich die Eigenschaften der Aminosäuren hinsichtlich ihrer Polarität, Ladung und Hydrophilität ändern [84].

Die Zytokine mit den Punktmutationen wurden mittels Ba/F3-gp130 Zellen mit den entsprechenden Rezeptoren funktionell analysiert. Die Stimulation von Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen mit der Mutante HIL-23 W37K wies eine signifikant verminderte

Zellproliferation im Vergleich zur Stimulation der Wildtyp-Variante und keine Aktivierung der intrazellulären Signalwege auf [84]. HIL-23 W37K kann nicht IL-12R β 1 präzipitieren [84]. Durch den Aminosäureaustausch von Y31E, E34K, D36K und T38K in p40 wurde weder die Proliferation von Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen noch die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen inhibiert [84]. Dies deutet darauf hin, dass Tryptophan 37 von p40 eine kritische Aminosäure für die *site II* Interaktion zwischen p40 und IL-12R β 1 ist [84].

Eine weitere Erklärung der fehlenden *site II* Interaktion der Mutante p40 W37K könnten die gegensätzlichen Eigenschaften des Aminosäurerestes Lysin im Vergleich zum Tryptophan sein [84]. Deshalb wurden folgende Mutanten in p40 kloniert: D36A, W37A und T38A [84]. Alanin gehört zu den neutralen Aminosäuren, welche ähnliche Eigenschaften aufweist wie Asparaginsäure (D), Tryptophan (W) und Threonin (T) im IL-23 Wildtyp [84]. Im Stimulationsassay, bei der Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen mit HIL-23 D36A und T38A stimuliert wurden, zeigte sich eine Aktivierung des JAK-STAT- und MAPK-Weges [84]. Nach Stimulation der gleichen Zelllinie mit HIL-23 W37A zeigte sich eine Verminderung der Signalaktivierung [84]. Dies bestätigt W37 in p40 als kritische Aminosäure für *site II* [84]. Eine Hypothese für W37 als kritische Aminosäure der *site II* Interaktion ist, dass es durch die Mutation von W37 zu einem Verlust der hydrophoben Interaktionen mit V107, L108 und Y134 in IL-12R β 1 kommen könnte (s. Abb. 6) [84].

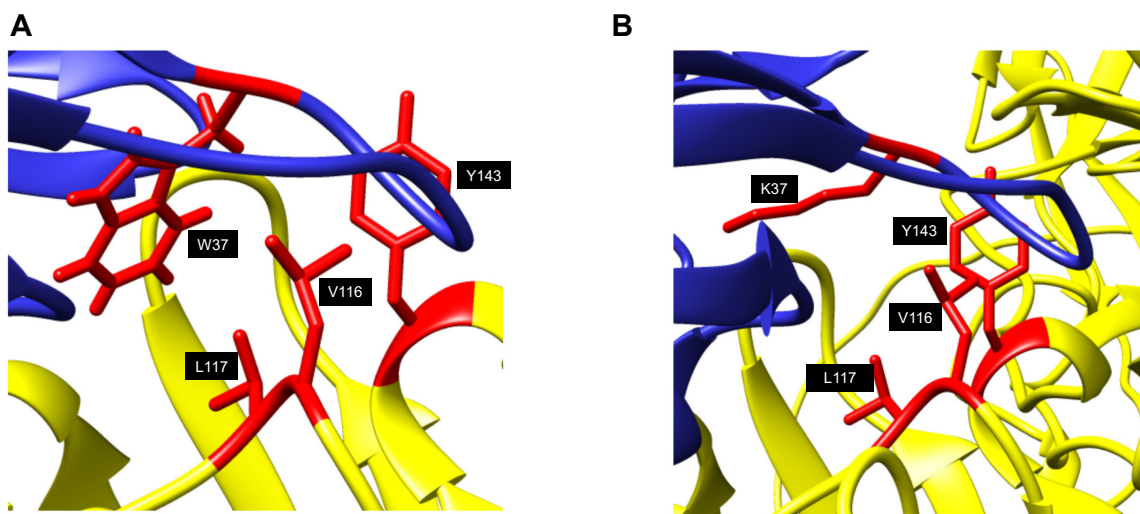


Abb. 6: Die Interaktionen der kritischen Aminosäure p40 W37 mit IL-12R β 1. Die Darstellung des murinen IL-23 Zytokinrezeptorkomplexes erfolgt auf Grundlage des humanen Zytokinrezeptorkomplexes PDB 6WDQ (<https://www.rcsb.org/>) mittels p19 AlphaFold Q9EQ14 (<https://www.uniprot.org/>), p40 PDB 6SFF (<https://www.rcsb.org/>), IL-12R β 1 AlphaFold Q60837 (<https://www.uniprot.org/>) und IL-23 AlphaFold Q8K4B4 (<https://www.uniprot.org/>). **A:** Die aromatische Aminosäure Tryptophan in p40 bildet hydrophobe Interaktionen mit L117, V116 und Y143 von IL-12R β 1 aus [84]. **B:** Durch Mutation von Tryptophan 37 von p40 in die positiv geladene Aminosäure Lysin können keine hydrophoben Interaktionen ausgebildet werden [84]. Modifiziert nach Georgy *et al.* [84]. Diese Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com und UCSF Chimera erstellt.

Glassman *et al.* charakterisierten für das humane IL-23 mittels *Cryo-Elektronenmikroskopie site II* und identifizierten ebenfalls W37 von p40 als kritische Aminosäure [42]. W37 ist eine konservierte Aminosäure, welche bei humanem p40 und murinem p40 zu finden ist (s. Abb.

A7). Zunächst wurde der Komplex aus IL-12R β 1 D1D2, IL-23 und der Ektodomäne von IL-23R kristallisiert und anschließend analysiert [42]. Es wurde beschrieben, dass die Basis der *site II* durch eine Interaktion zwischen einer positiv geladene Schleife in p40 H216, K217 und K219 und einem negativen Streifen in IL-12R β 1 E28, D58 und D101 gebildet wird [42]. Des Weiteren wird ein hydrophober Streifen in p40, der aus den Aminosäuren p40 W37 und p40 F82 besteht, von den polaren Aminosäuren Q102, S106, Y109, Q132 und Y134 in IL-12R β 1 umgeben [42]. Zwischen IL-12R β 1 und p40 werden auf diese Weise Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet [42].

Auch Ustekinumab bindet unter anderem an W37 in humanem p40 und inhibiert so die Signaltransduktion von IL-12 und IL-23 [67]. Durch Mutationsanalysen konnten Luo *et al.* zeigen, dass durch Mutationen der Aminosäuren E81 und D84 die Interaktion von p40 und Ustekinumab inhibiert wird und diese Aminosäuren somit wichtig für die Interaktion sind [67]. Im Rahmen dieser Mutationsanalyse wurde W37 nicht betrachtet [67]. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Ustekinumab nur in der Nähe der kritischen Aminosäuren von *site II* bindet und nicht direkt mit diesen interagiert [84]. Bei Antikörpern, die gegen IL-12R β 1 gerichtet sind (Patent WO20122045703A1, Novartis), konnte gezeigt werden, dass das Fab Fragment des Antikörpers an Domäne 3-5 von IL-12R β 1 bindet [45]. Diese sind nicht Teil von *site II* [45]. Die Inhibition erfolgt aufgrund einer sterischen Hinderung zwischen IL-12R β 1 und Domäne 3 von p40 [45].

3.3 p40 D36K/W37K/T38K führt zu einer inaktiven murinen HIL-23 Variante

Glassman *et al.* analysierten die beschriebenen kritischen Aminosäuren nicht näher bezüglich ihrer Funktionalität [42]. Für die *site I* und *III* wurden durch Mutation einzelner Aminosäuren inaktive IL-12 bzw. IL-23 Varianten generiert [34, 43]. Die Stimulation von Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen mit W37K in p40 führte nur zu einer verminderten Proliferation [84]. Deshalb sollte versucht werden, durch Kombination der Mutante W37K in p40 mit gezielten Mutationen der umliegenden Aminosäuren, eine inaktive IL-23 Variante zu generieren [84]. Es wurden drei Doppelmутanten und eine Trippelmutante kloniert und diese funktionell analysiert.

Bei der Stimulation von Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen mit D36K/W37K und W37K/T38K wurde eine ähnlich, signifikant reduzierte Proliferation, sowie fehlende Aktivierung der intrazellulären Signalwege wie nach Stimulation der Zellen mit HIL-23 W37K, nachgewiesen [84]. IL-12R β 1 wurde nicht durch die Mutanten D36K/W37K und W37K/T38K in HIL-23 präzipitiert [84]. Im Gegensatz dazu führt die Stimulation von Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen mit HIL-23 D36K/T38K zu keiner Verminderung der Proliferation der Zellen oder Inhibierung der intrazellulären Signalwege [84].

Dies bestätigt, dass W37 in p40 eine kritische Aminosäure für die *site II* Interaktion ist [84]. Allerdings konnte durch Klonierung von Doppelmутanten keine inaktive IL-23 Variante generiert werden [84]. Erst die Stimulation von Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen mit HIL-23 D36K/W37K/T38K führte zu einer, mit der Negativkontrolle vergleichbaren Proliferation und keiner Aktivierung der intrazellulären Signalwege [84]. Des Weiteren kann durch die

Tripplemutante HIL-23 D36K/W37K/T38K IL-12R β 1 nicht präzipitiert werden. Dies deutet darauf hin, dass durch eine Insertion der Tripplemutation D36K/W37K/T38K in murines Hyper-IL-23 eine inaktive IL-23 Zytokinvariante generiert werden konnte [84]. Da die fehlende *site II* Interaktion dieser Mutante auf die gegensätzlichen Eigenschaften der Aminosäurereste zurückgeführt werden könnte, wurden die Aminosäuren D36, W37 und T38 in die neutrale Aminosäure Alanin mutiert [84]. Die Stimulation von Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen mit HIL-23 D36A/W37A/T38A zeigt eine verringerte Proliferation und keine Aktivierung der intrazellulären Signalwege [84]. Dies bestätigt die Tripplemutante HIL-23 D36K/W37K/T38K als inaktive IL-23 Variante [84]. Die Mutationen wurden wie oben beschrieben in Hyperzytokinen kloniert. Um auszuschließen, dass sich durch den Peptidlinker der Hyperzytokine die räumliche Struktur der Zytokine im Vergleich zu dem *in vivo* vorkommenden Zytokin ändert, wurde die Mutationen D36K/W37K/T38K auch in das murine p40 Protein eingeführt [84]. Nach Co-Transfektion mit p19 wurden die Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen mit den konditionierten Zellkulturüberständen stimuliert [84]. Dabei zeigte sich eine vergleichbare Proliferation wie nach Stimulation mit der Negativkontrolle [84]. Zudem konnte keine Aktivierung der intrazellulären Signalwege gemessen werden [84]. In der Co-Immunpräzipitationsanalyse konnte IL-12R β 1 nicht durch p40 D36K/W37K/T38K präzipitiert werden [84]. Dies zeigt, dass die Verwendung des Hyperzytokins nicht die räumliche Struktur der *site II* Interaktion beeinflusst [84].

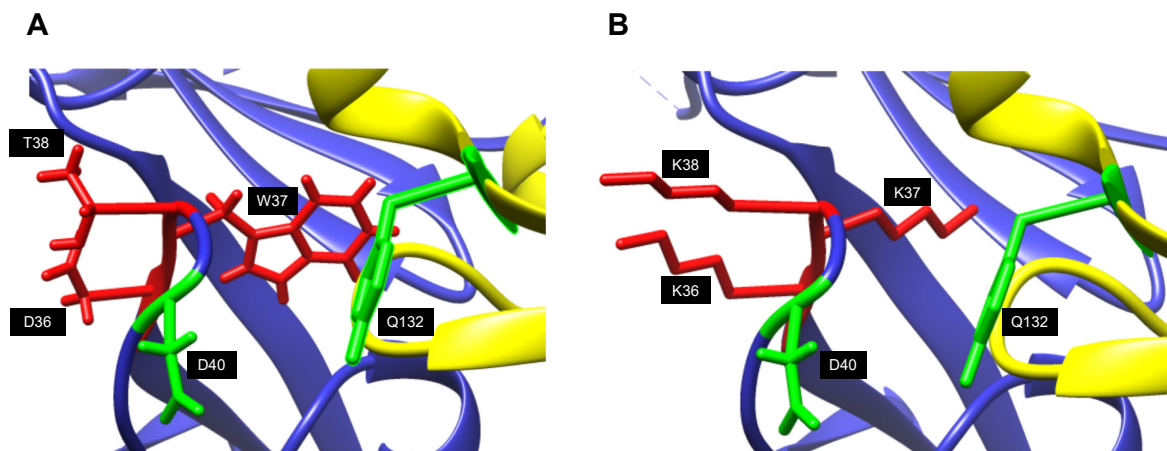


Abb. 7: Interaktionen in der Umgebung der kritischen Aminosäure p40 W37. Die Darstellung des murinen IL-23 Zytokinrezeptorkomplexes erfolgt auf Grundlage des humanen Zytokinrezeptorkomplexes PDB 6WDQ (<https://www.rcsb.org/>) mittels p19 AlphaFold Q9EQ14 (<https://www.uniprot.org/>), p40 PDB 6SFF (<https://www.rcsb.org/>), IL-12R β 1 AlphaFold Q60837 (<https://www.uniprot.org/>) und IL-23 AlphaFold Q8K4B4 (<https://www.uniprot.org/>). **A:** Dargestellt sind die Aminosäuren D36, W37 und T38 in rot. Im Wildtyp interagiert p40 D40 mit der kritischen Aminosäure Q132 in IL-12R β 1 (in grün dargestellt) [84]. **B:** Dargestellt sind die mutierten Aminosäuren D36K, W37K und T38K in rot. Die Aminosäuren D40 und Q132 entsprechen dem Wildtyp. Durch die Mutation von T38 in die positiv geladene Aminosäure Lysin konnte eine Salzbrücke mit der negativ geladene Aminosäure p40 D40 ausgebildet werden [84]. Dies schwächt die Interaktion zwischen D40 und Q132 ab [84]. Das Lysin in der Mutation D36K könnte die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung der Salzbrücke zwischen T38K und D40 erhöhen [84]. Abbildung modifiziert nach Georgy *et al.* [84]. Diese Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com und UCSF Chimera erstellt.

Durch Analyse des Strukturmodells des IL-23 Zytokinrezeptorkomplexes mittels UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) konnte eine Hypothese für die inaktive HIL-23 Variante durch Mutagenese der Aminosäuren D36, W37 und T38 gefunden werden [84]. Im Wildtyp interagieren die Aminosäuren D40 von der Untereinheit p40 mit der kritischen Aminosäure Q132 des IL-12R β 1 (s.

Abb. 7A) [84]. Durch die Mutation von p40 T38 in ein Lysin, welches positiv geladen ist, konnte so eine Salzbrücke mit der negativ geladene Aminosäure D40 von p40 ausgebildet werden [84]. Dies schwächt die Interaktion zwischen p40 D40 und IL-12R β 1 Q132 ab [84]. Es wird davon ausgegangen, dass das Lysin in der Mutation D36K die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung der Salzbrücke zwischen p40 T38K und p40 D40 erhöht (s.

Abb. 7B) [84].

3.4 p40 D36K/W37K/T38K führt zu einer funktionellen Inaktivierung von HIL-12

IL-12 und IL-23 sind strukturell miteinander verwandte Zytokine der IL-12 Familie [2]. Beide Zytokine besitzen u.a. die β -Untereinheit p40 und eine zytokinspezifische α -Untereinheit: IL-23p19 und IL-12p35 [2]. Der Aufbau des Zytokinrezeptorkomplexes von IL-12 und IL-23 folgt dem nicht-kanonischen *site I-II-III* Paradigma [34]. Glassman *et al.* zeigten durch Komplexierung von IL-12 mit IL-12R β 1 D1-D5 und IL-12R β 2 D1-D3, dass die mittels Cryo-EM bestimmte Struktur des IL-12 Zytokinrezeptorkomplexes mit der Struktur des IL-23 Zytokinrezeptorkomplexes übereinstimmt [42].

Die Trippelmutante D36K/W37K/T38K wurde in das murine Hyper-IL-12 kloniert und anschließend funktionell analysiert. Die Stimulation von Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-12R β 2 mit murinem Hyper-IL-12 D36K/W37K/T38K zeigte, dass die Trippelvariante weder die Proliferation noch die intrazellulären Signalwege induziert [84]. Außerdem ist IL-12 D36K/W37K/T38K nicht in der Lage, an IL-12R β 1 zu binden, da dieser nicht präzipitiert wurde [84]. Dies zeigt, dass auch im murinen IL-12 die Trippelmutation D36K/W37K/T38K eine Inaktivität des HIL-12 herbeiführt [84]. Eine mögliche Problematik durch die Mutation von Proteinen ist, dass sich ihre räumliche Struktur verändert. Um nachzuweisen, dass sich die Trippelmutante D36K/W37K/T38K in IL-12 und IL-23 nicht sonderlich von der Struktur des Wildtypen unterscheidet, wurde mittels CD-Spektroskopie gezeigt, dass die räumliche Struktur sehr ähnlich zu der des Wildtyps ist [84]. Des Weiteren wurde mittels *surface plasmon resonance* (SPR) Spektroskopie gezeigt, dass die Trippelmutante in IL-12 und IL-23 eine ähnliche Bindeaffinität wie die des Wildtyps für IL-12R β 2 beziehungsweise IL-23R aufweist [84]. Ein weiterer Hinweis auf die Wildtyp-ähnliche räumliche Struktur ist, dass die Mutanten in der Co-Immunopräzipitation den IL-23R bzw. den IL-12R β 2 präzipitieren können [84]. Dies zeigt, dass die Einführung der Mutation *site III* nicht beeinflusst [84]. Somit ist davon auszugehen, dass durch die Trippelmutation keine strukturellen Änderungen innerhalb des Proteins bewirkt werden [84].

3.5 p40 D36/W37/T38 ist für die Bindung von p80 an IL-12R β 1 wichtig

Die Untereinheit p40 kann nicht nur an die Untereinheiten p19 und p35 binden, sodass Heterodimere entstehen, sondern ist auch in der Lage, mit sich selbst Homodimere zu bilden, welche als p80 bezeichnet werden [74]. Es ist noch nicht klar, unter welchen Bedingungen p80 proinflammatorisch bzw. antiinflammatorisch wirkt [75, 79]. In Bindungsanalysen konnte gezeigt werden, dass p80 unter anderem mit hoher Affinität an Ba/F3-Zellen, die IL-12R β 1 exprimieren, bindet [76]. Die Bindungsaffinität von p80 an Ba/F3-Zellen, die IL-12R β 2 exprimieren, ist sehr niedrig [76]. Daher wurde vermutet, dass die Signaltransduktion von p80 über IL-12R β 1 erfolgt [76]. Allerdings ist IL-12R β 1 ein sogenannter Helferrezeptor, der eine Tyrosinkinase bindet, aber keine Tyrosinreste beinhaltet, die durch die Tyrosinkinase phosphoryliert werden können und anschließend STATs binden [48]. Im Zytokinrezeptorkomplex von IL-12 und IL-23 erfolgt die Signaltransduktion durch IL-12R β 2 und IL-23R [48], sodass unklar ist, wie die Signaltransduktion von p80 durch ein IL-12R β 1 Homodimer erfolgen soll. Ba/F3-Zellen, die nur den IL-12R β 1 exprimieren und mit IL-23 stimuliert wurden, proliferieren nicht [48]. Auch Ba/F3-gp130 Zellen, die den synthetischen IL-12R β 1 exprimierten und mit GFP, mCherry oder Kombinationsvarianten stimuliert werden, proliferieren ebenfalls nicht [77]. Es sollte analysiert werden, ob durch Einführung der Trippelmutation in p80 die Interaktion zwischen p80 und IL-12R β 1 inhibiert werden kann.

Homodimere von mp40 und der Trippelmutante wurden im Western Blot unter nicht reduzierenden Bedingungen nachgewiesen [84]. Dies lässt darauf schließen, dass die Mutationen die Homodimerisierung nicht beeinflussen [84]. Bei gleichzeitiger Stimulation der Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-12R β 2 beziehungsweise Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R mit mp40 und HIL-12 beziehungsweise HIL-23 zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellproliferation und Aktivierung der intrazellulären Signalwege [84]. Dies deutet darauf hin, dass unter unseren *in vitro* Bedingungen p80 die Signaltransduktion von IL-12 und IL-23 inhibiert [84]. Im Gegensatz dazu führt die gleichzeitige Stimulation von Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R beziehungsweise Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-12R β 2 Zellen mit der Trippelmutante p40 D36K/W37K/T38K und HIL-12 oder HIL-23 zu einer Proliferation und Aktivierung der intrazellulären Signalwege, welche ein ähnlich starkes Signal wie bei alleiniger Stimulation mit HIL-12 beziehungsweise HIL-23 zeigt [84]. Dies deutet daraufhin, dass p80 D36K/W37K/T38K nicht mit IL-12R β 1 interagieren kann und so nicht die Signaltransduktion von IL-12 und IL-23 inhibiert [84].

3.6 Struktureller Vergleich der site II innerhalb der IL-6/IL-12 Familie

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die kritische Rolle des Tryptophan 37 im IL-23 und IL-12 Zytokinrezeptorkomplex bestätigt [84]. Glassman *et al.* beschrieben im humanen IL-23 und IL-12 Zytokinrezeptorkomplex einen hydrophoben Streifen aus W37 und F82, der über Wasserstoffbrückenbindungen mit polaren Aminosäuren Q102, S106, Y109, Q132 und Y134 des IL-12R β 1 interagiert (s. Abb. 8A) [42]. Durch Kombination der Mutationen W37K mit den benachbarten Aminosäuren D36K und T38K konnte eine inaktive murine IL-23, IL-12 und p80

Variante generiert werden [84]. Die Ausbildung der *site II* wird durch den Verlust der Interaktion von p40 D40 mit IL-12R β 1 Q132 inhibiert [84]. Schröder *et al.* zeigten bereits, dass durch die Kombination der Mutationen V116E, L117E, S118E und Y134E in IL-12R β 1 die Ausbildung der *site II* verhindert wurde [34]. Dies bestätigt die Relevanz der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen p40 W37, F82 und IL-12R β 1 Q102, S106, Y109, Q132 und Y134 für die Funktionalität der *site II*.

Des Weiteren wurden weitere Interaktionen zwischen p40 und IL-12R β 1 im humanen Zytokinrezeptorkomplex wie zwischen den positiv geladenen Aminosäuren H216, K217 und K219 in p40 und den negativ geladenen Aminosäuren E28, D58 und D101 in IL-12R β 1 [42] und zwischen p40 E108 und IL-12R β 1 R54 beschrieben [40]. Diese kritischen Aminosäuren wurden nicht näher untersucht, da im Rahmen dieser Doktorarbeit der Fokus nicht auf der Analyse der Funktionalität aller kritischer Aminosäuren lag, sondern darauf, durch Punktmutation beziehungsweise Kombination dieser, eine Zerstörung von *site II* zu erreichen [84].

Die kritischen Aminosäuren p40 D36/W37/T38 der *site II* sind im humanen p40 konserviert (s. Abb. A7). Um *site II* im humanen IL-12 und IL-23 Zytokinrezeptorkomplex hinsichtlich der Relevanz von p40 D36/W37/T38 zu charakterisieren, müssten weitergehende funktionelle Analyse mittels Ba/F3-gp130, die die entsprechenden Rezeptoren exprimieren, durchgeführt werden. In vorherigen Arbeiten der AG Scheller wurde gezeigt, dass der humane IL-23R im Vergleich zum murinen IL-23R Homodimere bildet und durch HIL-23 stimuliert werden kann [85]. Dies führt dazu, dass eine Induktion der Proliferation nicht nur auf eine funktionelle *site II* Interaktion zurückzuführen wäre, sondern auch auf eine Homodimerisierung von IL-23R. Somit müsste zunächst eine Rezeptormutante generiert werden, die keine Homodimere bildet. Die IL-12 Familie besteht neben IL-12 und IL-23 aus den weiteren Mitgliedern IL-27, IL-35, IL-39 und IL-Y [6]. Dabei bestehen die Zytokine IL-12, IL-23 und IL-Y aus der β -Untereinheit p40, während IL-27, IL-35 und IL-39 die β -Untereinheit EBI3 besitzen (s. Tabelle 1) [6]. Einige der Zytokinrezeptorkomplexe der IL-6/IL-12 Familie sind aktuell noch nicht strukturell charakterisiert. Trotz der strukturellen Ähnlichkeiten unterscheidet sich der Aufbau des Zytokinrezeptorkomplexes von IL-6 und IL-12/IL-23 in der Struktur von *site II* [34]. Im Zytokinrezeptorkomplex von IL-6 nimmt IL-6 eine zentrale Rolle ein und bindet an IL-6R α (*site I*), gp130 (*site IIa*) und den zweiten gp130 Rezeptor (*site IIIa*) [36-38]. Die *site II* und *III* wird zusätzlich durch Bindung von dem IL-6R α an gp130 (*site IIb und IIIb*) stabilisiert [36-38]. Ein weiteres Mitglied der IL-6 Familie, IL-11, bindet wie IL-6, nach Interaktion mit seinem α -Rezeptor, IL-11R α , an ein gp130 Homodimer [86]. Im Gegensatz dazu bindet im Zytokinrezeptorkomplex von IL-12 und IL-23 p40, welche dem α -Rezeptor der IL-6 Familie entspricht, an IL-12R β 1 (*site II*). P19 oder p35 sind an dieser Interaktion nicht beteiligt [34].

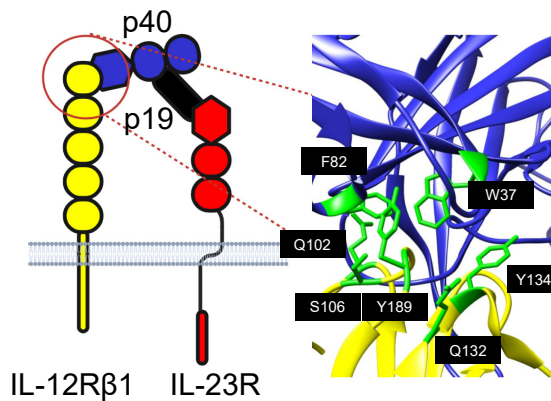
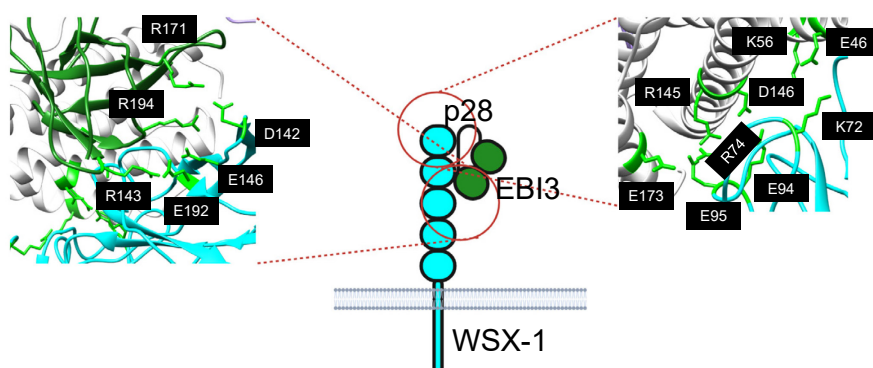
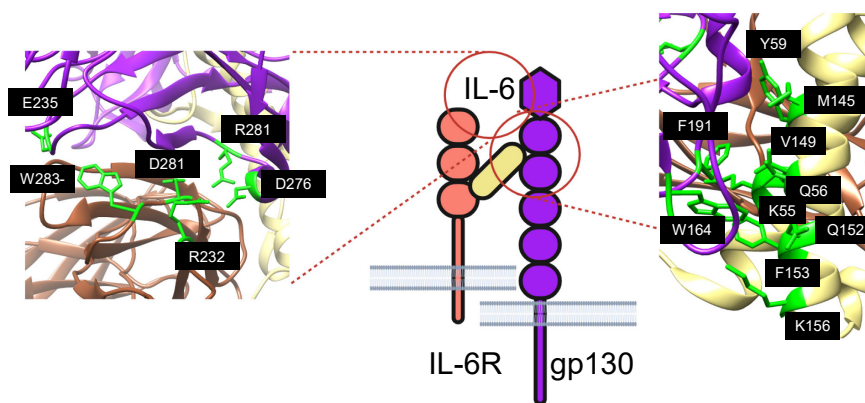
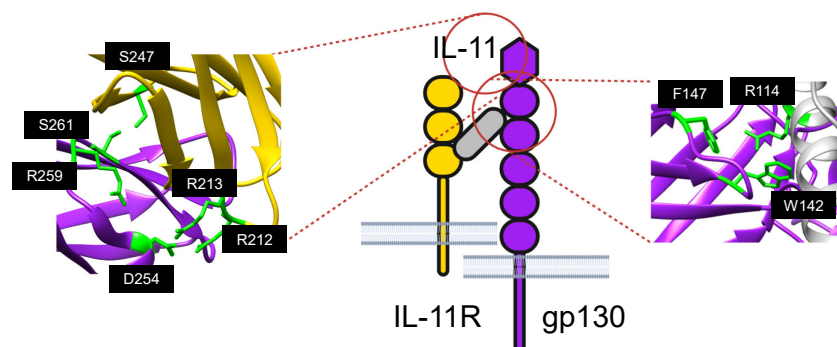
A**B****C****D**

Abb. 8: Struktureller Vergleich der *site II* in der IL-6/IL-12 Familie. **A:** Schematische Darstellung des humanen IL-23 Zytokinrezeptorkomplexes auf Grundlage von PDB 6WDQ (<https://www.rcsb.org/>) mit Hervorhebung der kritischen Aminosäuren von *site II*. Es interagieren p40 W37 und F82 mit IL-12R β 1 Q102, S106, Y109, Q132, Y134 [42]. Abbildung modifiziert nach Glassman *et al.* [42] **B:** Schematische Darstellung des humanen IL-27 Zytokinrezeptorkomplexes auf Grundlage von PDB 8D85 (<https://www.rcsb.org/>) sowie der kritischen Aminosäuren, die bei der *site II* Interaktion beteiligt sind. Die *site IIa* entsteht durch Interaktion von p28 E46, K56, R145, D146, E173 mit WSX-1 K72, R74, R94 und E95 [37]. Stabilisiert wird diese Interaktion durch Bindung von EBI3 R143, R171 und K194 an WSX-1 D142, E146 und E192 (*site IIb*) [37]. Abbildung modifiziert nach Zhou *et al.* [37]. **C:** Schematische Darstellung des humanen IL-6 Zytokinrezeptorkomplexes auf Grundlage von PDB 8D82 (<https://www.rcsb.org/>). Hervorgehoben sind die kritischen Aminosäuren von *site II*. Die Aminosäuren gp130 W164 und F191 bilden eine aromatische Tasche, mit der die Aminosäuren IL-6 Q56, Y59, K55 (Helix A) und Q152, K156, M145, V149, F153 (Helix C) interagieren (*site IIa*) [37]. Diese Interaktion wird durch die *site IIb* stabilisiert: Es binden IL-6R α R232, D281, W283 an gp130 E235, D276 und R281 [37]. Abbildung modifiziert nach Zhou *et al.* [37] **D:** Schematische Darstellung des humanen IL-11 Zytokinrezeptorkomplexes auf Grundlage von PDB 8DPS (<https://www.rcsb.org/>) mit Hervorhebung der kritischen Aminosäuren von *site II*. Am wichtigsten für die *site IIa* Interaktion ist die Bindung von IL-11 R114 an gp130 W142 und F147 [86]. Weitere beteiligte Aminosäuren sind gp130 W142-F147 und Y164-I172, die mit IL-11 R111, R114, R117 und R118 interagieren (nicht dargestellt) [86]. Diese Interaktion wird durch die *site IIb* stabilisiert: IL-11R α S247, R213, R212 bindet an gp130 S261, R259 und D254 [86]. Abbildung modifiziert nach Zhou *et al.* [37]. Diese Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com und UCSF Chimera erstellt.

Im Zytokinrezeptorkomplex von IL-6 und IL-11 erfolgt die *site IIa* Interaktion wie auch im Zytokinrezeptorkomplex von IL-12 und IL-23 durch hydrophobe Wechselwirkungen [37, 86]. Im humanen Zytokinrezeptorkomplex von IL-6 bilden die Aminosäuren gp130 W164 und F191 eine aromatische Tasche [37]. Diese entsprechen im humanem Zytokinrezeptorkomplex von IL-11 den kritischen Aminosäuren gp130 W142-F147 und Y164-I172 [86]. Die Aminosäurereste der aromatischen Tasche interagieren mit Helix A und C von IL-6 (Q56, Y59, K55, Q152, K156, M145, V149, F153) und IL-11 (R111, R114, R117, R118) (s. Abb. 8C, D). [37, 86]. Die *site IIb* Interaktion erfolgt im Zytokinrezeptorkomplex von IL-6 und IL-11 über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen IL-6R α R232, D281, W283 und gp130 E235, D276, R281 bzw. IL-11R α S247, R213, R212 und gp130 S261, R259, D254 (s. Abb. 8C, D) [37, 86]. IL-27 ist sowohl Mitglied der IL-12 als auch der IL-6 Familie. IL-27 besteht aus p28 und der β -Untereinheit EBI3 (s. Tabelle 1). Im Vergleich zu p40 fehlt in EBI3 die N-terminale Ig-Domäne, die für die besondere *site II* im IL-12 und IL-23 Zytokinrezeptorkomplex benötigt wird [42]. Deshalb wurde vermutet, dass der Aufbau von *site II* im IL-27 Zytokinrezeptorkomplex dem des IL-6 Zytokinrezeptorkomplexes ähnlich ist [42]. Dies konnte im murinen [81, 82] und humanen [37, 80] IL-27 Zytokinrezeptorkomplex mittels Cryo-Elektronenmikroskopie, SPR-Analyse und *bio-layer interferometry* (BLI) gezeigt werden. Die *site II* Interaktion des Zytokinrezeptorkomplexes von IL-27 basiert ähnlich wie in der IL-6 Familie auf der Interaktion zwischen p28 und WSX-1 [37]. Es erfolgt zusätzlich eine Stabilisierung durch die *site IIb* Interaktion zwischen EBI3 und WSX-1 [37]. Für die *site IIa* Interaktion interagieren die A und C-Helix von p28 mit den N-terminalen FnIII Domänen von WSX-1 [37, 80, 81]. Diese Interaktion basiert anders als im Zytokinrezeptorkomplex von IL-6 und IL-11 auf Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken [80, 81]. Es binden p28 E46, K56, R145, D146, E173 an WSX-1 K72, R74, R94, E95 [37]. Im murinen IL-27 Zytokinrezeptorkomplex konnte gezeigt werden, dass eine hydrophobe Wechselwirkung eine zentrale Rolle von *site IIa*

einnimmt [81]. p28 Y48 ragt in die Tasche aus folgenden aromatischen Aminosäuren in WSX-1: P153, P152 und W151 (s. Abb. 8B) [81]. Der kritische Aminosäurerest Tyrosin Y48 ist im IL-6 konserviert: Y31 [38, 81]. Zusätzlich wird *site IIa* durch die Bindung der D2 von EBI3 an die D2 von WSX-1 stabilisiert (*site IIb*) [82]. *Site IIb* basiert vor allem auf elektrostatischen Wechselwirkungen wie in der IL-6 Familie [37]. Dabei interagieren die positiv geladenen Aminosäuren R143, R171, K194 in EBI3 mit den negativ geladenen Aminosäuren D142, E146 und E192 in WSX-1 (s. Abb. 8B) [81]. Der Aufbau des IL-27 Zytokinrezeptorkomplexes ähnelt dem IL-6 Zytokinrezeptorkomplex [38, 80-82]. *Site II* im IL-12/IL-23 Zytokinrezeptorkomplex ist also in der IL-6/IL-12 Familie einzigartig [34, 42, 84]. Durch den heterodimeren Aufbau der weiteren Zytokine wird wahrscheinlich der Aufbau des Zytokinrezeptorkomplexes von IL-12 dem Aufbau des Zytokinrezeptorkomplexes von IL-12/IL-23 ähneln und der Aufbau des Zytokinrezeptorkomplexes von IL-35 und IL-39 dem Aufbau des Zytokinrezeptorkomplexes von IL-6, IL-11 und IL-27 ähneln. Dies müsste nach weiteren Analysen hinsichtlich des *in vivo* und *in vitro* Vorkommens dieser Zytokine genauer untersucht werden [1].

3.7 Klinische Relevanz der charakterisierten *site II* von p40

Unsere Erkenntnisse könnten einen neuen Ansatzpunkt für neue Antikörperstrategien darstellen. Aktuell gibt es verschiedene Möglichkeiten, um die IL-23 Zytokinrezeptorkomplexbildung und dessen Signaltransduktion zu inhibieren (s. Abschnitt 1.5.1) [61].

Anti-p19 Antikörper werden bevorzugt verwendet, da nur IL-23 inhibiert wird und diese effektiver sind [62]. Dies könnte daran liegen, dass IL-12 normalerweise die IL-17 Produktion supprimiert [65]. Durch die Inhibition von IL-12 wirkt dies der Inhibition von IL-23 entgegen [65]. Außerdem kann die Inhibition von IL-12 zu Nebenwirkungen wie schweren Infektionen führen [62]. Zur möglichst spezifischen Weiterentwicklung von möglichen therapeutischen Strategien gegen Autoimmunerkrankungen, bei denen IL-23 involviert ist, sind also vor allem die genauen Kenntnisse von *site III* von Bedeutung.

Glassman *et al.* zeigten, dass die Kenntnisse über den strukturellen Aufbau von *site II* auch für die Tumorthherapie verwendet werden können [42]. IL-12 fördert durch Aktivierung von T-Zellen und NK-Zellen die Immunantwort gegen Tumorzellen [59]. Würde IL-12 systemisch verabreicht werden, würden sich starke Nebenwirkungen durch eine starke IFN- γ Produktion ergeben [73]. Glassman *et al.* entwickelten partielle Agonisten von IL-12 durch Generierung und Kombination von Alaninmutationen von E81, F82, K106, K217 [42]. Diese binden mit höherer Affinität an CD8⁺-T-Zellen als an NK-Zellen. Die Kombination der Mutanten E81A/F82A und E81A/F82A/K106A zeigte eine Verträglichkeit im Mausmodell [42].

Die therapeutischen Möglichkeiten werden sich in Zukunft durch immer genauere strukturelle Kenntnisse der IL-6/IL-12-Familie weiterentwickeln können.

4 Literaturverzeichnis

1. Abdi, K. (2002) IL-12: The role of p40 versus p75. *Scandinavian Journal of Immunology* 56: 1-11
2. Floss, D. M., Moll, J. M., and Scheller, J. (2020) IL-12 and IL-23-Close Relatives with Structural Homologies but Distinct Immunological Functions. *Cells* 9: 2814
3. Tait Wojno, E. D., Hunter, C. A., and Stumhofer, J. S. (2019) The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery. *Immunity* 50: 851-870
4. Floss, D. M., and Scheller, J. (2019) Naturally occurring and synthetic constitutive-active cytokine receptors in disease and therapy. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 47: 1-20
5. Rose-John, S., Scheller, J., and Schaper, F. (2015) "Family reunion"-A structured view on the composition of the receptor complexes of interleukin-6-type and interleukin-12-type cytokines. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 26: 471-474
6. Floss, D. M., Moll, J. M., and Scheller, J. (2020) IL-12 and IL-23-Close Relatives with Structural Homologies but Distinct Immunological Functions. *Cells* 9: 2184
7. Gubler, U., Chua, A. O., Schoenhaut, D. S., Dwyer, C. M., McComas, W., Motyka, R., Nabavi, N., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M., and Familletti, P. C. (1991) Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 88: 4143-4147
8. Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S. C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., and Trinchieri, G. (1989) Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 170: 827-845
9. Schoenhaut, D. S., Chua, A. O., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M., Dwyer, C. M., McComas, W., Familletti, P. C., Gately, M. K., and Gubler, U. (1992) Cloning and expression of murine IL-12. *Journal of Immunology* 148: 3433-3440
10. Stern, A. S., Podlaski, F. J., Hulmes, J. D., Pan, Y. C., Quinn, P. M., Wolitzky, A. G., Familletti, P. C., Stremlo, D. L., Truitt, T., and Chizzonite, R. (1990) Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 87: 6808-6812
11. Wolf, S. F., Temple, P. A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., and Hewick, R. M. (1991) Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *Journal of Immunology* 146: 3074-3081
12. Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J. S., Moore, K. W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J. F., and Kastelein, R. A. (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13: 715-725
13. Pflanz, S., Timans, J. C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Wagner, J. L., To, W., Zurawski, S., McClanahan, T. K., Gorman, D. M., Bazan, J. F., de Waal Malefyt, R., Rennick, D., and Kastelein, R. A. (2002) IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4⁺ T cells. *Immunity* 16: 779-790
14. Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S., and Vignali, D. A. (2007) The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450: 566-569

15. Devergne, O., Birkenbach, M., and Kieff, E. (1997) Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94: 12041-12046
16. Bridgewood, C., Alase, A., Watad, A., Wittmann, M., Cuthbert, R., and McGonagle, D. (2019) The IL-23p19/EBI3 heterodimeric cytokine termed IL-39 remains a theoretical cytokine in man. *Inflammation Research* 68: 423-426
17. Ramnath, D., Tunny, K., Hohenhaus, D. M., Pitts, C. M., Bergot, A. S., Hogarth, P. M., Hamilton, J. A., Kapetanovic, R., Sturm, R. A., Scholz, G. M., and Sweet, M. J. (2015) TLR3 drives IRF6-dependent IL-23p19 expression and p19/EBI3 heterodimer formation in keratinocytes. *Immunology and Cell Biology* 93: 771-779
18. Wang, X., Wei, Y., Xiao, H., Liu, X., Zhang, Y., Han, G., Chen, G., Hou, C., Ma, N., Shen, B., Li, Y., Egwuagu, C. E., and Wang, R. (2016) A novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in Lupus-like mice. *European Journal of Immunology* 46: 1343-1350
19. Flores, R. R., Kim, E., Zhou, L., Yang, C., Zhao, J., Gambotto, A., and Robbins, P. D. (2015) IL-Y, a synthetic member of the IL-12 cytokine family, suppresses the development of type 1 diabetes in NOD mice. *European Journal of Immunology* 45: 3114-3125
20. Wang, R. X., Yu, C. R., Mahdi, R. M., and Egwuagu, C. E. (2012) Novel IL27p28/IL12p40 cytokine suppressed experimental autoimmune uveitis by inhibiting autoreactive Th1/Th17 cells and promoting expansion of regulatory T cells. *Journal of Biological Chemistry* 287: 36012-36021
21. Hildenbrand, K., Aschenbrenner, I., Franke, F. C., Devergne, O., and Feige, M. J. (2022) Biogenesis and engineering of interleukin 12 family cytokines. *Trends in Biochemical Sciences* 47: 936-949
22. Ecoeur, F., Weiss, J., Schleege, S., and Guntermann, C. (2020) Lack of evidence for expression and function of IL-39 in human immune cells. *Public Library of Science ONE* 15: e0242329
23. Nussrat, S. W., and Ad'hiah, A. H. (2023) Interleukin-39 is a novel cytokine associated with type 2 diabetes mellitus and positively correlated with body mass index. *Endocrinology, Diabetes and Metabolism* 6: e409
24. Presky, D. H., Yang, H., Minetti, L. J., Chua, A. O., Nabavi, N., Wu, C. Y., Gately, M. K., and Gubler, U. (1996) A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93: 14002-14007
25. Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K. P., Vega, F., To, W., Wagner, J., O'Farrell, A. M., McClanahan, T., Zurawski, S., Hannum, C., Gorman, D., Rennick, D. M., Kastelein, R. A., de Waal Malefyt, R., and Moore, K. W. (2002) A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *Journal of Immunology* 168: 5699-5708
26. Pflanz, S., Hibbert, L., Mattson, J., Rosales, R., Vaisberg, E., Bazan, J. F., Phillips, J. H., McClanahan, T. K., de Waal Malefyt, R., and Kastelein, R. A. (2004) WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *Journal of Immunology* 172: 2225-2231
27. Collison, L. W., Delgoffe, G. M., Guy, C. S., Vignali, K. M., Chaturvedi, V., Fairweather, D., Satoskar, A. R., Garcia, K. C., Hunter, C. A., Drake, C. G., Murray, P. J., and Vignali, D. A. (2012) The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nature Immunology* 13: 290-299
28. Lupardus, P. J., and Garcia, K. C. (2008) The structure of interleukin-23 reveals the molecular basis of p40 subunit sharing with interleukin-12. *Journal of Molecular Biology* 382: 931-941

29. Yoon, C., Johnston, S. C., Tang, J., Stahl, M., Tobin, J. F., and Somers, W. S. (2000) Charged residues dominate a unique interlocking topography in the heterodimeric cytokine interleukin-12. *EMBO Journal* 19: 3530-3541
30. Hasegawa, H., Mizoguchi, I., Chiba, Y., Ohashi, M., Xu, M., and Yoshimoto, T. (2016) Expanding Diversity in Molecular Structures and Functions of the IL-6/IL-12 Heterodimeric Cytokine Family. *Frontiers in Immunology* 7: 479
31. Chua, A. O., Chizzonite, R., Desai, B. B., Truitt, T. P., Nunes, P., Minetti, L. J., Warrier, R. R., Presky, D. H., Levine, J. F., and Gately, M. K. (1994) Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *Journal of Immunology* 153: 128-136
32. Grotzinger, J. (2002) Molecular mechanisms of cytokine receptor activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1592: 215-223
33. Jones, L. L., and Vignali, D. A. (2011) Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Journal of Immunology Research* 51: 5-14
34. Schroder, J., Moll, J. M., Baran, P., Grotzinger, J., Scheller, J., and Floss, D. M. (2015) Non-canonical interleukin 23 receptor complex assembly: p40 protein recruits interleukin 12 receptor beta1 via site II and induces p19/interleukin 23 receptor interaction via site III. *Journal of Biological Chemistry* 290: 359-370
35. de Vos, A. M., Ultsch, M., and Kossiakoff, A. A. (1992) Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255: 306-312
36. Scheller, J., Ettich, J., Wittich, C., Pudewell, S., Floss, D. M., and Rafii, P. (2024) Exploring the landscape of synthetic IL-6-type cytokines. *FEBS Journal* 291: 2030-2050
37. Zhou, Y., Stevis, P. E., Cao, J., Saitome, K., Wu, J., Glatman Zaretsky, A., Haxhinasto, S., Yancopoulos, G. D., Murphy, A. J., Sleeman, M. W., Olson, W. C., and Franklin, M. C. (2023) Structural insights into the assembly of gp130 family cytokine signaling complexes. *Science Advances* 9: eade4395
38. Boulanger, M. J., Chow, D. C., Brevnova, E. E., and Garcia, K. C. (2003) Hexameric structure and assembly of the Interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* 300: 2101-2104
39. Moritz, R. L., Ward, L. D., Tu, G. F., Fabri, L. J., Ji, H., Yasukawa, K., and Simpson, R. J. (1999) The N-terminus of gp130 is critical for the formation of the high-affinity interleukin-6 receptor complex. *Growth Factors* 16: 265-278
40. Scheller, J., Berg, A., Moll, J. M., Floss, D. M., and Jungesblut, C. (2021) Current status and relevance of single nucleotide polymorphisms in IL-6-/IL-12-type cytokine receptors. *Cytokine* 148: 155550
41. Langrish, C. L., McKenzie, B. S., Wilson, N. J., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R. A., and Cua, D. J. (2004) IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunological Reviews* 202: 96-105
42. Glassman, C. R., Mathiharan, Y. K., Jude, K. M., Su, L., Panova, O., Lupardus, P. J., Spangler, J. B., Ely, L. K., Thomas, C., Skiniotis, G., and Garcia, K. C. (2021) Structural basis for IL-12 and IL-23 receptor sharing reveals a gateway for shaping actions on T versus NK cells. *Cell* 184: 983-999 e924
43. Esch, A., Masiarz, A., Mossner, S., Moll, J. M., Grotzinger, J., Schroder, J., Scheller, J., and Floss, D. M. (2020) Deciphering site 3 interactions of interleukin 12 and interleukin 23 with their cognate murine and human receptors. *Journal of Biological Chemistry* 295: 10478-10492
44. Jones, L. L., Chaturvedi, V., Uyttenhove, C., Van Snick, J., and Vignali, D. A. (2012) Distinct subunit pairing criteria within the heterodimeric IL-12 cytokine family. *Molecular Immunology* 51: 234-244

45. Bloch, Y., Felix, J., Merceron, R., Provost, M., Symakani, R. A., De Backer, R., Lambert, E., Mehdipour, A. R., and Savvides, S. N. (2024) Structures of complete extracellular receptor assemblies mediated by IL-12 and IL-23. *Nature Structural & Molecular Biology* 31: 591-597
46. Bloch, Y., Bouchareychas, L., Merceron, R., Skladanowska, K., Van den Bossche, L., Detry, S., Govindarajan, S., Elewaut, D., Haerynck, F., Dullaers, M., Adamopoulos, I. E., and Savvides, S. N. (2018) Structural activation of pro-inflammatory human cytokine IL-23 by cognate IL-23 receptor enables recruitment of the shared receptor IL-12Rbeta1. *Immunity* 48: 45-58 e46
47. Pastor-Fernandez, G., Mariblanca, I. R., and Navarro, M. N. (2020) Decoding IL-23 Signaling Cascade for New Therapeutic Opportunities. *Cells* 9: 2044
48. Floss, D. M., Klocker, T., Schroder, J., Lamertz, L., Mrotzek, S., Strobl, B., Hermanns, H., and Scheller, J. (2016) Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor beta1 and interleukin 23 receptor to Janus kinases. *Molecular Biology of the Cell* 27: 2301-2316
49. Stark, G. R., and Darnell, J. E., Jr. (2012) The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* 36: 503-514
50. Villarino, A. V., Kanno, Y., and O'Shea, J. J. (2017) Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. *Nature Immunology* 18: 374-384
51. Ortmann, R. A., Cheng, T., Visconti, R., Frucht, D. M., and O'Shea, J. J. (2000) Janus kinases and signal transducers and activators of transcription: their roles in cytokine signaling, development and immunoregulation. *Arthritis Research & Therapy* 2: 16-32
52. Hacker, H., and Karin, M. (2006) Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* 2006: re13
53. Ismail, H., Kang, B. H., Kim, J. S., Lee, J. H., Choi, I. W., Cha, G. H., Yuk, J. M., and Lee, Y. H. (2017) IL-12 and IL-23 Production in Toxoplasma gondii- or LPS-Treated Jurkat T Cells via PI3K and MAPK Signaling Pathways. *Korean Journal of Parasitology* 55: 613-622
54. Floss, D. M., Mrotzek, S., Klocker, T., Schroder, J., Grotzinger, J., Rose-John, S., and Scheller, J. (2013) Identification of canonical tyrosine-dependent and non-canonical tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor. *Journal of Biological Chemistry* 288: 19386-19400
55. Parkin, J., and Cohen, B. (2001) An overview of the immune system. *Lancet* 357: 1777-1789
56. Di Cesare, A., Di Meglio, P., and Nestle, F. O. (2009) The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 129: 1339-1350
57. Colombo, M. P., and Trinchieri, G. (2002) Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 13: 155-168
58. Szabo, S. J., Dighe, A. S., Gubler, U., and Murphy, K. M. (1997) Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *Journal of Experimental Medicine* 185: 817-824
59. Trinchieri, G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews: Immunology* 3: 133-146
60. Ivanov, I., Zhou, L., and Littman, D. R. (2007) Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Seminars in Immunology* 19: 409-417
61. Floss, D. M., Schroder, J., Franke, M., and Scheller, J. (2015) Insights into IL-23 biology: From structure to function. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 26: 569-578
62. Desmyter, A., Spinelli, S., Boutton, C., Saunders, M., Blachetot, C., de Haard, H., Denecker, G., Van Roy, M., Cambillau, C., and Rommelaere, H. (2017) Neutralization of human interleukin 23 by multivalent nanobodies explained by the structure of cytokine-nanobody complex. *Frontiers in Immunology* 8: 884

63. Liste, G., (2023), Ein unerwartetes Ende für Brazikumab, Gelbe Liste, 24.06.2024, <https://www.gelbe-liste.de/gastroenterologie/ende-brazikumab>
64. Noviello, D., Mager, R., Roda, G., Borroni, R. G., Fiorino, G., and Vetrano, S. (2021) The IL23-IL17 Immune Axis in the Treatment of Ulcerative Colitis: Successes, Defeats, and Ongoing Challenges. *Frontiers in Immunology* 12: 611256
65. Zhou, L., Wang, Y., Wan, Q., Wu, F., Barbon, J., Dunstan, R., Gauld, S., Konrad, M., Leys, L., McCarthy, R., Namovic, M., Nelson, C., Overmeyer, G., Perron, D., Su, Z., Wang, L., Westmoreland, S., Zhang, J., Zhu, R., and Veldman, G. (2021) A non-clinical comparative study of IL-23 antibodies in psoriasis. *MAbs* 13: 1964420
66. Korta, A., Kula, J., and Gomulka, K. (2023) The Role of IL-23 in the Pathogenesis and Therapy of Inflammatory Bowel Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 10172
67. Luo, J., Wu, S. J., Lacy, E. R., Orlovsky, Y., Baker, A., Teplyakov, A., Obmolova, G., Heavner, G. A., Richter, H. T., and Benson, J. (2010) Structural basis for the dual recognition of IL-12 and IL-23 by ustekinumab. *Journal of Molecular Biology* 402: 797-812
68. European Medicines Agency, (1995), Medicines, EMA, 20.01.2024, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines>
69. Food and Drug Administration, (1996), Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs, FDA, 20.01.2024, <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/about-drugsfda>
70. Parigi, T. L., Iacucci, M., and Ghosh, S. (2022) Blockade of IL-23: What is in the Pipeline? *Journal of Crohn's and Colitis* 16: ii64-ii72
71. Wang, Y., Fan, Z., Shao, L., Kong, X., Hou, X., Tian, D., Sun, Y., Xiao, Y., and Yu, L. (2016) Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications. *International Journal of Nanomedicine* 11: 3287-3303
72. Keam, S. J. (2023) Ozoralizumab: First Approval. *Drugs* 83: 87-92
73. Belladonna, M. L., and Grohmann, U. (2013) Bioengineering heterodimeric cytokines: turning promiscuous proteins into therapeutic agents. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 29: 149-174
74. Ling, P., Gately, M. K., Gubler, U., Stern, A. S., Lin, P., Hollfelder, K., Su, C., Pan, Y. C., and Hakimi, J. (1995) Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *Journal of Immunology* 154: 116-127
75. Heinzl, F. P., Hujer, A. M., Ahmed, F. N., and Rerko, R. M. (1997) In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers. *Journal of Immunology* 158: 4381-4388
76. Wang, X., Wilkinson, V. L., Podlaski, F. J., Wu, C., Stern, A. S., Presky, D. H., and Magram, J. (1999) Characterization of mouse interleukin-12 p40 homodimer binding to the interleukin-12 receptor subunits. *European Journal of Immunology* 29: 2007-2013
77. Engelowski, E., Schneider, A., Franke, M., Xu, H., Clemen, R., Lang, A., Baran, P., Binsch, C., Knebel, B., Al-Hasani, H., Moll, J. M., Floss, D. M., Lang, P. A., and Scheller, J. (2018) Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands. *Nature Communications* 9: 2034
78. Gillessen, S., Carvajal, D., Ling, P., Podlaski, F. J., Stremlo, D. L., Familletti, P. C., Gubler, U., Presky, D. H., Stern, A. S., and Gately, M. K. (1995) Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *European Journal of Immunology* 25: 200-206
79. Pahan, K., Sheikh, F. G., Liu, X., Hilger, S., McKinney, M., and Petro, T. M. (2001) Induction of nitric-oxide synthase and activation of NF-kappaB by interleukin-12 p40 in microglial cells. *Journal of Biological Chemistry* 276: 7899-7905
80. Caveney, N. A., Glassman, C. R., Jude, K. M., Tsutsumi, N., and Garcia, K. C. (2022) Structure of the IL-27 quaternary receptor signaling complex. *Elife* 11: e78463
81. Jin, Y., Fyfe, P. K., Gardner, S., Wilmes, S., Bubeck, D., and Moraga, I. (2022) Structural insights into the assembly and activation of the IL-27 signaling complex. *EMBO Reports* 23: e55450

82. Skladanowska, K., Bloch, Y., Strand, J., White, K. F., Hua, J., Aldridge, D., Welin, M., Logan, D. T., Soete, A., Merceron, R., Murphy, C., Provost, M., Bazan, J. F., Hunter, C. A., Hill, J. A., and Savvides, S. N. (2022) Structural basis of activation and antagonism of receptor signaling mediated by interleukin-27. *Cell Reports* 41: 111490
83. Rakemann, T., Niehof, M., Kubicka, S., Fischer, M., Manns, M. P., Rose-John, S., and Trautwein, C. (1999) The designer cytokine hyper-interleukin-6 is a potent activator of STAT3-dependent gene transcription in vivo and in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 274: 1257-1266
84. Georgy, J., Arlt, Y., Moll, J. M., Ouzin, M., Weitz, H. T., Gremer, L., Willbold, D., Grotzinger, J., Thives-Kurenbach, F., Scheller, J., and Floss, D. M. (2021) Tryptophan (W) at position 37 of murine IL-12/IL-23 p40 is mandatory for binding to IL-12Rbeta1 and subsequent signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* 297: 101295
85. Hummel, T. M., Ackfeld, T., Schonberg, M., Ciupka, G., Schulz, F., Oberdoerster, A., Grotzinger, J., Scheller, J., and Floss, D. M. (2017) Synthetic Deletion of the Interleukin 23 Receptor (IL-23R) Stalk Region Led to Autonomous IL-23R Homodimerization and Activation. *Molecular and Cellular Biology* 37: e00014-00017
86. Metcalfe, R. D., Hanssen, E., Fung, K. Y., Aizel, K., Kosasih, C. C., Zlatic, C. O., Doughty, L., Morton, C. J., Leis, A. P., Parker, M. W., Gooley, P. R., Putoczki, T. L., and Griffin, M. D. W. (2023) Structures of the interleukin 11 signalling complex reveal gp130 dynamics and the inhibitory mechanism of a cytokine variant. *Nature Communications* 14: 7543
87. Jones, S. A., and Jenkins, B. J. (2018) Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nature Reviews Immunology* 18: 773-789

5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Übersicht über die Zytokine der IL-12 Familie und deren Rezeptoren.....	2
Abb. 2:	Überblick über die Entwicklung des <i>site I-II-III</i> Paradigmas.....	5
Abb. 3:	Strukturmodell des humanen IL-23 Zytokinrezeptorkomplexes.....	6
Abb. 4:	Differenzierung von naiven CD4 ⁺ -T-Zellen zu T _H 1-Zellen und T _H 17-Zellen.....	10
Abb. 5:	IL-12 und IL-23 in aktuellen Therapiestrategien.....	11
Abb. 6:	Die Interaktionen der kritischen Aminosäure p40 W37 mit IL-12Rβ1.....	18
Abb. 7:	Interaktionen in der Umgebung der kritischen Aminosäure p40 W37.....	20
Abb. 8:	Struktureller Vergleich der <i>site II</i> in der IL-6/IL-12 Familie.....	25
Abb. A1:	Vergleich der Aminosäuresequenz von murinen und humanen p40.....	36
Abb. A2:	Vergleich der Aminosäuresequenz von murinen und humanen p35.....	37
Abb. A3:	Vergleich der Aminosäuresequenz von murinen und humanen p19.....	38
Abb. A4:	Vergleich der Aminosäuresequenz von murinen und humanen IL-12Rβ1.....	39
Abb. A5:	Vergleich der Aminosäuresequenz von murinen und humanen IL-12Rβ2.....	40
Abb. A6:	Vergleich der Aminosäuresequenz von murinen und humanen IL-23R.....	41
Abb. A7:	Vergleich der Aminosäuresequenzen von p40 von verschiedenen Spezies.....	42

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Mitglieder der IL-12 Familie..... 1

Tabelle A1: Übersicht über ausgewählte Zytokinrezeptorkomplexe der IL-6 Familie. 43

7 Anhang

7.1 *Alignments*

Nachfolgend sind die *Alignments* von den Zytokinuntereinheiten und Rezeptoren von humanem und murinem IL-12 und IL-23 dargestellt. Diese wurden mittels uniprot erstellt (<https://www.uniprot.org/>).

ANHANG

		AM23-D29 AY31-T38 W37			
sp P43432 IL12B_MOUSE	MCPQKLTIISWFAIVLLVSLPMA	HWLEKDVYVVEVDWTPD	APGETVNLCTDTP	PEEDDITW 60	
sp P29460 IL12B_HUMAN	MCHQQLVISWFSVLVFLASPLVAIWELKKDDYVVLVDWY	PDAPGEMVILTC	DPTEEDGITW 60		
		*** *:***** *:***** *:***** ** ***** ** ***** **			
		E81 F82 P39 D40 Loop 1 (W38-M46)			
sp P43432 IL12B_MOUSE	TSDQRHGVIGSGKTLTITVKE	FLDAGQYTC	HKGGTLSHSLLLHKKENG	IWSTELKNF 120	
sp P29460 IL12B_HUMAN	TLDQSSEVLGSGKTLTIQVKE	EFGDAGQYTC	HKGGEVLSHSLLLHKKEDG	IWSTDILKDQ 120	
		* ** *:***** ***** ***** ***** ***** ***** *****			
		Loop 2 (L62-L69) Loop 3 (T76-Y88)			
sp P43432 IL12B_MOUSE	---KNKTFCLKCEAPN	YSGRFTCSWL	VQRNMDLKFN	IKSSSSSPDSRAVTC	GMAASLAEKV 177
sp P29460 IL12B_HUMAN	KEPKNKTFLRCEAKN	YSGRFTCWWL	TTISTDLTF	SVKSSRGSSDPQGVTC	GAATLSAERV 180
		***** ** ***** ** . ** *. :*** . * * : ***** *:***** *			
sp P43432 IL12B_MOUSE	TLDQRDYEKYSVSCQ	EDVTCPTAEETLPIELALEAR	QNKYENYSTSFF	IRDIIPDP	PPK 237
sp P29460 IL12B_HUMAN	RGDNKEYE-YSVBCQ	EDSACPAAEESLPIE	VMDAVHKLK	YENYSTSFFIRDIIPDP	PPK 239
		*::** *** ***** **:***** ***** *:***** ***** *****			
		H216 K217K219			
sp P43432 IL12B_MOUSE	NLQMKPLKNS-QVEVSW	EYPDSWSTPHS	YFSLKFFVRI	QRKKEKMKETE	EGCNQKGAFIV 296
sp P29460 IL12B_HUMAN	NLQLKPLKNSRQVEVSW	EYPDWTWSTPHS	YFSLTFCVQV	QGKSKREK-----	DRVFT 291
		*** ***** ***** ***** ***** ** *: * *.:: * : . . .			
sp P43432 IL12B_MOUSE	EKTSTEVQC-KGGNV	CVQAQDRY	YNSSSCSKWACV	PCRVR	35
sp P29460 IL12B_HUMAN	DKTSATVICRKNASIS	VRAQDRY	YSSSWSEWASV	PC---	328
		***** * * * . . . *:***** ** *:***** **			

Abb. A1: Vergleich der Aminosäuresequenz von murinen und humanen p40. Das Signalpeptid von M1-A22 ist gepunktet unterstrichen. Glassman *et al.* charakterisierten kritische Aminosäuren der *site II* W37, F82, H216, K217 und K219, die in rot dargestellt sind [42]. Es wurden Alaninmutationen generiert, die die Funktionalität von IL-12 und IL-23 reduzierten (orange) [42]. Die generierten Deletionsvarianten Δ M23-D29 ist blau dargestellt und Δ Y31-T38 ist grün [84]. Die 3 Loops stellen die Bindungs epitope von Ustekinumab da [67]. Innerhalb der Aminosäuresequenz sind die kritischen Aminosäuren von *site I* in rotumrandet dargestellt. Dies sind D312, Y136, Y268 [28]. Modifiziert nach Georgy *et al.* [84].

ANHANG

sp P43431 IL12A_MOUSE	MCQSRYLFLATLALLNHLSLARVIPVSGP---ARCLSQSRNLLKTDDMVKTAREKLK	56
sp P29459 IL12A_HUMAN	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFCLHHSQNLRAVSNMLQKARQTLE	60
	** : * **::***,***:***** :** : * ** :***:***:..:***:***:	
sp P43431 IL12A_MOUSE	HYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPQKTSLMM	116
sp P29459 IL12A_HUMAN	FYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSEMM	120
	. * ** :***:*****:***:***:..:***** ***** :**** * ,**** :***:***	
sp P43431 IL12A_MOUSE	TLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQIIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQK	176
sp P29459 IL12A_HUMAN	ALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQK	180
	:***,*****:***:*** * . :***:***:***,*****:***,***: **	
sp P43431 IL12A_MOUSE	PPVGEADFYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSA 215	
sp P29459 IL12A_HUMAN	SSLEEPDEFYKTKMKLCILLHAFIRAVTILRVMGYLNAS 219	
	: * * * :***:***** * ,***:***,***:..:	

Abb. A2: Vergleich der Aminosäuresequenz von murinen und humanen p35. Innerhalb der Aminosäuresequenz sind die kritischen Aminosäuren von *site I* in rot und von *site III* in grün dargestellt. Kritische Aminosäure der humanen *site I* ist R211 [28, 29] und kritische Aminosäuren der humanen *site III* sind Y189 und I193 [40, 43].

ANHANG

sp Q9EQ14 IL23A_MOUSE	MLDCRAVIMLWLLFPWVTQGLAVPRSSSPDWAQCQQLSRNLCMLAWNAHAPAGHMNLLREE	60
sp Q9NPF7 IL23A_HUMAN	MLGSRVAVMLLLLLPWTAQGRAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCITLAWSAHPLVGHMDL-REE	59
	..*:.* ****.:** *** .*** *:*****:.* ***,** .***:* ***	
sp Q9EQ14 IL23A_MOUSE	EDEETKNNVPRIQCEDGCDPQGLKDNSQFCLQRIHQGLAFYKHLSDIFKGEPAALLPDS	120
sp Q9NPF7 IL23A_HUMAN	GDEETNDVPHIQCGDGCDDPQGLRDNSQFCLQRIHQGLIFYEKLGSDFITGEPSLLPDS	119
	****.*:***:*** *****:*****:*** **:-**,****.***:*****	
sp Q9EQ14 IL23A_MOUSE	PMEQLHTSLGLSQLLQPEDHPRETQQMPSLSSSQWQRLLIRSKILRSLQAFIAIAAFV	180
sp Q9NPF7 IL23A_HUMAN	PVGQLHASLLGLSQLLQPEGHHWETQQIPSLSPSQWQRLLIRFKILRSLQAFVAVAAAFV	179
	*:***:*****.* *****:*** ** ** ** *****:*.****	
sp Q9EQ14 IL23A_MOUSE	FAHGAATLTEPLVPTA	196
sp Q9NPF7 IL23A_HUMAN	FAHGAATLSP-----	189
	*****.	

Abb. A3: Vergleich der Aminosäuresequenz von murinen und humanen p19. Innerhalb der Aminosäuresequenz sind die kritischen Aminosäuren von *site I* in rot und von *site III* in grün dargestellt. An der humanen *site I* ist p19 R178 beteiligt [28] und an der humanen *site III* sind p19 W156, L160 und L161 beteiligt [43, 46].

ANHANG

sp Q60837 I12R1_MOUSE	MDMMGLAGTS-KHITFLLLCQLGASGPGDGCCVEKTSFPEGASGSPGLPRNLSYRVSKT	59
sp P42701 I12R1_HUMAN	--MEPLVTWVPLFLFLLSRQGAACRTSECCFQDPYPDADSGSASGPRDLRCYRISSD	58
	* * . : : * . : * : . * * . : : * * * * : * * * .	
sp Q60837 I12R1_MOUSE	DYECWQYDGPEDNVSHVLWCCFVPPNHTHTGQERCYFSSGPDRTVQFWEQDGIQVLSK	119
sp P42701 I12R1_HUMAN	RYECWQYEGPTAGVSHFLRCCLS-----SGRCCYFAAGSATRLQFSDQAGVSVIYT	110
	*****: * . * * . * * : . * * * : * : * * : * * : * * .	
sp Q60837 I12R1_MOUSE	VNFVWESRLGNRTMKSQKISQILINWTKTTPPLGHIKVSQSHRQLRMDWNVSE-EAGAEV	178
sp P42701 I12R1_HUMAN	VTLWVESWARNQTEKSPEVTLOILNSVKYEPPLGDIKVSCLAGQLRMWETPDNQVGAEV	170
	* . : * * * * * : * * * * : : * * * . * * * * . * * * : * * * : * . : . * * * *	
sp Q60837 I12R1_MOUSE	QFRRRMPPTTNWTLGDCGPQVNSGSGVLGDIRGSMSESCLCPSE-NMAQEIQIRRRRLSS	237
sp P42701 I12R1_HUMAN	QFRHRTFSSPFWKLGDGCPQDDD-----TESCLCPLEMNVAQEFQLRRR---QL	215
	***: * * : : * . * * * * * : . : * * * * * * * : * * * * : * * * .	
sp Q60837 I12R1_MOUSE	GAPGGPWSDWMPVCVPPEVLPQAKIKFLVEPLNQGGRRRLTMQGQSPQLAVPEGCRGRP	297
sp P42701 I12R1_HUMAN	GSQGSSWSKWSSPVCVPPENPPQPVRFVSVEQLGQDGRRLTLKEQPTQLELPEGCQGLA	275
	* : * . * * . * * * * * * * * * : : * * * * . * . * * * * : : * * * : * * * : *	
sp Q60837 I12R1_MOUSE	GAQVKKHLVLVRMLSCRCQAQTSKTVPLGKKLNLSGATYDLNVLAKTRFGRSTIQKWHLP	357
sp P42701 I12R1_HUMAN	PGTEVTYRLQLHMLSCPCAKATRTRLHLGKMPYLSGAAYNVAVISSNQFGPGLNQTHWIP	335
	. . : : : * * * * * : * : : : * : * * * * * : * : : : * * . * . * * : *	
sp Q60837 I12R1_MOUSE	AQELTETRALNVSVGGNMTSMQWAAQAPGTTYCLEWQPFQHRNHTCTLIVPEEEDPAK	417
sp P42701 I12R1_HUMAN	ADTHTEPVALNISVGTNGTTMYWPARAQSMTYCIEWQPVGQDGGGLATCSLTAPQDPDFAG	395
	* : * * * * : * * * * * * * : * * * * * * . * . : * * * . * : * * *	

Abb. A4: Vergleich der Aminosäuresequenz von murinen und humanen IL-12Rβ1. Dargestellt ist ein Ausschnitt der Aminosäuresequenz. Innerhalb der Aminosäuresequenz sind die kritischen Aminosäuren von *site II* in blau dargestellt. Die humane *site II* in IL-12Rβ1 wird durch die Aminosäuren Q102, S106, V107, L108, Y109, Q132, Y134 gebildet [42].

ANHANG

sp P97378 I12R2_MOUSE	MAQTVRECSLALLFLFMWLLIKANIDVCKLGTVTVPAPVIPLGSAANISCSLNPKQGCS	60
sp Q99665 I12R2_HUMAN	MAHTFRGCSLAFMFIITWLLIKAKIDACKRGDVTVPKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGC	60
	.*.:.*:***:***.*.***.*.***.*.***:***:***:***:***:***	
sp P97378 I12R2_MOUSE	HYPSNELILLKFVNDVLVENLHGKKVHDHTGHSSTFQVTNLSLGMTLFVCKLNCSNSQK	120
sp Q99665 I12R2_HUMAN	HYSRRNKLILYKFDRR-----INFHHGHSLSQVTGLPLGTLFVCKLACINSD-	109
	.*:*.*.***:***:***:***.*.***.*.***:***:***:***:***:***	
sp P97378 I12R2_MOUSE	KPPVPVCGVEISVGVAPEPPQNISCQEGENGTVACSWNSGKVITYLKTNYTLQLSGPNNL	180
sp Q99665 I12R2_HUMAN	--EIQICGAEIFVGVAPEPPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNL	167
	:***.*.***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***	
sp P97378 I12R2_MOUSE	TCQKQCFSDNRQNCNRLDLGINLSPDLAESRFIVRVTAINDLGSSSLPHTFTFLDIVIP	240
sp Q99665 I12R2_HUMAN	TWQKQCKD---IYCDYLDGFINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSLPSTFTFLDIVRP	224
	*.***.*.***:***:***:***.*.***.*.***:***:***:***:***:***	
sp P97378 I12R2_MOUSE	LPPWDIRINFLNASGSRGTLQWEDEGQVVLNQLRYQPLNSTSWNMVNATNAKGYDLRDL	300
sp Q99665 I12R2_HUMAN	LPPWDIRIKFQKASVSRCITLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTAKGRHDL	284
	*****.*:***.*.***.*.***:***:***:***.*.***.*.***:***:***	
sp P97378 I12R2_MOUSE	RPFTYEYFQISSKLHLGGWSNWSLRLTRTPPEEPVGILDIWYMKQDIDYDRQQISLF	360
sp Q99665 I12R2_HUMAN	KPFTYEYFQISSKLHLYKGSWDWSESLRAQTPEEPTGMLDVWYMKRHIDYSRQQISLF	344
	:*****.*.***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***	
sp P97378 I12R2_MOUSE	WKSINPSEARGKILHYQVTLQEVTKKT-TLQNTTRHTSWTRVIRPTGAWTASVSAANSKG	419
sp Q99665 I12R2_HUMAN	WKNLSVSEARGKILHYQVTLQELTGKAMTQNTGHTSWTTVIRPTGNWAVAVSAANSKG	404
	.*.**.*.***.*.***.*.***.*.***.*.***:***:***:***	

Abb. A5: Vergleich der Aminosäuresequenz von murinen und humanen IL-12R β 2. Dargestellt ist ein Ausschnitt der Aminosäuresequenz. Innerhalb der Aminosäuresequenz sind die kritischen Aminosäuren von *site III* in grün dargestellt. Aminosäuren der humanen *site III* sind F99 und A27 [40].

ANHANG

sp Q8K4B4 IL23R_MOUSE	MSHLTQLQHLVVIALYVLFWRWCHGGITS	INCSGDMWVEPGEIFQMGMNVSIIYCCQ	EALKHCR	60
sp Q5VWK5 IL23R_HUMAN	MNQVTIQWDAVIALYILFSWCHGGITN	INCSGHIWVEPATIFKMGMNISIIYCCQA	AIKNCQ	60
	.:: * .. *****: * * * * * *: * * * * *: * * * * *: * * * * *			
sp Q8K4B4 IL23R_MOUSE	PRNLIFYKNGFKEEFDIRINTRRTARIWYKGFSEPHAYM	CTAECPGHFQET	IIICGKDIS	120
sp Q5VWK5 IL23R_HUMAN	PRKLHFYKNGIKERFQITRINKTTARLWYKNFLEPHASM	CTAECPKHFQET	IIICGKDIS	120
	*: * * * * *: * * * * *: * * * * *: * * * * *: * * * * *: * * * * *			
sp Q8K4B4 IL23R_MOUSE	SGHPPDAPSNLTCVIYEYSGNMTCTWNTGKPTYIDTKYIVHVKSLETEEEQQY	VLASSYVK		180
sp Q5VWK5 IL23R_HUMAN	SGPPDIPDEVTCTVIYEYSGNMTCTWNAGKLT	YIDTKYVVHVKSLETEEEQQY	YLSSYIN	180
	*: * * * * *: *.: * * * * *: * * * * *: * * * * *: * * * * *: * * * * *			
sp Q8K4B4 IL23R_MOUSE	ISTDSLQGSRKYLWVWQAVNSLGMENSQQLHVHLDDIVIP	SASII	SRAETNTDTPKTI	240
sp Q5VWK5 IL23R_HUMAN	ISTDSLQGGKYLWVWQAANALGMEESKQLQIHLDDIVIP	SAAV	SRAETINATVPKTI	240
	* * * * * *: * * * * *: * * * * *: * * * * *: * * * * *: * * * * *			
sp Q8K4B4 IL23R_MOUSE	YWKSKTMIEKVFCEMRYKTTNQTWSVKEFDANFTYVQQSEFYLEPDSKYVFQVRCQETG			300
sp Q5VWK5 IL23R_HUMAN	YWDSQTTIEKVSCEMRYKATTNQTWNVKEFDNTFTYVQQSEFYLEPNIKYVFQVRCQETG			300
	*: *.: * * * * *: * * * * *: * * * * *: * * * * *: * * * * *: * * * * *			
sp Q8K4B4 IL23R_MOUSE	KRNWQPWSSPFVHQTSQETGKRNWQPWSSPFVHQTSQTVS	QVTAKS	-SHEPQKMEMLSAT	359
sp Q5VWK5 IL23R_HUMAN	KRYWQPWSSLFFHKTPTVP-----	QVTSKAFQHD	TWNSGLTVAS	340
	* * * * * *: *.: * * * * *: * * * * *: * * * * *: * * * * *: * * * * *			
sp Q8K4B4 IL23R_MOUSE	IFRGHPASGNHQDIGLLSGMVFLAIMLP	FISFLIGIFNRS	LRIGIKRKVLLMIPKWL	YEDI
sp Q5VWK5 IL23R_HUMAN	ISTGHLTSDNRGDIGLLGMIVFAVMLS	SILSLIGIFNRS	FRTGIKRRILLIPKWL	YEDI
	* * * * *: * * * * *: * * * * *: * * * * *: * * * * *: * * * * *			

Abb. A6: Vergleich der Aminosäuresequenz von murinen und humanen IL-23R. Dargestellt ist ein Ausschnitt der Aminosäuresequenz. Innerhalb der Aminosäuresequenz sind die kritischen Aminosäuren von *site III* in grün dargestellt. An der humanen *site III* sind G116, Y100, L113 und I28 beteiligt [43].

ANHANG

sp Q61729 IL12B_MARMO	---MCLQQLVISWVSLVWLASPLLAWELEKNVYVVEIDWH	57
sp Q924V5 IL12B_CAVPO	---MCHRQLISSWLSLVLLASPLLAMWELKKDVYVVEIDWH	57
sp P29460 IL12B_HUMAN	---MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVEIDWY	57
sp P46658 IL12B_CERAT	---MCHQQLVISWFSLVFLASPLMAIWELKKDVYVVEIDWY	57
sp Q865Y3 IL12B_PAPAN	---MCHQQLVISWFSLVFLASPLMAIWELKKDVYVVEIDWY	57
sp P48095 IL12B_MACMU	---MCHQQLVISWFSLVFLASPLMAIWELKKDVYVVEIDWY	57
sp Q28938 IL12B_PIG	---MHLQQLVVSWFSLVWLASPIVAIWELKNVYVVEIDWY	57
sp Q865W9 IL12B_LAMGL	---MHPQQLVVSWFSLVLLASPIMAIWELKNVYVVEIDWY	57
sp P68220 IL12B_SHEEP	---MHPQQLVVSWFSLVLLASPIVAIWELKNVYVVEIDWY	57
sp Q2PE76 IL12B_BUBCA	---MHPQQLVVSWFSLVLLASPIVAIWELKNVYVVEIDWY	57
sp P46282 IL12B_BOVIN	---MHPQQLVVSWFSLVLLASPIVAMWELEKNVYVVEIDWY	57
sp Q8CJE6 IL12B_MESAU	---MCHQKLTISWFAVVLASPLMAIWELKDVYVVEVDWS	57
sp P43432 IL12B_MOUSE	---MCPQKLTISWFAIVLLVSPMLAMWELEKDVYVVEVDWT	57
	: : * : * . :*:*: :* :*:*	

Abb. A7: Vergleich der Aminosäuresequenzen von p40 von verschiedenen Spezies. Dargestellt ist ein Ausschnitt des Alignment von p40 von verschiedenen Spezies. Die Aminosäuren D36 und W37 sind in den dargestellten Spezies konserviert. Position 38 ist variabler, in den meisten Spezies findet sich ein Tyrosin wie im Menschen (Markierung). Modifiziert nach Georgy *et al.* [84].

Tabelle A1: Übersicht über ausgewählte Zytokinrezeptorkomplexe der IL-6 Familie.

	IL-6	IL-11	CNTF	OSM
α-Rezeptor	IL-6R	IL-11R	CNTF-R	-
Rezepordimer	gp130/gp130	gp130/gp130	gp130/LIFR	gp130/LIFR oder gp130/OSMR

IL-6 und IL-11 binden an die nicht-signaltransduzierende α -Rezeptoruntereinheit IL-6R bzw. IL-11R und interagieren mit einem gp130 Homodimer [37]. CNTF interagiert mit der nicht-signaltransduzierende α -Rezeptoruntereinheit CNTF-R und mit einem Rezeptorheterodimer bestehend aus gp130 und LIFR [36]. OSM interagiert ebenfalls mit gp130 und einem gp130 ähnlichem Rezeptor (LIFR oder OSMR) [36]. Zur Bildung des Zytokinrezeptorkomplexes wird kein nicht-signaltransduzierender α -Rezeptor benötigt [36]. Modifiziert nach Jones und Jenkis [87].

7.2 Nutzungsrechte der Publikation



RightsLink


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
Author:

Jacqueline Georgy, Yvonne Arit, Jens M. Moll, Meryem Ouzin, Hendrik T. Weitz, Lothar Gremer, Dieter Willbold, Joachim Grötzinger, Felix Thives-Kurenbach, Jürgen Scheller, Doreen M. Floss

Publication: Journal of Biological Chemistry

Publisher: Elsevier

Date: November 2021

© 2021 The Authors. Published by Elsevier Inc on behalf of American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Creative Commons

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons CC-BY](#) license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.

To request permission for a type of use not listed, please contact [Elsevier](#) Global Rights Department.

Are you the [author](#) of this Elsevier journal article?

© 2024 Copyright - All Rights Reserved | [Copyright Clearance Center, Inc.](#) | [Privacy statement](#) | [Data Security and Privacy](#)
 | [For California Residents](#) | [Terms and Conditions](#) Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet?publisherName=ELS&contentID=S0021925821011017&orderBeanReset=true> (12.08.2024)

8 Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz besonders bei meiner Doktormutter PD Dr. rer. nat. Doreen Floss für die großartige Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Vielen Dank für die gute Einarbeitung in die Laborarbeit und in die Planung von wissenschaftlichen Experimenten. Zu egal welcher Uhrzeit hattest du immer Ideen für das Voranbringen des Projektes und ein offenes Ohr für die verschiedensten Probleme. Durch deinen außergewöhnlich hohen Arbeitseinsatz und deine Unterstützung ist am Ende nicht nur eine Doktorarbeit aus dem Projekt geworden, sondern auch eine Erstautorenpublikation. Des Weiteren möchte ich mich bei dir für die Unterstützung während meines Studiums, die vielen Einblicke in die Arbeit eines Postdocs und die Tipps für die Möglichkeiten in der Wissenschaft zu arbeiten, bedanken. Vielen Dank für die ganze Zeit und Mühe, die du dir mit der Betreuung deiner Doktoranden machst!

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller für die Möglichkeit zur Erstellung meiner Doktorarbeit bedanken. Vielen Dank für die regelmäßigen Lab meetings, die Unterstützung bei meiner Doktorarbeit und Publikation und der Organisation des Laborbetriebes während der Corona-Pandemie.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Stefanie Scheu für die Übernahme der Zweitbetreuung bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt allen Autoren unserer Publikation für die gute Zusammenarbeit: Yvonne Arlt, PhD Jens Moll, Meryem Ouzin, Hendrik Weitz, Dr. rer. nat. Lothar Gremer, Prof. Dr. rer. nat. Dieter Willbold, Prof. Dr. rer. nat. Joachim Grötzinger, Felix Thives-Kurenbach, Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller und PD Dr. rer. nat. Doreen Floss.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Puyan Rafii für die Einarbeitung in Chimera und Christiane Seibel für das ausführliche Korrekturlesen meiner Doktorarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung während meiner Doktorarbeit bedanken. Die Arbeit im Labor hat mit euch immer sehr viel Spaß gemacht und das Freisemester für meine Doktorarbeit war eins der schönsten Semester meines gesamten Studiums. Unsere vielen gemeinsamen Unternehmungen und Feiern werden immer eine schöne Erinnerung sein. Besonders möchte ich mich bei Noémi Coesfeld, Elena Zimmer, Marius Jonas, Dorothee Lapp, Dr. rer. nat. Sofie Moßner, Dr. Puyan Rafii, Christiane Seibel, Julia Ettich, Hendrik Weitz, Christoph Wittich, Anna Rita Minafra, Farhad Bazgir, Petra Opreé-Jeremic und Zoe Jeremic bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Familie, insbesondere meiner Mama Ina Georgy, und meinen Freunden Lea July Kohlhoff, Jovana Rosic, Celina Kullmann, Sophie Lansbergen, Caroline Grimmel, Sebastian Burkhardt, Florian Fürst, Julia Schuster, Irina Nikolova und Leonard Wendelborn. Vielen lieben Dank für eure Unterstützung!