

Aus dem Biochemischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Stefan Rose-John)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**UNTERSUCHUNG ZUR LIGANDENUNABHÄNGIGEN
AKTIVIERUNG DES IL-23-REZEPTORS**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

ANNE OBERDOERSTER

aus Berlin

Kiel 2014

1. Berichterstatter:	<u>Prof. Dr. S. Rose-John</u>
2. Berichterstatter:	<u>Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi</u>
Tag der mündlichen Prüfung:	<u>18. 12. 2015</u>
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	<u>17.12. 2015</u>
gez.	<u>Anne Oberdoerster</u>

Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis.....	i
II. Tabellenverzeichnis.....	ii
III. Abkürzungsverzeichnis	iii
1 Einleitung.....	1
1.1 Zytokine.....	1
1.2 Interleukin-23 und dessen Rezeptor	1
1.3 Die biologische Funktion von IL-23	4
1.4 IL-23 in humanen Erkrankungen.....	5
1.5 IL-15 und IL-15R α	7
1.6 Zielsetzung und Methodik	8
2 Material und Methoden.....	9
2.1 Material.....	9
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	9
2.1.2 Zelllinien und Bakterienstämme	9
2.1.3 Medien und Antibiotika	9
2.1.4 Plasmide	10
2.1.5 Oligonukleotide	11
2.1.6 Antikörper	11
2.1.7 Enzyme und Zytokine	12
2.1.8 Lösungen und Puffer	12
2.1.9 Sonstige Reagenzien und Kits.....	13
2.1.10 Arbeitsgeräte	14
2.1.10.1 Mikroskope	14
2.1.10.2 Zentrifugen.....	14
2.1.10.3 Inkubatoren	14
2.1.10.4 Elektrophorese	15
2.1.10.5 Photometer	15
2.1.10.6 Sonstige Geräte	15
2.2 Methoden.....	15
2.2.1 Molekularbiologische Arbeiten.....	15

2.2.1.1	Plasmid-DNA-Mini-Präparation.....	15
2.2.1.2	Plasmid-DNA-Midi-Präparation.....	16
2.2.1.3	Bestimmung der DNA-Konzentration	16
2.2.1.4	Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA-Fragmenten.....	16
2.2.1.5	Polymerase-Ketten-Reaktion und Kolonie-PCR	17
2.2.1.6	Restriktionsverdau	17
2.2.1.7	Dephosphorylierung.....	18
2.2.1.8	Ligation von DNA	18
2.2.1.9	DNA - Sequenzierung.....	18
2.2.1.10	mRNA - Nachweis.....	18
2.2.1.11	Transformation kompetenter Bakterien	19
2.2.2	Proteinbiochemische Arbeiten	19
2.2.2.1	Zelllyse.....	19
2.2.2.2	Quantifizierung von Proteinen.....	19
2.2.2.3	SDS-PAGE	19
2.2.2.4	Western Blot	20
2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	20
2.2.3.1	Zellkultur.....	20
2.2.3.2	Retrovirale Transduktion von Ba/F3 gp130 Zellen	21
2.2.3.3	Proliferationsassay	22
2.2.3.4	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	22
3	Ergebnisse.....	23
3.1	Generierung der erzwungenen, ligandenunabhängigen Dimerisierung des IL-23-Rezeptorkomplexes.....	23
3.2	Klonierung des Vektors pMk-hIL-15-IL-23R-sushi-mIL-12R β 1	24
3.3	Subklonierung von KONNI in die Vektoren pMOWS und p409	28
3.4	Generierung stabil transduzierter Ba/F3 gp130-KONNI Zelllinien	32
3.5	Nachweis des Rezeptorkomplexes mittels RT-PCR in Ba/F3 gp130 Zellen	32
3.6	Untersuchung des Signaltransduktionswegs der Ba/F3 gp130-KONNI Zelllinien	33

3.7	Oberflächenexpression des Rezeptorkomplexes	34
3.8	Überprüfung der ligandenunabhängigen Proliferation	35
4	Diskussion	37
4.1	Ligandenunabhängige Dimerisierung des IL-23-Rezeptorkomplexes und deren Auswirkungen auf stabil transduzierte Ba/F3 gp130 Zellen	37
4.2	Anwendung der IL-15/IL-15R α -sushi-Dimerisierungsstrategie auf den IL-23 Rezeptorkomplex	38
4.3	Mögliche Verwendung des künstlich dimerisierten IL-23-Rezeptorkomplexes <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	39
4.4	Der IL-23-Rezeptor als Ziel bei der Behandlung autoimmuner Entzündungserkrankungen	41
5	Zusammenfassung.....	42
6	Literaturverzeichnis	43
7	Anhang.....	49
7.1	Vektorkarten	49
7.2	Nukleotidsequenzen.....	54
8	Danksagung	56
9	Lebenslauf.....	57

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die IL-6-/IL-12-Superfamilie.....	2
Abbildung 2:	Struktur des Zytokins IL-23 und seines Rezeptorkomplexes.....	3
Abbildung 3:	Signaltransduktionsweg von IL-23.....	4
Abbildung 4:	Interaktion des Interleukin-15 mit seinem Rezeptorkomplex, Struktur und elektrostatisches Oberflächenpotential von IL-15 und IL-15R α	7
Abbildung 5:	Zytokinunabhängige Proliferation der mit KONNI stabil transduzierten Ba/F3 gp130 Zellen.....	23
Abbildung 6:	Vereinfachter schematischer Aufbau des Zielkonstrukts KONNI.	24
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der Expression des Konstrukts KONNI mittels der 2A- Technologie.	25
Abbildung 8:	Klonierungsschema.....	26
Abbildung 9:	Gelelektrophoretische Analysen der Klonierung des Vektors pMk FUSIO-WSX-1-IL-12 β 1.....	27
Abbildung 10:	Gelelektrophoretische Analysen der Klonierung des Vektors pMk- KONNI.....	28
Abbildung 11:	Schematische Darstellung der Subklonierung des KONNI-Konstrukts.	29
Abbildung 12:	Gelelektrophoretische Analysen der Klonierung des Vektors pMOWS- KONNI.....	30
Abbildung 13:	Gelelektrophoretische Analysen der Klonierung des Vektors p409- KONNI.....	31
Abbildung 14:	Nachweis der Rezeptorexpression auf mRNA-Ebene in Ba/F3 gp130- KONNI Zelllinien.	33
Abbildung 15:	Analyse der Signaltransduktionswege JAK/STAT und MAPK.....	34
Abbildung 16:	Durchflusszytometrie der Zelllinie Ba/F3 gp130 KONNI 39II.....	35
Abbildung 17:	Proliferationsassay der vier generierten Ba/F3 gp130-KONNI Zelllinien.....	35
Abbildung 18:	Vektorkarten aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.	53

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.....	9
Tabelle 2: Liste der verwendeten Selektionsantibiotika.....	9
Tabelle 3: Herkunft der verwendeten Plasmide und deren Resistenzen.....	10
Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.....	11
Tabelle 5: Antikörper für Western Blot und FACS-Analyse.....	11
Tabelle 6: Standardprogramm für die durchgeführten PCRs.....	17
Tabelle 7: Zusammensetzung eines 10 %-igen Sammelgels und eines 4 %-igen Trenngels für SDS-PAGE.....	20

III. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Amp ^R	Ampicillinresistenz
APC	Antigen-presenting cell (Antigenpräsentierende Zelle) oder Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure oder Ankylosierende Spodylitis
Bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin (Bovines Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius oder Cytosin
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
d.h.	das heißt
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ED	extrazelluläre Domäne
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FCS	Fetal Calf Serum (Fötale Kälberserum)
FnIII	Fibronectin-III-Domänen
G	Guanin
GFP	green fluorescent protein
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPL	gp130-like receptor
gp130	Glykoprotein130
H-IL-6	Hyper-IL-6
IFN	Interferon
IgD	Immunglobulin-ähnliche Domäne

IL	Interleukin
IL-23R	Interleukin-23-Rezeptor
JAK	Janus Kinase
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kDa	Kilodalton
Kb	Kilobase
l	Liter
LB-Medium	Lysogeny Broth-Medium
LIFR	Leukemia inhibitory factor receptor
M	molar
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloprotease
MS	Multiple Sklerose
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mRNA	Messenger RNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PBS	Posphate-Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
pH	potentia Hydrogenii
Puro ^R	Puromycinresistenz
RA	Rheumatoide Arthritis
RLU	Relative light unit
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
Rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
s	Sekunde
SDS	Sodium Dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
sIL-6R	soluble Interleukin-6 receptor (löslicher Interleukin-6-Rezeptor)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOCS	Suppressor of Cytokine Signalling
SP	Signalpeptid
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
T	Thymidine
TBS	Tris-Buffered Saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBST	TBS + Tween® 20
TD	Transmembrandomäne
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TYK	Tyrosin Kinase
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vgl.	vergleiche
v/v	volume/volume (Volumen zu Gesamtvolumen)
w/v	weight/volume (Gewicht pro Volumen)
WSX-1	Interleukin-27 receptor alpha
z.B.	zum Beispiel
ZBD	Zytokinbindedomäne
ZD	zytoplasmatische Domäne
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

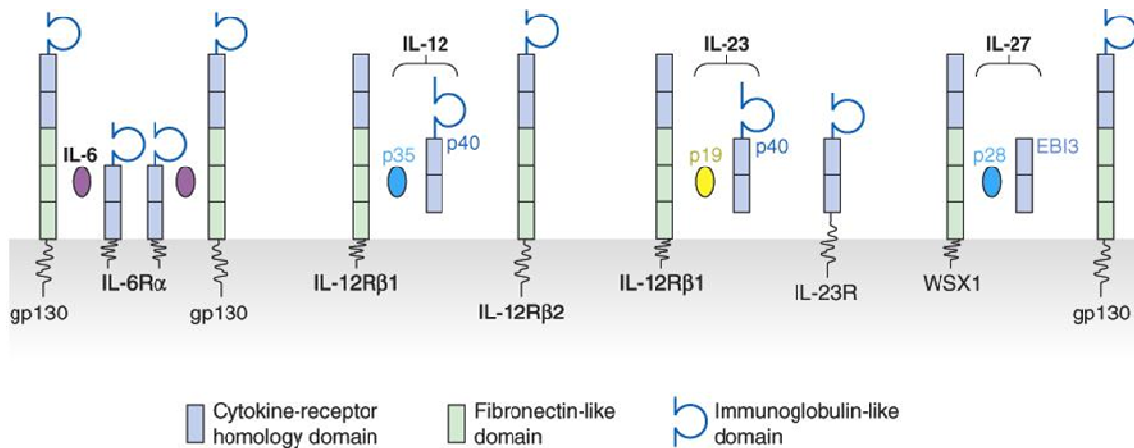
1.1 Zytokine

Eine Immunantwort als Reaktion des Individuums auf das Eindringen von Pathogenen stellt einen komplexen Mechanismus dar und beinhaltet das Zusammenspiel verschiedenster Immunzellen, die direkt, z.B. über Zell-Zell-Kontakt, und indirekt, z.B. über Botenstoffe, interagieren können. Zu diesen Botenstoffen gehören unter anderem auch die Zytokine. Zytokine sind kleine (< 30 kDa) Peptide, die bei Bedarf, d.h. während einer Immunantwort, von verschiedenen Zelltypen synthetisiert und sezerniert werden. Sie regulieren überwiegend als lokal wirkende Faktoren parakrin oder autokrin Wachstum und Differenzierung spezifischer Zellen und Gewebe und beeinflussen vor allem Entzündungsvorgänge, Immunregulation und Abwehrprozesse. Zytokine greifen auch in die Regulation der Hämatopoese und der Förderung der Wundheilung mit ein (Oppenheim *et al.*, 2001). Durch ihre kurze Halbwertszeit haben sie eine geringe Reichweite. Sie binden spezifisch an ihre jeweiligen Rezeptoren; mit einer Bindungskonstante von 10^{-10} bis 10^{-12} sind sie auch in sehr niedrigen Konzentrationen wirksam (Kaplan *et al.*, 1996). Aufgrund einer räumlichen und zeitlichen Kontrolle der Expression und Freisetzung von Zytokinen ist eine differenzierte Koordination unterschiedlicher Signale möglich. Hierdurch wird eine komplexe Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen gewährleistet. Eine weitere Eigenschaft der Zytokine ist ihre Pleiotropie, das heißt sie besitzen die Eigenschaft, verschiedene Zelltypen zu stimulieren. Weiterhin können unterschiedliche Zytokine den gleichen Signalweg anschalten, was als Redundanz bezeichnet wird. Zur Gruppe der Zytokine zählen neben den Interleukinen (IL) auch die Chemokine, die Interferone (IF) und die Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF).

1.2 Interleukin-23 und dessen Rezeptor

Zytokine können anhand ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten der Liganden und Rezeptoren in verschiedene Familien eingeteilt werden. Interleukin-23 (IL-23) ist Teil der IL-6-/IL-12-Superfamilie, zu denen auch IL-23 und IL-27 gehören. Die Zytokine dieser Gruppe sind heterodimere Proteine, die in der Entwicklung und Regulierung der Immunantwort eine bedeutende Rolle spielen. Sie bestehen aus einer α -Kette mit einer 4-Helix-Bündel-Struktur und einer β -Kette (Rozwarski *et al.*, 1994). Dieser Superfamilie ist eine große Bandbreite biologischer Funktionen eigen, die mittels zweiteiliger Zelloberflächenrezeptoren übermittelt werden. Diese bestehen typischerweise aus einer Zytokin-spezifischen Rezeptorkette und einer signalübertragenden Rezeptorkette. Da die signalübertragenden Ketten oft von verschiedenen

Zytokinen geteilt werden, überlappen sich die Funktionen der IL-12-ähnlichen Zytokine. Die Rezeptoren der IL-12-Superfamilie ähneln sich in ihrer Struktur, auf eine Ig-ähnliche Domäne folgt die Zytokinbindedomäne und drei Fibronectin-III-ähnliche Domänen (Abbildung 1).



AR Kastelein RA, et al. 2007.
Annu. Rev. Immunol. 25:221–42

Abbildung 1: Die IL-6-/IL-12-Superfamilie. Dargestellt ist die IL-6-/IL-12-Superfamilie mit ihren Mitgliedern IL-6, IL-12, IL-23 und IL-27. Sie alle sind heterodimere Proteine, bestehend aus einer α -Kette mit einer 4-Helix-Bündel-Struktur (p19, p28, p35) und einer β -Kette (p40, EBI3). Die Rezeptoruntereinheiten der IL-6-/IL-12-Superfamilie sind alle aus Ig-ähnlichen Domänen (Immunoglobulin-like domain), Zytokinbindedomänen (Cytokine-receptor homology domain) und drei Fibronectin-III-ähnlichen Domänen (Fibronectin-like domain) aufgebaut.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Zytokin Interleukin-23 und dessen Rezeptorkomplex. Wie in Abbildung 2 dargestellt, besteht IL-23 aus zwei kovalent gebundenen Untereinheiten: p19, die α -Kette mit einer 4-Helix-Bündel-Struktur, und p40, die β -Kette (Lupardus *et al.*, 2008). Die p40-Untereinheit teilt sich IL-23 mit IL-12, unterscheidet sich aber von diesem durch seine p19-Untereinheit. Die Bildung von biologisch aktivem IL-23 erfordert die Sezernierung beider Untereinheiten von derselben Zelle. Die p19-p40-Interaktion wird durch eine Disulfidbrücke stabilisiert (Oppmann *et al.*, 2000). Betrachtet man die strukturellen Ähnlichkeiten zwischen IL-12 und IL-23, überrascht es nicht, dass auch ihre heterodimeren Rezeptoren sich sehr ähneln. Die p40-Untereinheit von IL-23 bindet an den signalübertragenden IL-12Rβ1. Parham und Kollegen gelang es, einen zweiten IL-23-spezifischen Rezeptor zu identifizieren, der IL-23R genannt wird (Parham *et al.*, 2002). Anders als seine Verwandten der IL-6-/IL-12-Superfamilie enthält er keine drei Fibronectin-III-ähnlichen Domänen, sondern eine Ig-ähnliche Domäne und zwei Zytokinbindedomänen, ähnlich wie der IL-6Rα (vgl. Abbildung 1). Gemeinsam mit dem IL-12Rβ1 bildet der IL-23R den IL-23-Rezeptorkomplex.

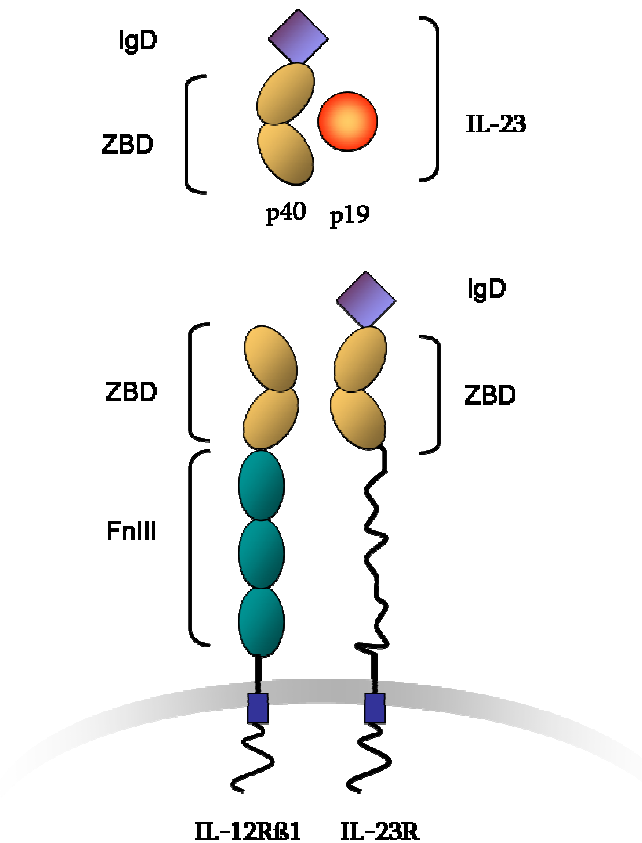


Abbildung 2: Struktur des Zytokins IL-23 und seines Rezeptorkomplexes. Das Zytokin IL-23 ist ein heterodimeres Protein, das aus den kovalent gebundenen Untereinheiten p40 und p19 besteht. Der Ligand IL-23 übermittelt sein Signal über einen zweiteiligen Rezeptorkomplex, der sich aus den Untereinheiten IL-12R β 1 und IL-23R zusammensetzt. Der extrazelluläre Bereich von IL-12R β 1 ist aus drei Fibronektin-III-ähnlichen Domänen (FnIII) und zwei Zytokinbindedomänen (ZBD) aufgebaut, der IL-23R besteht aus einer Ig-ähnlichen Domäne (IgD) und zwei Zytokinbindedomänen.

Nach Binden des Liganden IL-23 an die Rezeptoren IL-12R β 1 und IL-23R dimerisieren diese. Beiden Rezeptoren fehlt eine eigene intrinsische Aktivität zur Signaltransduktion, daher sind sie mit intrazellulär lokalisierten Januskinasen (JAKs) verknüpft, die das Signal in das Innere der Zelle weiterleiten. IL-12R β 1 ist mit TYK2 assoziiert und IL-23R mit JAK2 (Zou *et al.*, 1997; Parham *et al.*, 2002). Die Stimulation durch IL-23 führt zur Autophosphorylierung und Transphosphorylierung der rezeptorassoziierten JAKs. Diese phosphorylieren wiederum Tyrosinreste, die sich in den intrazellulären Domänen der Rezeptoruntereinheiten befinden. An die phosphorylierten Tyrosinreste binden nun die *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT)-Moleküle, welche dadurch ebenfalls phosphoryliert werden. Einer besonderen Bedeutung im IL-23-Signaltransduktionsweg kommt STAT3 zu, aber auch STAT1, STAT4 und STAT5 spielen eine Rolle (Parham *et al.*, 2002). Phosphorylierte STAT-Moleküle translozieren als Homodimere in den Nukleus, um dort als Transkriptionsfaktoren tätig zu

werden. Somit induziert die Bindung von IL-23 an seinen Rezeptor die Transkription von Zytokinen wie IL-17A, IL-17F, IL-22 und IFN- γ (vgl. Abbildung 3).

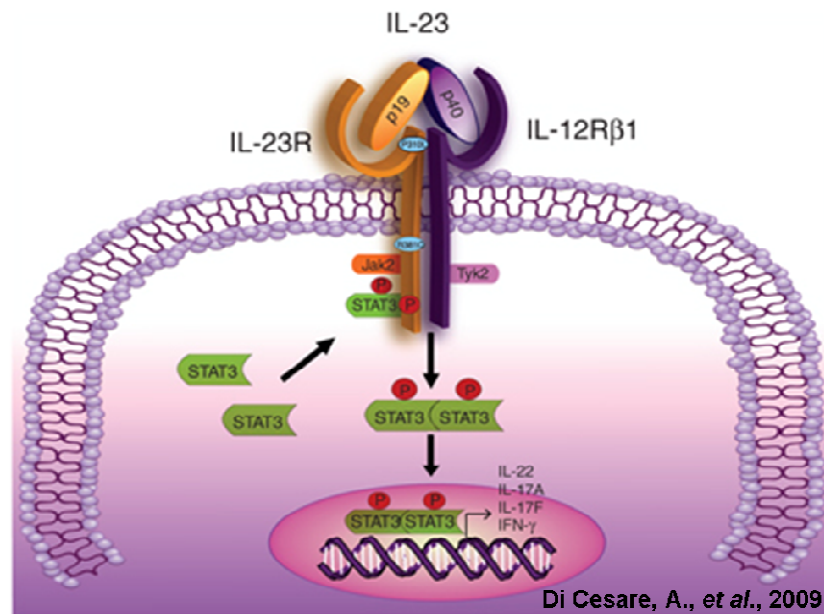


Abbildung 3: Signaltransduktionsweg von IL-23. Der Rezeptorkomplex des heterodimeren Zytokins IL-23 ist intrazellulär mit den Proteinen JAK2 bzw. TYK2 assoziiert. Bindet IL-23 an seinen Rezeptor, wird eine Signalkaskade ausgelöst, welche zur Translokation von phosphorylierten STAT-Molekülen an den Zellkern führt und die Transkription weiterer Zytokine initiiert.

1.3 Die biologische Funktion von IL-23

Die biologische Funktion von IL-23 ist sehr komplex und bei Weitem noch nicht in seinem ganzen Ausmaß verstanden und erforscht. Man kann seine Rolle zusammenfassend als Vermittler zwischen der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr und der adaptiven, spezifischen Immunabwehr beschreiben. Neben dem Zell-Zell-Kontakt und kostimulatorischen Interaktionen kommunizieren antigenpräsentierende Zellen (APCs: dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, B-Zellen) mit T-Zellen mittels Zytokinen. Kommen die APCs mit eingedrungenen Erregern oder veränderten Körperzellen in Kontakt, leiten sie die spezifische Immunabwehr durch die Produktion verschiedener Zytokine ein. Diese induzieren nachfolgend die Differenzierung und Expansion naiver T-Zellen zu reifen Phänotypen. Vor allem aktivierte dendritische Zellen und Makrophagen in Haut und Schleimhaut, die sogenannten Wächter des Immunsystems, besitzen die Fähigkeit, IL-23 zu produzieren (Oppmann *et al.*, 2000). Bereits einige Stunden nach Exposition exogener Erreger oder endogener Gefahrenzeichen lassen sie IL-23 frei, was wiederum eine schnelle Immunantwort der ortsansässigen T-Zellen hervorruft. Der

IL-23R wird vor allem auf aktivierten T-Zellen, T-Gedächtniszellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) exprimiert (Parham *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu dem ihm stark ähnelnden IL-12 fördert IL-23 nicht die Entwicklung von IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen. Es ist ein essentieller Faktor für die Differenzierung einer CD4⁺-T-Zellpopulation, die charakterisiert ist durch die Produktion von IL-17A, IL-17F, IL-6 und TNF- α (Langrish *et al.*, 2005; Aggarwal *et al.*, 2003), ein einzigartiges Muster von proinflammatorischen Faktoren. Diese neuartigen T-Zellen wurden Th17-Zellen genannt. IL-17 ist ein Zytokin, das sich unter anderem auf stromale, epitheliale und endotheliale Zellen auswirkt und die Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren sowie die schnelle Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zum Ort der Infektion oder zum geschädigten Gewebe bewirkt. IL-23 spielt demnach eine entscheidende Rolle bei der unmittelbaren Immunantwort auf Pathogene oder Verletzungen, indem es direkt die IL-17-Produktion hervorruft. Der IL-12-/IFN- γ -Weg induziert vor allem zytotoxische Faktoren, die für das direkte Eliminieren mikrobieller Erreger oder veränderter Zellen wichtig sind. Der IL-23-/IL-17-Weg hingegen ist mit lokalen Entzündungsreaktionen assoziiert und schafft mit Schwellung, Hitze und Schmerzen eine geeignete Umgebung für eine Immunantwort. In diesem Sinne ergänzen sich diese beiden Zytokine bei der Bekämpfung von schädlichen Faktoren.

1.4 IL-23 in humanen Erkrankungen

Nachdem herausgefunden wurde, dass IL-23 für die Reifung der Th17-Zellen verantwortlich ist, die eine Schlüsselrolle in autoimmunen Entzündungsgeschehen einnehmen (Langrish *et al.*, 2005), wurde eine Reihe von *in vivo* Versuchen und Humanstudien durchgeführt, welche die wesentliche Bedeutung von IL-23 für die Entstehung und Aufrechterhaltung von autoimmunen Entzündungsgeschehen und Tumor-assoziierten Entzündungen belegen. Im Laufe der letzten Jahre hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass IL-23 unerlässlich für die Krankheitsentstehung verschiedener Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis (RA), Psoriasis, Ankylosierender Spondylitis (AS) und chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) ist. Genomweite Assoziationsstudien konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen Varianten des *IL-23R* Gens und CED, AS, Multipler Sklerose (MS) und Psoriasis feststellen (Duerr *et al.*, 2006; Karaderi *et al.*, 2011; Nunez *et al.*, 2008; Cargill *et al.*, 2007). In dem betroffenen Gewebe von CED-Patienten konnte ein deutlicher Anstieg von Th17-Zellen und IL-17 ermittelt werden (McGovern *et al.*, 2007). Auch bei an RA erkrankten Patienten waren sowohl IL-17 als auch IL-23 im Serum, in der Synovialflüssigkeit und in der Synovia vorhanden, wohingegen beide Zytokine in gesunden Gelenken und bei Patienten mit Osteoarthritis fehlten (Brentano *et al.*, 2009). Die Konzentration von IL-17 korreliert positiv mit der Destruktion von

Kollagen, der Desorption von Knochen, der Zerstörung von Knorpelgewebe und der Produktion von Entzündungsfaktoren wie IL-6, IL-8 und den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Desweiteren konnte auch in Tierversuchen die bedeutende Rolle von IL-23 bei der Entstehung von autoimmunen Entzündungen in Modellen bestätigt werden: Indem sie mit IL-23-abhängigen, ZNS-spezifischen Th17-Zellen eine experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, eine der MS-ähnliche Erkrankung bei Versuchstieren, induzierten, konnten Langrish und Kollegen zeigen, dass diese T-Zellpopulation hochgradig pathogen ist (Langrish *et al.*, 2005). Uhlig und Kollegen beobachteten, dass die CD-40 induzierte Kolitis abhängig ist von der p19-Sekretion und dass IL-23 für das lokale Entzündungsgeschehen verantwortlich ist (Uhlig *et al.*, 2006). Die Kollagen-induzierte Arthritis ist ein Modell für RA, das von Murphy und Kollegen an genmodifizierten Mäusen angewendet wurde, denen entweder IL-12 (p35^{-/-}) oder IL-23 (p19^{-/-}) fehlten. Sie konnten zeigen, dass bei der spezifischen Abwesenheit von IL-23 die Mäuse keine klinischen Symptome der Erkrankung zeigten und sie komplett gegen die Entwicklung von Gelenk- und Knochenerkrankungen resistent waren. Diese Resistenz korrelierte stimmiger Weise mit der Abwesenheit von Th17-Zellen, die IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen hingegen wurden normal produziert (Murphy *et al.*, 2003). Alle Untersuchungen zu diesem Thema, von denen hier nur exemplarisch einige herausgegriffen wurden, belegen eindeutig, wie essentiell IL-23 für die Entstehung von autoimmunen Entzündungserkrankungen ist.

Schon lange werden kausale Zusammenhänge zwischen chronischem Entzündungsgeschehen und der Entstehung von Krebs vermutet (Balkwill *et al.*, 2001). Mehrere Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass genetische Polymorphismen im *IL-23R*-Gen mit einem erhöhten Risiko an verschiedenen Arten von Krebs zu erkranken, assoziiert sind (Zheng *et al.*, 2012; Chu *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2010). IL-23 scheint das Tumorwachstum durch die Induktion von Entzündungen in der Umgebung des Tumors zu fördern. In der Tat führen Tumor-assoziierte Entzündungen - wie auch chronische Entzündungen - zur Infiltration von Zellen der angeborenen Immunabwehr, verstärkter Angiogenese und erhöhter Aktivität von Matrix-Metalloproteasen (MMP) (Coussens *et al.*, 2002), während sich die zytotoxische Aktivität Tumor-infiltrierender CD8⁺-T-Zellen protektiv auf die Entstehung von Krebs auswirkt (Dunn *et al.*, 2004). Langowski und Kollegen konnten zeigen, dass die Expression von IL-23 in humanen Tumoren signifikant erhöht ist und zur Verstärkung der Angiogenese und Hochregulierung der MMP β führt, die CD8⁺-T-Zellinfiltration aber reduziert ist (Langowski *et al.*, 2006). Direkte Einflüsse von IL-23 auf Tumorzellen hingegen konnten nicht eindeutig belegt werden und werden widersprüchlich diskutiert (Li *et al.*, 2013).

1.5 IL-15 und IL-15R α

Wie auch IL-23 gehört Interleukin-15 (IL-15) zur Familie der 4-Helix-Bündel-Struktur-Zytokine (Nicola *et al.*, 1998) und übt seine Funktion über einen trimeren Rezeptorkomplex aus, der aus einer hochaffin bindenden α -Kette und den β - und γ -Ketten des IL-2R besteht. Der α -Rezeptor von IL-15, IL-15R α , ist ein Transmembranprotein, das mit dem IL-2R α verwandt ist (Giri *et al.*, 1995). Es wurde aufgrund seiner Fähigkeit, IL-2-vermittelte T-Zellproliferation nachzuahmen, entdeckt (Grabstein *et al.*, 1994). Nur geringe Mengen an IL-15 werden in löslicher Form exprimiert, APCs hingegen exprimieren es auf ihrer Oberfläche bereits assoziiert mit seinem IL-15R α . Der IL-15-/IL-15R α -Komplex bindet nun an die β - und γ -Untereinheiten des IL-15-Rezeptors, die sich vor allem auf CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen befinden (vgl. Abbildung 4A). Bei diesen Zellen induziert IL-15 die Proliferation, Homöostase und Aktivierung (Budagian *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2006). Somit nimmt es in der Regulation der entzündlichen Immunantwort eine bedeutende Rolle ein. Die außergewöhnlich hohe Bindungsaffinität des IL-15 zu seinem IL-15R α basiert auf der Zytokinbindedomäne des IL-15R α , die so genannte sushi-Domäne. Sushi-Domänen sind weit verbreitete Strukturen und bestehen typischerweise aus 60 – 70 Aminosäuren mit zwei Disulfidbrücken. Sie werden häufig bei Proteinen gefunden, die im

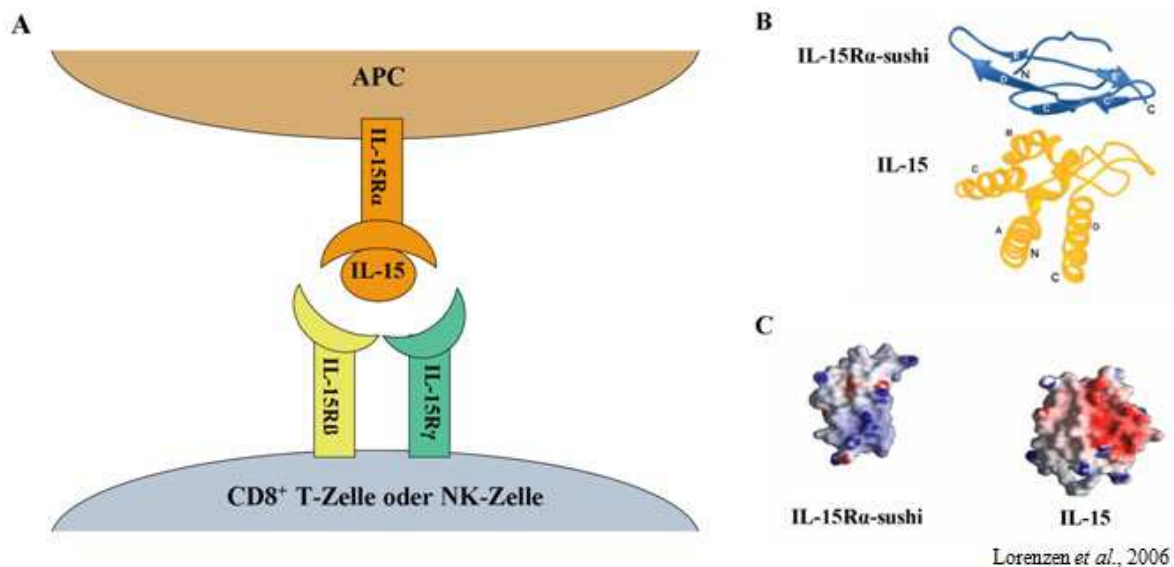


Abbildung 4: Interaktion des Interleukin-15 mit seinem Rezeptorkomplex, Struktur und elektrostatisches Oberflächenpotential von IL-15 und IL-15R α . (A) Interleukin-15 wird, bereits assoziiert mit seinem IL-15R α , von APCs präsentiert. Es bindet an die Rezeptoruntereinheiten IL-15R β und IL-15R γ , welche von CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen exprimiert werden. (APC = Antigenpräsentierende Zelle, NK-Zelle = natürliche Killerzelle) (B) Modell des Komplexes aus IL-15R α -sushi-Domäne (blau) und IL-15 (gelb) als Schleifendarstellung (Lorenzen *et al.*, 2006). (C) Elektrostatisches Oberflächenpotential der IL-15R α -sushi-Domäne und IL-15. Negative Ladungen sind rot dargestellt, positive Ladungen blau. Die IL-15R α -sushi-Domäne und sein Ligand IL-15 wurden jeweils um 90° rotiert, der Rezeptor linkerhand und IL-15 rechterhand (Lorenzen *et al.*, 2006).

Komplementsystem und in der Gerinnungskaskade eine Rolle spielen (Perkins *et al.*, 1988; Norman *et al.*, 1991). Anhand der Strukturanalyse des IL-15/IL-15R α -Komplexes wurden neuartige Bindungsmechanismen entdeckt. Die außergewöhnliche Bindungsaffinität des Komplexes beruht nicht auf den bekannten hydrophoben Kräften anderer Zytokine und ihrer Rezeptoren, sondern erklärt sich in diesem Fall durch ein großes Netz ionischer Wechselwirkungen (Lorenzen *et al.*, 2006). In den Abbildungen 4B und 4C sind Struktur und elektrostatisches Oberflächenpotential von IL-15 und IL-15R α dargestellt. Die hohe Bindungsaffinität ist für die biologischen Effekte von IL-15 essentiell und konnte bislang noch bei keinem anderen Zytokin-Rezeptor-Komplex beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit wird sich diese besondere Eigenschaft zur Erschaffung eines ligandenunabhängigen, konstitutiv aktiven IL-23-Rezeptorkomplexes zu Nutze gemacht.

1.6 Zielsetzung und Methodik

Das Ziel der Arbeit war die konstitutive ligandenunabhängige Heterodimerisierung des IL-23-Rezeptorkomplexes und die anschließende Überprüfung auf dessen Expression und Funktionalität. Um dies zu erreichen, sollte der gesamte extrazelluläre Teil der beiden IL-23-Rezeptoruntereinheiten mit dem Zytokin IL-15 bzw. der sushi-Domäne des IL-15R α ersetzt werden, die, wie zuvor beschrieben, einen hoch affinen stabilen Komplex bilden (Lorenzen *et al.*, 2006). Mithilfe der retroviralen Transduktion sollen Ba/F3 gp130 Zellen geschaffen werden, die beide chimäre Rezeptoren, IL-15-IL-23R und sushi-IL-12R β 1, auf ihrer Oberfläche tragen und aufgrund dessen ein zytokinunabhängiges Wachstum zeigen. Anschließend sollten die transduzierten Zellen hinsichtlich ihrer Genexpression und Oberflächenexpression der einzelnen chimären Rezeptorkomponenten untersucht werden. An Hand der Analyse des Signaltransduktionsweges sollte außerdem die Aktivität und Funktionalität des artifiziell dimerisierten IL-23-Rezeptorkomplexes nachgewiesen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien stammen – sofern nicht anders im Text vermerkt – von den Firmen Carl Roth GmbH + Co (Karlsruhe, BRD), Merck KGaA (Darmstadt, BRD), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, BRD) und Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, BRD).

2.1.2 Zelllinien und Bakterienstämme

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Ursprung	Kultivierung	Herkunft
Ba/F3 gp130	Ba/F3 Zellen stabil transfiziert mit humanem gp130	Zellkulturmedium DMEM + 10 ng/ml Hyper-IL-6	Immunex (Seattle, WA), Gearing <i>et al.</i> , 1994
Phönix-Eco	293T-Zelllinie transduziert mit dem Adenovirus E1a	Zellkulturmedium DMEM	U. Klingmüller (DKFZ, Heidelberg, BRD)

Escherichia coli

Der *Escherichia coli* Stamm XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA) wurde für die Vektoramplifikation und Subklonierung verwendet (Bullock *et al.*, 1987). Die Anzucht (Fest- sowie Flüssigkultur) erfolgte mit LB-Medium mit dem plasmidspezifischen Antibiotikum über Nacht bei 37 °C (Flüssigkultur: 240 rpm).

2.1.3 Medien und Antibiotika

Tabelle 2: Liste der verwendeten Selektionsantibiotika.

Antibiotikum	eingesetzte Konzentration	Hersteller
Ampicillin	50 µg/ml	Roth
Kanamycin	30 µg/ml	Roth
Streptomycin	100 mg/l	PAA
Penicillin	60 mg/l	PAA
Puromycin	1,5 µg/ml	Sigma-Aldrich

Zellkulturmedium DMEM +/+	DMEM High Glucose (4,5 g/ml) + 10 % (v/v) Fetales Kälberserum (FCS) + 60 mg/l Penicillin + 100 mg/l Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Marburg, BRD)
Zellkulturmedium IMDM	(Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, BRD)
LB-Medium	10 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 1 l H ₂ O _{dd} (20 g Agar: Zusatz nur bei Nährmedium für Platten)

2.1.4 Plasmide

Tabelle 3: Herkunft der verwendeten Plasmide und deren Resistenzen. Kan^R: Kanamycinresistenz, Amp^R: Ampicillinresistenz, Puro^R: Puromycinresistenz

Plasmid	Resistenzen	Herkunft
pMk-FUSIO	Kan ^R	Suthaus <i>et al.</i> , 2010
pCR-script-2A-IL-12Rβ1	Amp ^R	Dr. Doreen Floß
pCR-script-2A-IL-23R	Amp ^R	Dr. Doreen Floß
pMk-FUSIO-WSX-1-IL-12Rβ1	Kan ^R	diese Arbeit
pMk-KONNI	Kan ^R	diese Arbeit
pMOWS-GFP	Amp ^R / Puro ^R	Ketteler <i>et al.</i> , 2002
pMOWS-KONNI	Amp ^R / Puro ^R	diese Arbeit
p409-YFP	Amp ^R	Giri <i>et al.</i> , 1994
p409-KONNI	Amp ^R	diese Arbeit

2.1.5 Oligonukleotide

Alle Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried, BRD) synthetisiert.

Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz 5' - 3'
T7-Promoter _{for}	TAATACGACTCACTATAGGG
pMOWS _{for}	CCCCTTGAAC CTCCTCGTTC
p409 _{for}	ACTCTTGGAT CGGAAACCCG
mIL-12R β 1 _{for}	GCACTAGTGC CTGGAGTCATCCCCAG
mIL-12R β 1 _{rev}	GCCTCGAGTCAGGCCTCTTGCCCCAA
mIL-23R _{for}	GCACTAGTGCTACAATCTTCAGAGGACATCCT
mIL-23R _{rev}	GCCTCGAGCT TTTGGAAGAGTGAAATTCTACTGA
β -actin _{for}	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA
β -actin _{rev}	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC
SPgp130-FUSIO _{for}	ATGCTGACCCTGCAGACC
KONNI-mIL-12RpR _{rev}	ACCACTGCCAAGCCTGCTTG
IL-15 _{for}	GCGATATCTCTAGAGCCACCATGGACAGCAAG

2.1.6 Antikörper

Tabelle 5: Antikörper für Western Blot und FACS-Analyse.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Maus-anti-STAT3	Cell Signaling, New England Biolabs (Schwalbach, BRD)	1:1000
Kaninchen-anti-STAT1	Cell Signaling	1:1000
Kaninchen-anti-ERK1/2	Cell Signaling	1:1000
Kaninchen-anti-phospho-STAT3 (Tyr705)	Cell Signaling	1:1000
Kaninchen-anti-phospho-STAT1	Cell Signaling	1:1000
Kaninchen-phospho-ERK1/2	Cell Signaling	1:1000
Kaninchen-anti-Myc (71D10)	Cell Signaling	1:100
Maus-anti-Human IL-15	Peprotech, Cell Concepts (Umkirch, BRD)	1:100
Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	Probes, Invitrogen (Karlsruhe, BRD)	1:100
Ziege-anti-Maus APC	Dianova (Hamburg, BRD)	1:100

2.1.7 Enzyme und Zytokine

Alle DNA-modifizierenden Enzyme und die benötigten Puffer wurden bei Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, BRD) erstanden.

Das Designer-Zytokin Hyper-IL-6 (H-IL-6) ist ein Fusionsprotein von IL-6 und sIL-6-R und wurde, wie von M. Fischer beschrieben (Fischer *et al.*, 1997), hergestellt und in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt.

2.1.8 Lösungen und Puffer

5× TBE	44,5 mM Tris 44,5 mM Borsäure 10 mM EDTA (Gibco, Invitrogen) pH 8,0
6× DNA-Ladepuffer	3 ml Glycerol 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) Spatelspitze Bromphenolblau Spatelspitze Xylencyanol auf 10 ml H ₂ O _{dd} auffüllen
6× Laemmli-Puffer	4,2 ml H ₂ O _{dd} 1,0 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 0,8 ml Glycerol 1,6 ml 10 % SDS 0,4 ml β-Mercaptoethanol Spatelspitze Bromphenolblau
10× PBS	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ pH 7,4

1× Transferpuffer	250 mM Tris 2 M Glycin 20 % Methanol pH 8,5
10× TBS	24,2 g Tris 80 g NaCl pH 7,4
1× TBST	1× TBS 0,1 % Tween 20
Blockierpuffer	5 % Milchpulver in 1× TBST
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris-HCl (pH 6.8) 2 % SDS 0,1 % β -Mercaptoethanol
Lysis-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 150 mM NaCl 2 mM EDTA, 1 mM NaF 1 mM Na_3VO_4 1 % IGEPAL (NP-40) 1 % Trition-X-100 Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet
FACS-Puffer	1 % BSA (ICN Biomedicals GmbH, Frankfurt am Main, BRD) in 1× PBS

2.1.9 Sonstige Reagenzien und Kits

DreamTaq-Puffer (10×) Fermentas

MgCl ₂	Fermentas
dNTP-Mix	Fermentas
Trypsin/EDTA (10×)	PAA
1 kb DNA Marker	250 b bis 10 kb, Fermentas
Prestained Protein Molecular Marker	19,0 - 119 kDa, Fermentas
ECL Plus Westernblotting	GE Healthcare (München, BRD) Detection System
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH (Hilden, BRD)
Turbofect	Fermentas
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel (Düren, BRD)
Plasmid DNA Purification Kit	Macherey-Nagel
NucleoBond®Xtra Midi	
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen
CellTiter-Blue Cell Viability Assay	Promega (Mannheim, BRD)
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific (Bonn, BRD)

2.1.10 Arbeitsgeräte

2.1.10.1 Mikroskope

Televal 31	Zeiss
Axiovert 200 Mikroskop	Zeiss

2.1.10.2 Zentrifugen

Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Heraeus Function Line	Heraeus Instruments
Jouan C3	Thermo Electron
Assistant RM5	EYDAM

2.1.10.3 Inkubatoren

Brutschrank	Binder
Incubator Shaker Innova 4000	New Brunswick Scientific

HeraCell CO ₂ -Inkubator	Heraeus Instruments
Thermomixer compact	Eppendorf

2.1.10.4 Elektrophorese

Wide Mini-sub cell GT	Bio-Rad
PowerPac Basic	Bio-Rad
UV-Transilluminator	Biometra
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad

2.1.10.5 Photometer

96-well-Photometer SCT Rainbow	Tecan
Lambda Fluoro 320 Fluorimeter	MWG-Biotech AG

2.1.10.6 Sonstige Geräte

Milli-Q Academic System	Millipore
FlourChemQ Imaging System	Alpha Innotech
GelDoc 2000	Bio-Rad
Robocycler Gradient 96	Stratagene
PeqStar 96 Universal Gradient	Peqlab
NuAire Biological Safety Cabinets	Nuaire

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Arbeiten

2.2.1.1 Plasmid-DNA-Mini-Präparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAGEN Plasmid Mini Kit nach Anleitung des Herstellers (Qiagen).

Zur Gewinnung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien wurden 2 ml Bakterienkulturen über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert und anschließend bei 8.000 rpm 3 min lang zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl RNase-haltigem eiskaltem Resuspensionspuffer resuspendiert. Mittels 200 µl Lysis-Puffer wurden die bakteriellen

Membranen aufgebrochen, dann wurden die Proben invertiert und 10 min auf Eis inkubiert, bevor 200 µl eiskalter Neutralisationspuffer hinzugegeben wurde. Dieser führt zum Ausfallen der Proteine, welche nach weiteren 10 min auf Eis durch 15-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm von der im Überstand enthaltenen Plasmid-DNA getrennt wurden. Zu 600 µl sauberem Überstand wurde 420 µl Isopropanol gegeben, um die DNA auszufällen, die dann nach 15-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm durch die Zugabe von 200 µl 70%-igem Ethanol gewaschen wurde. Das Ethanol wurde mit der Pipette nach erneutem Zentrifugieren vorsichtig wieder entfernt, das Pellet luftgetrocknet und anschließend in 30 µl H₂O_{dd} resuspendiert.

2.2.1.2 Plasmid-DNA-Midi-Präparation

Zur Isolation größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde das Plasmid DNA Purification Kit NucleoBond®Xtra Midi von Macherey-Nagel verwendet. Die Vorgehensweise folgt den Herstellerangaben. Das Bakterienpellet wurde in Resuspensionspuffer gelöst. Durch Zugabe eines Lysis-Puffer lysieren die Membranen und Proteine und die DNA denaturiert. Der Neutralisationspuffer enthält Kaliumacetat und lässt Proteine, chromosomale DNA und andere Zellbestandteile ausfallen. Desweiteren wurde eine Säule, die das Prinzip des Anionenaustauscherharzes benutzt, verwendet. Diese enthält hydrophile, großporige Siliziumkügelchen, gekoppelt mit Methyl-Ethylamin-Gruppen. Die negativ geladene DNA bindet an diese Gruppen, während die restlichen Zellbestandteile passieren können.

Nach dem Waschen der Säule und Elution der DNA wird diese mit Isopropanol ausgefällt und mit Ethanol gewaschen. Das Pellet wird luftgetrocknet und in 20 µl H₂O_{dd} gelöst.

2.2.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Applikation von 1 µl DNA im NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer. Die Konzentrationsangabe wird in der Einheit ng/µl angegeben.

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in 0,7 - 2%-igen (w/v) Agarosegelen (Cambrex BioScience Rocklan Inc.) versetzt und mit 0,05 % (v/v) Ethidiumbromid bei konstanter Spannung (60 – 130 V) aufgetrennt. Die DNA wurde hierfür mit 6× Ladepuffer versetzt. Zur Abschätzung der Größe der Fragente wurden definierte Mengen DNA-Marker mit aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mittels UV-Transilluminator. Zur Klonierung vorgesehene DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt, unter UV-Licht aus den Gelen ausgeschnitten und anschließend mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit extrahiert.

2.2.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion und Kolonie-PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist ein von Karry Mullis (Mullis *et al*, 1987) entwickeltes Verfahren zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Eine typische PCR wird in der Regel bei drei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Die Reaktion startet mit der Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge. Dann folgt eine sequentielle Abfolge von Denaturierung, Anlagerung der zur DNA komplementären Primer und Synthese des neuen DNA-Strangs. Dieser Vorgang wird um die 20 bis 35 Mal wiederholt.

Eine Standardreaktion setzte sich wie folgt zusammen:

Template (Ausgangs-DNA)	1-100 ng
PCR-Puffer (10×)	5 µl
MgCl ₂	(25 mM)
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
3'-Primer (10 pM)	2 µl
5'-Primer (10 pM)	2 µl
DNA-Polymerase (1 U/µl)	1 µl
H ₂ O _{dd}	ad 50 µl

Tabelle 6: Standardprogramm für die durchgeführten PCRs.

Initiale Denaturierung	5 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	
Anlagerung der Primer	T _{opt}	1 min	~ 35 Zyklen
Elongation	72 °C	30 – 60 s	
Finale Elongation	72 °C	5 min	

Die Kolonie-PCR wurde eingesetzt, um Bakterienkolonien auf eine erfolgreiche Transformation der Plasmide zu überprüfen. Als *template* diente hier die gesamte Bakterienkolonie mit der in den Kolonien enthaltenen DNA.

2.2.1.6 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme schneiden DNA an spezifischen Nukleotidsequenzen, Palindrome von 4 bis 8 Nukleotiden, indem sie die Phosphordiesterbindungen zwischen den Nukleotiden spalten. Dies kann versetzt (*sticky ends*) oder glatt (*blunt ends*) erfolgen. Die Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellers (Fermentas) durchgeführt.

Sind beim Restriktionsverdau DNA-Fragmente mit *sticky ends* entstanden die anschließend als glatte Enden weiterverarbeitet werden sollten, wurden die 5'-überstehenden, einzelsträngigen DNA-Sequenzen mit dem Enzym Klenow-Fragment unter Zugabe von Nukleotiden aufgefüllt.

2.2.1.7 Dephosphorylierung

Um eine Religation nach Spaltung der Vektor-DNA zu verhindern, mussten die entstandenen Phosphatreste an den 5'-Enden der DNA - Fragmente entfernt werden. Für diese Reaktion wurde *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP) nach Angaben des Herstellers (Fermentas) eingesetzt.

2.2.1.8 Ligation von DNA

Ziel einer Ligation ist es, ein DNA-Fragment (*Insert*) mit einem zuvor linearisierten Vektor zu verknüpfen. Für die T4 DNA-Ligase (Fermentas) katalysierte Reaktion wurde die einzusetzende Masse an *Insert* mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Masse [ng] (Insert)} = \{5 * \text{Masse [ng] (Vektor)} * \text{Länge [bp] (Insert)}\} : \text{Länge [bp] (Vektor)}$$

Die Ligation wurde 2 h bei Raumtemperatur und anschließend bei 4 °C über Nacht inkubiert, bevor sie direkt zur Transformation genutzt wurde.

2.2.1.9 DNA - Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmide wurde von den Firmen SeqLab (Sequence Laboratories GmbH, Göttingen, BRD) und GATC Biotech AG (Konstanz, BRD) nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt.

2.2.1.10 mRNA - Nachweis

Um die Transkription von Genen mittels Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) nachzuweisen, wurden die zu untersuchenden Ba/F3 gp130 Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen, für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nun konnte aus dem Pellet mit Hilfe des NucleoSpin RNA II – Kit von Macherey-Nagel RNA isoliert werden. Aus 2 µg RNA wurde anschließend mit der RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) nach Angaben des Herstellers cDNA synthetisiert. Diese konnte nun mittels einer PCR nachgewiesen werden.

2.2.1.11 Transformation kompetenter Bakterien

Zu 50 µl auf Eis aufgetauten kompetenten E. coli XL 1 – Blue wurden 10 µl Ligationsansatz gegeben und die Mischung 5 – 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 1 min und eine erneute Inkubation für 5 min auf Eis. Nun wurde der Ansatz mit 500 µl LB-Medium (ohne Antikörperzugabe) versetzt und bei 37 °C bei 700 rpm eine Stunde geschüttelt. Anschließend wurden 150 µl der Bakterienlösung auf einer Agarplatte mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum verteilt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Klone mit dem gewünschten Vektor wurden im Anschluss durch Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA und/oder durch Kolonie-PCR identifiziert.

2.2.2 Proteinbiochemische Arbeiten

2.2.2.1 Zellyse

Zur Untersuchung der Signaltransduktionswege in transduzierten Ba/F3 gp130 Zellen wurden diese nach dreimaligem Waschen mit sterilem PBS 6 h lang in DMEM -/- Medium inkubiert. Die Positiv-Kontrollen wurden im Anschluss 15 min lang bei 37 °C mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 stimuliert. Die Zellen wurden nun zentrifugiert (5 min, 1000 rpm) und das Pellet direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lyse der Zellen erfolgte in Lysis-Puffer. Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte mittels des BCA Protein Assay Kits.

2.2.2.2 Quantifizierung von Proteinen

Die Konzentration des in den Zelllysaten enthaltenen Gesamtproteins wurde mit dem BCA Protein Assay Kit nach Angaben des Herstellers bestimmt. Als Standard diente eine BSA –Reihe mit unterschiedlichen Konzentrationen (ICN Biomedicals Inc.). Die Messung erfolgte in 96-Well-Platten mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm.

2.2.2.3 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE. Es kamen 4%-ige Sammelgele und 10%-ige Trenngele zur Anwendung. Um das Molekulargewicht zu bestimmen, wurde der Prestained Protein Marker genutzt. 20 µl Lysat wurden mit 5 µl 6× Laemmli-Puffer vermischt, 5 min lang bei 95 °C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1× SDS-Laufpuffer bei 120 - 180 V für 90 - 120 min.

Tabelle 7: Zusammensetzung eines 10 %-igen Sammelgels und eines 4 %-igen Trenngels für SDS-PAGE.

	Sammelgel [ml]	Trenngel [ml]
H ₂ O _{dd}	3,725	1,290
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	0,625	-
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	-	0,850
10 % SDS	0,050	0,033
Polyacrylamid	0,670	1,110
10 % APS	0,050	0,033
TEMED	0,010	0,003

2.2.2.4 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden nun in 1× Transferpuffer auf eine PVDF-Membran (GE Healthcare, München, BRD) per Semi-Dry Western Blot transferiert (15 V, 1 h). Zum Blockieren freier Bindungsstellen wurde die Membran für 2 h bei RT in 5 % Magermilchpulver in 1× TBST geschwenkt. Hierauf folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in 1 % Magermilchpulver in 1× TBST bei 4 °C über Nacht schwenkend. Die Membran wurde 3× 10 min mit 1× TBST gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper in 1 % Magermilchpulver in 1× TBST über 1 h bei RT inkubiert. Zum Schluss wurde die Membran wiederum mit 1× TBST gewaschen und mithilfe des ECL- Detection Kits (GE Healthcare) entwickelt. Die Signale wurden mit dem FlourChemQ Imaging System von Alpha Innotech ausgewertet. Bei der Untersuchung der Signaltransduktionswege wurden die Membranen zuerst mit Antikörpern gegen die phosphorylierten Formen von STAT1, STAT3 und ERK1/2 versetzt. Nach der Detektion wurden die Membranen mit Stripping-Puffer behandelt, um die gebundenen Antikörper wieder zu lösen (30 min bei 60 °C), wiederum 3× 10 min mit 1× TBST gewaschen, blockiert und mit Antikörpern gegen STAT1, STAT3 und ERK1/2 inkubiert.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Zellkultur

Sofern nicht anders im Text vermerkt, wurden alle Zellen in DMEM +/+ bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Entsprechend ihres Wachstums wurden die Zellen alle 3 – 4 Tage kokultiviert. Adhärente Zellen (Phönix-Eco Zellen) wurden nach Absaugen des Mediums mit 1 ml Trypsin-EDTA vom Boden gelöst, einmal mit 1× PBS gewaschen und im Verhältnis 1:20 neu ausgesät. Ba/F3 gp130 Zellen sind Suspensionszellen. Sie wurden im Verhältnis 1:50 in frischem Standardmedium DMEM +/+ neu ausgesät, das mit 10

ng/ml des Designerzytokins Hyper-IL-6 versetzt wurde, da Ba/F3 gp130 Zellen dieses zum Wachstum benötigen. Zum Einfrieren wurden ca. 5×10^6 Zellen in 90 % FCS + 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) aufgenommen und je 1 ml in Cyro-Pure Röhrchen in einem isolierten Isopropanol-Behälter bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht langsam tiefgefroren. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Aufgetaut wurden die Zellen im Wasserbad bei $37\text{ }^\circ\text{C}$. Nach sofortigem Waschen mit vorgewärmten Standardmedium DMEM +/+ wurden sie ausgesät.

2.2.3.2 Retrovirale Transduktion von Ba/F3 gp130 Zellen

Murine Ba/F3 gp130 Zellen wurden mit den retroviralen Vektoren pMOWS-KONNI 26, pMOWS-KONNI 39 und dem Kontrollvektor pMOWS-GFP stabil transduziert. Der Vektor pMOWS (Ketteler *et al.*, 2002) basiert auf einem Retrovirus und ist in der Lage, die Verpackungszelllinie Phönix-Eco zu transfizieren. Die betreffenden Gene werden dort sowohl translatiert als auch in genomische RNA transkribiert und diese in Viruspartikel verpackt. Die Partikel sind replikationsdefizient und somit nicht infektiös. Die RNA-enthaltenden Viruspartikel werden von den Phönix-Eco Zellen in den Überstand abgegeben und dieser für die Transduktion der Ba/F3 gp130 Zellen genutzt. Die virale RNA wird nach Umschreiben in cDNA durch die Reverse Transkriptase stabil in das Wirtsgenom der Zielzelllinie integriert. Der chimäre Rezeptor KONNI wird nach erfolgreicher Transduktion in der Ba/F3 gp130 Zelle konstitutiv exprimiert und ermöglicht somit eine Untersuchung der Konsequenzen einer dauerhaften Aktivierung des IL-23-Rezeptors. Die Resistenz gegen Puromycin erlaubt eine Selektion der stabil transduzierten Zellen.

Zur Durchführung der retroviralen Transduktion wurden 8×10^5 Phönix-Eco Zellen mit jeweils 1 μg DNA der Plasmide pMOWS-KONNI 26, pMOWS-KONNI 39 und pMOWS-GFP mithilfe von Turbofect (Fermentas) nach Herstellerangaben transfiziert. Die Transfektionseffizienz konnte anhand der GFP-Expression 24 h nach Transfektion abgeschätzt werden und betrug durchschnittlich um die 50 – 60 % (Axiovert 200 microscope, Zeiss). 250 μl des retroviralen Überstandes wurde filtriert (*low-protein-binding-filter*, 0,45 μm , Roth) und auf 1×10^5 Ba/F3 gp130 Zellen gegeben. Es wurden 3 μl Polybren (Endkonzentration 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hinzugefügt, gemischt und im Anschluss die Zellen bei 1800 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die transduzierten Zellen in Standardmedium DMEM +/+ mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 kultiviert. Die Selektion der transduzierten Zellen erfolgte 48 h nach Transduktion durch Zugabe von 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin. Die Zellen wurden, wie in 2.2.3.1 beschrieben, kultiviert und nach zweiwöchiger Antibiotikaselektion wurde das Hyper-IL-6 weggewaschen und die Zellen hinsichtlich ihres zytokinunabhängiges Wachstums überprüft.

2.2.3.3 Proliferationsassay

Ba/F3 gp130 Zellen wurden dreimal mit sterilem PBS gewaschen und in DMEM mit 10 % FCS resuspendiert. 5000 Zellen wurden in 100 μ l in einer 96-Well-Platte ausgesät und 3 Tage lang mit oder ohne Zytokin kultiviert. Die Messung der Zellproliferation erfolgte mittels des CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assays (Promega GmbH, Mannheim, BRD) nach Herstellerangaben. Sie beruht auf der Umsetzung des blauen Redoxfarbstoffs Resazurin in den pinkfarbenen, fluoreszenten Farbstoff Resorufin durch metabolisch aktive Zellen. Sterbende Zellen hingegen erzeugen kein fluoreszierendes Signal. Das Fluoreszenzsignal entspricht der Menge an gebildetem Resorufin und ist somit direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen. Zur Auswertung wurde das Lambda Fluoro 320 Fluorimeter (ex-filter 530/25, em-filter 590/35, sensitivity 75, Software KC4) genutzt. Alle Werte wurden dreifach gemessen und durch Subtraktion der Werte der Negativkontrolle von allen anderen Werten normalisiert.

2.2.3.4 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Der Nachweis der Expression der chimären Rezeptoren an der Zelloberfläche der transduzierten Ba/F3 gp130 Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden anti-IL-15 Antikörper bzw. anti-Myc (71D10) Antikörper in 100 μ l FACS-Puffer gelöst und 3×10^5 Zellen darin für 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden wiederum einmalig mit FACS-Puffer gewaschen und nachfolgend 3×10^5 Zellen pro 100 μ l FACS-Puffer mit den sekundären Antikörpern anti-Maus APC bzw. anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 versetzt und für 1 h auf Eis inkubiert. Nun wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen, in 500 μ l FACS-Puffer resuspendiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany; FACS-Canto and FACS DIVA software).

3 Ergebnisse

3.1 Generierung der erzwungenen, ligandenunabhängigen Dimerisierung des IL-23-Rezeptorkomplexes

Um die erzwungene ligandenunabhängige Heterodimerisierung des IL-23-Rezeptorkomplexes zu erreichen, wurde, bis auf 15 Aminosäuren, der gesamte extrazelluläre Teil der beiden Untereinheiten IL-23R und IL-12R β 1 mit dem Zytokin IL-15 bzw. mit der sushi-Domäne des IL-15R α ersetzt. Nachfolgend wurden die chimären Rezeptoren stabil in Ba/F3 gp130 Zellen transduziert. Die Interaktion zwischen der hoch positiv geladenen Oberfläche der sushi-Domäne und der stark negativ geladenen Oberfläche von IL-15 bewirkt eine konstitutive Dimerisierung des chimären Rezeptors (Lorenzen et. al., 2006), welche wiederum zu einer dauerhaften Aktivierung des Rezeptorkomplexes führt (Abbildung 5).

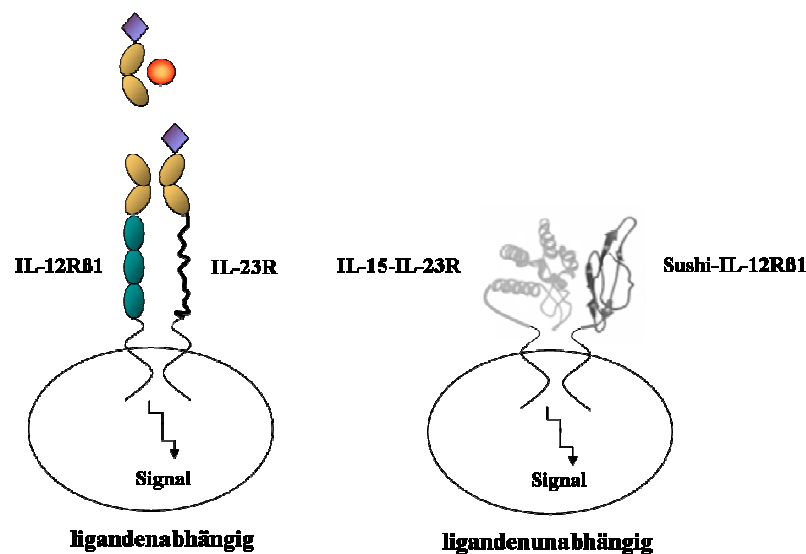


Abbildung 5: Zytokinunabhängige Proliferation der mit KONNI stabil transduzierten Ba/F3 gp130 Zellen. Ba/F3 gp130 Zellen, die stabil mit dem Fusionskonstrukt KONNI transduziert wurden, sind in der Lage ligandenunabhängig zu proliferieren. Die üblicherweise zytokininduzierte Dimerisierung der zwei Rezeptoren erfolgt im Falle der chimären Rezeptoren IL-15-IL-23R und sushi-IL-12R β 1 durch die Interaktion der hoch positiv geladenen Oberfläche der sushi-Domäne und der stark negativ geladenen Oberfläche von IL-15. Die konstitutive Dimerisierung führt zu einer dauerhaften Aktivierung des Rezeptorkomplexes und somit zur Signalweiterleitung in die Zelle, die deren Proliferation ermöglicht.

Der Transport des chimären Rezeptors IL-15-IL-23R zur Plasmamembran wurde mithilfe des Signalpeptids Rinderpräprolaktin (Bernard *et al.*, 2004) bewerkstelligt, der des sushi-IL-15R α -IL-12R β 1-Rezeptors mithilfe des humanen gp130 Signalpeptids. Um die Detektion der chimären Rezeptoren zu erleichtern, wurden N-terminal des Rezeptors IL-15-IL-23R ein FLAG-tag und

N-terminal des sushi-IL-15R α -Rezeptors ein Myc-tag ergänzt. Im Folgenden wird das Klonierungsverfahren ausführlich dargestellt.

3.2 Klonierung des Vektors pMk-hIL-15-IL-23R-sushi-mIL-12R β 1

Das Zielkonstrukt hIL-15-IL-23R-sushi-IL-15R α -mIL-12R β 1, im weiteren Verlauf KONNI genannt, wurde wie folgt konstruiert: Signalpeptid Rinderpräprolaktin (MDSKGSSQKAGSRLLLLLVVSNLLLCQGVVSTTR), FLAG-tag (DYKDDDDK), β - und γ -Rezeptorketten-bindungsdefizientes humanes IL-15, N-terminal gekürzter muriner IL-23R (15 Aminosäuren (AS) der extrazellulären Domäne (ED), Transmembrandomäne (TD) und zytoplasmatische Domäne (ZD)), furin cleavage site, 2A Peptid, humanes gp130 Signalpeptid (MLTLQTWLVQALFIFLTTESTG), Myc-tag (EQKLISEEDL), humanes sushi-IL-15R α -Proteinfragment und N-terminal gekürzter muriner IL-12R β 1 (15 Aminosäuren der ED, TD und ZD). Der Aufbau des Konstrukts KONNI ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

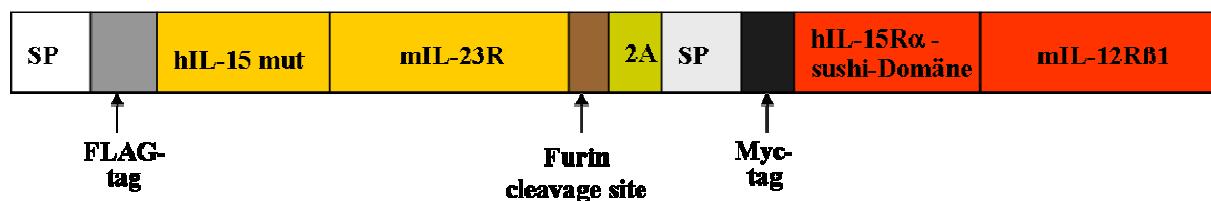


Abbildung 6: Vereinfachter schematischer Aufbau des Zielkonstrukts KONNI. Das Zielkonstrukt KONNI ist folgendermaßen aufgebaut (N-Terminus \rightarrow C-Terminus): Signalpeptid (SP), FLAG-tag, β - und γ -Rezeptorketten-bindungsdefizientes humanes IL-15, N-terminal gekürzter muriner IL-23R (15 Aminosäuren der ED, TD und ZD), furin cleavage site, 2A-Peptid, humanes gp130 Signalpeptid, Myc-tag, humanes sushi-IL-15R α -Proteinfragment und N-terminal gekürzter muriner IL-12R β 1 (15 Aminosäuren der ED, TD und ZD).

Ausgangspunkt der Klonierung war das Fusionskonstrukt FUSIO (Suthaus, *et al.*, 2010). Dieses besteht aus zwei chimären Rezeptoren, IL-15-WSX-1 und sushi-gp130. Diese können ohne Ligand dimerisieren, da IL-15 und die sushi-IL-15R α -Domäne einen hoch affinen stabilen Komplex bilden (Lorenzen *et al.*, 2006). Das Fusionskonstrukt ist in der Lage, zwei getrennte Proteine aus nur einem *open reading frame* zu exprimieren (vgl. Abbildung 7). Ermöglicht wird dies durch die 2A-Sequenz des FMD-Virus, das Peptide posttranslational spalten kann. Während der Sekretion wird das Signalpeptid entfernt und mit ihm der eine Teil des gespaltenen 2A-Peptids (1 AS). Der verbliebene 2A-Rest (23 AS) wird anschließend durch eine eingefügte furin cleavage site abgespalten (Fang *et al.*, 2005).

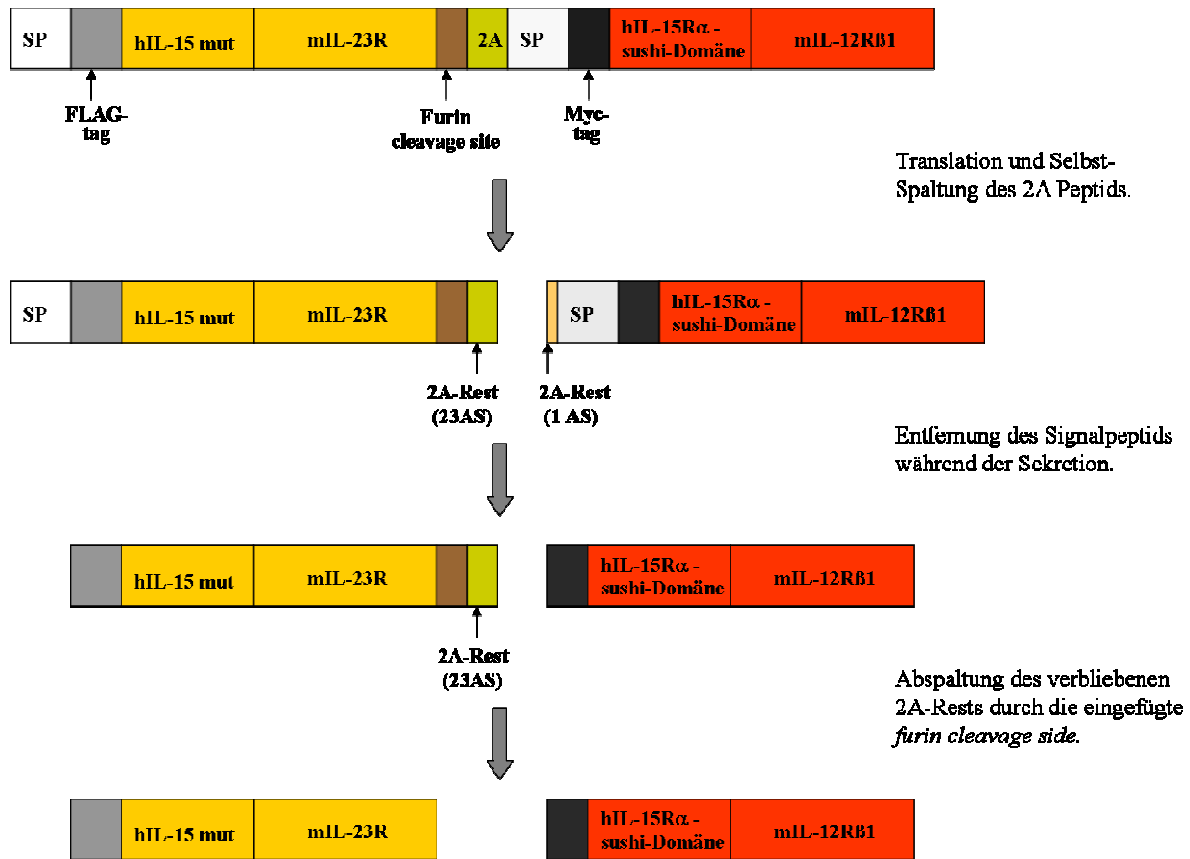


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Expression des Konstrukts KONNI mittels der 2A-Technologie. Durch Verknüpfung der zwei chimären Rezeptoren durch das 2A-Peptid des FMD-Virus wird die Expression des Fusionskonstrukts KONNI aus einem *open reading frame* ermöglicht. Die 2A-Sequenz ist in der Lage sich selbst am eigenen C-Terminus zwischen den zwei letzten Aminosäuren zu spalten. Dies geschieht durch einen enzymunabhängigen, bisher undefinierten Mechanismus während der Translation. Im Zuge der Sekretion spaltet sich das Signalpeptid und mit ihm der kürzere 2A-Rest ab. Der verbliebene 2A-Rest wird nun durch eine *furin cleavage site* entfernt und es entstehen zwei separate Proteine.

Abbildung 8 stellt das Klonierungsschema zur Konstruktion des Fusionskonstrukts KONNI schematisch dar. Zuerst wurde mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen *EcoRI* und *XhoI* die DNA-Sequenz für gp130 aus dem Vektor pMk-FUSIO herausgeschnitten (vgl. Abbildung 9A). Anschließend wurden die entstandenen Fragmente per Gelelektrophorese aufgetrennt und der linearisierte Vektor aus dem Gel extrahiert. Die im Folgenden verwendeten Plasmide pCR-script-2A-IL-12R β 1 und pCR-script-2A-IL-23R wurden freundlicherweise von Dr. Floss bereitgestellt und enthielten die Rezeptorkodierungssequenzen für den extrazellulär verkürzten IL-12R β 1 bzw. IL-23R. Das Plasmid pCR-script-2A-IL-12R β 1 wurde mit *EcoRI* und *XhoI* restringiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (vgl. Abbildung 9B), IL-12R β 1 aus dem Gel extrahiert und in den gespaltenen Vektor legiert. Das hierdurch entstandene Plasmid wurde pMk-FUSIO-WSX-1-IL-12R β 1 genannt. Mithilfe von Kolonie-PCR (Primer: mIL-12R β 1_{for} und mIL-

12R β 1_{rev}, vgl. Abbildung 9C) und Kontrollverdau mit *Eco*RI und *Xho*I (vgl. Abbildung 9D) konnten korrekte Klone ermittelt werden, die zur weiteren Klonierung verwendet wurden.

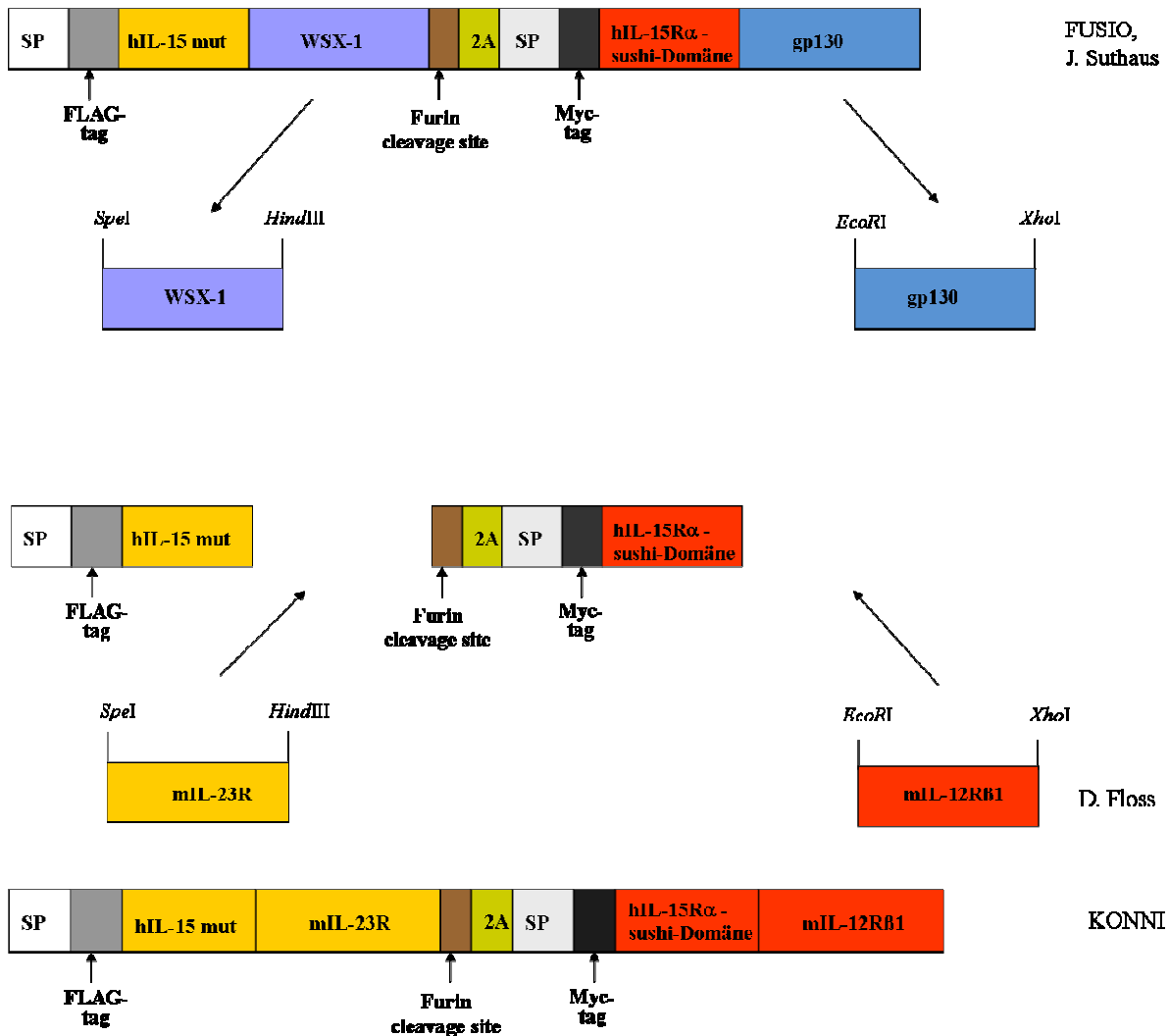


Abbildung 8: Klonierungsschema. Als Ausgangspunkt der Klonierung von KONNI diente das Konstrukt pMk-FUSIO. Mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen *Eco*RI und *Xho*I wurde die Sequenz gp130 herausgeschnitten und der verbliebene *backbone* mit dem N-terminal verkürzten IL-12R β 1 ligiert. Das somit entstandene Plasmid FUSIO-WSX-1-IL-12R β 1 wurde wiederum mit *Spe*I und *Hind*III restringiert und WSX-1 mittels Gelelektrophorese herausgetrennt. In den linearisierten Vektor FUSIO-mIL-12R β 1 wurde der extrazellulär gekürzte IL-23R ligiert. Das resultierende Plasmid erhielt die Bezeichnung KONNI.

Im weiteren Verlauf wurden sowohl der Vektor pCR-script-2A-IL-23R als auch pMk-FUSIO-WSX-1-IL-12R β 1 mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Spe*I verdaut und per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (vgl. Abbildung 10A und 10B). Anschließend wurden jeweils die

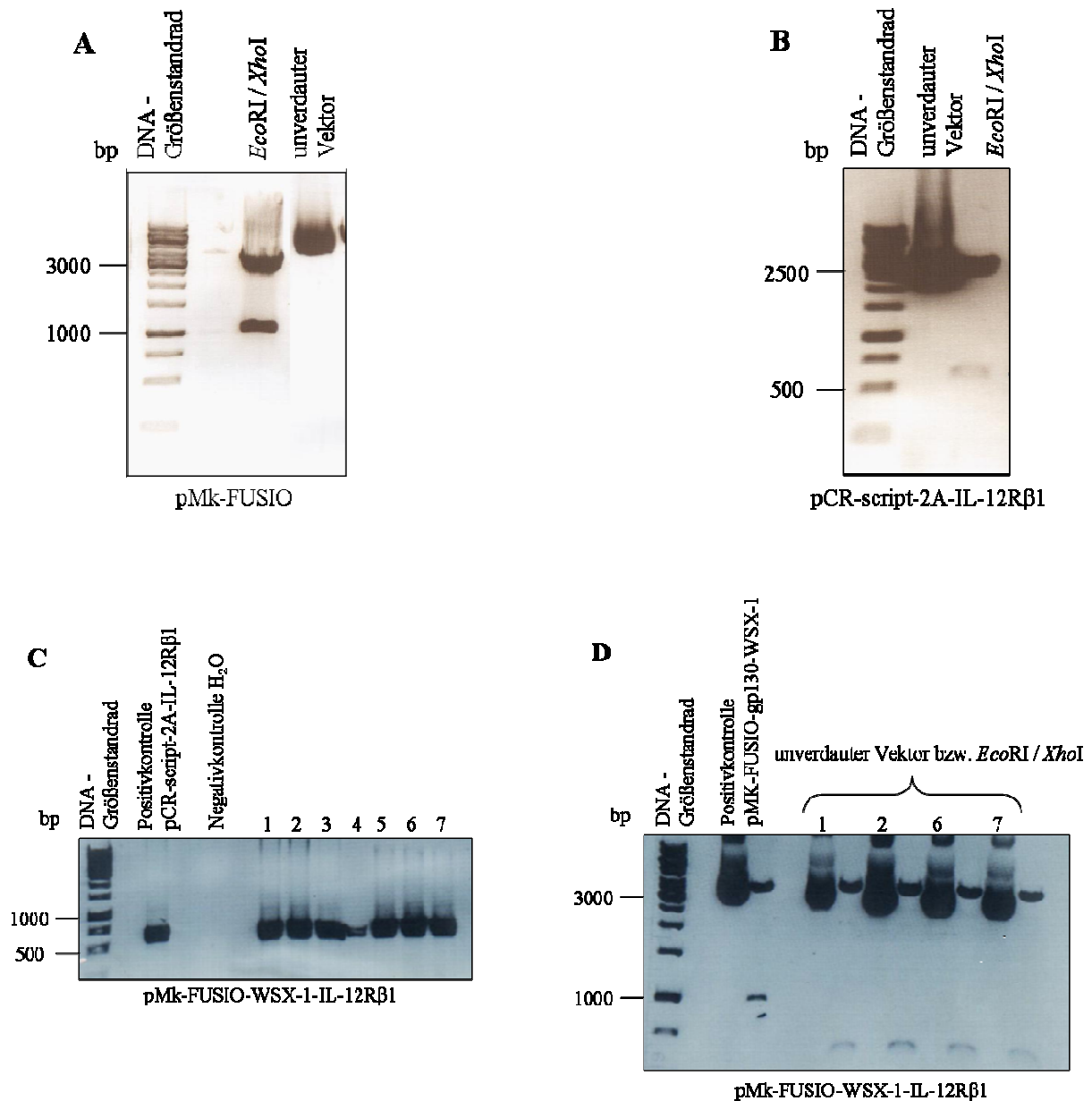


Abbildung 9: Gelelektrophoretische Analysen der Klonierung des Vektors pMk-FUSIO-WSX-1-IL-12Rβ1. (A) Restriktionsverdau von pMk-FUSIO mit *EcoRI* und *XhoI*. Wie erwartet wiesen die Fragmente eine Größe von 3589 bp und 951 bp auf. (B) Der Restriktionsverdau von pCR-script-2A-IL-12Rβ1 mit *EcoRI* und *XhoI* ergab zwei Fragmente von 2872 bp und 532 bp. (C) Anhand einer Kolonie-PCR des Vektors pMk-FUSIO-WSX-1-IL-12Rβ1 mit den Primern $mIL-12R\beta1_{for}$ und $mIL-12R\beta1_{rev}$ konnten mehrere Klone als korrekt ermittelt werden. (D) Ein Kontrollverdau von vier positiven Klonen (vgl. 9C) des Vektors pMk-FUSIO-WSX-1-IL-12Rβ1 mit *EcoRI* und *XhoI* zeigte die erwarteten Fragmente mit einer Größe von 3589 bp und 570 bp.

DNA-Abschnitte IL-23R und FUSIO- $mIL-12R\beta1$ aus dem Gel extrahiert und miteinander ligiert. Somit entstand das Plasmid pMk-hIL-15-IL-23R-sushi- $mIL-12R\beta1$, genannt pMk-KONNI. Eine Kolonie-PCR mit den Primern $mIL-23_{for}$ und $mIL-12R\beta1_{rev}$ (vgl. Abbildung 10C) und Restriktionsverdau mit *EcoRV* bzw. *SpeI* und *HindIII* (vgl. Abbildung 10D) ergaben zwei richtige Klone (3 und 12), die zur Verifizierung sequenziert wurden.

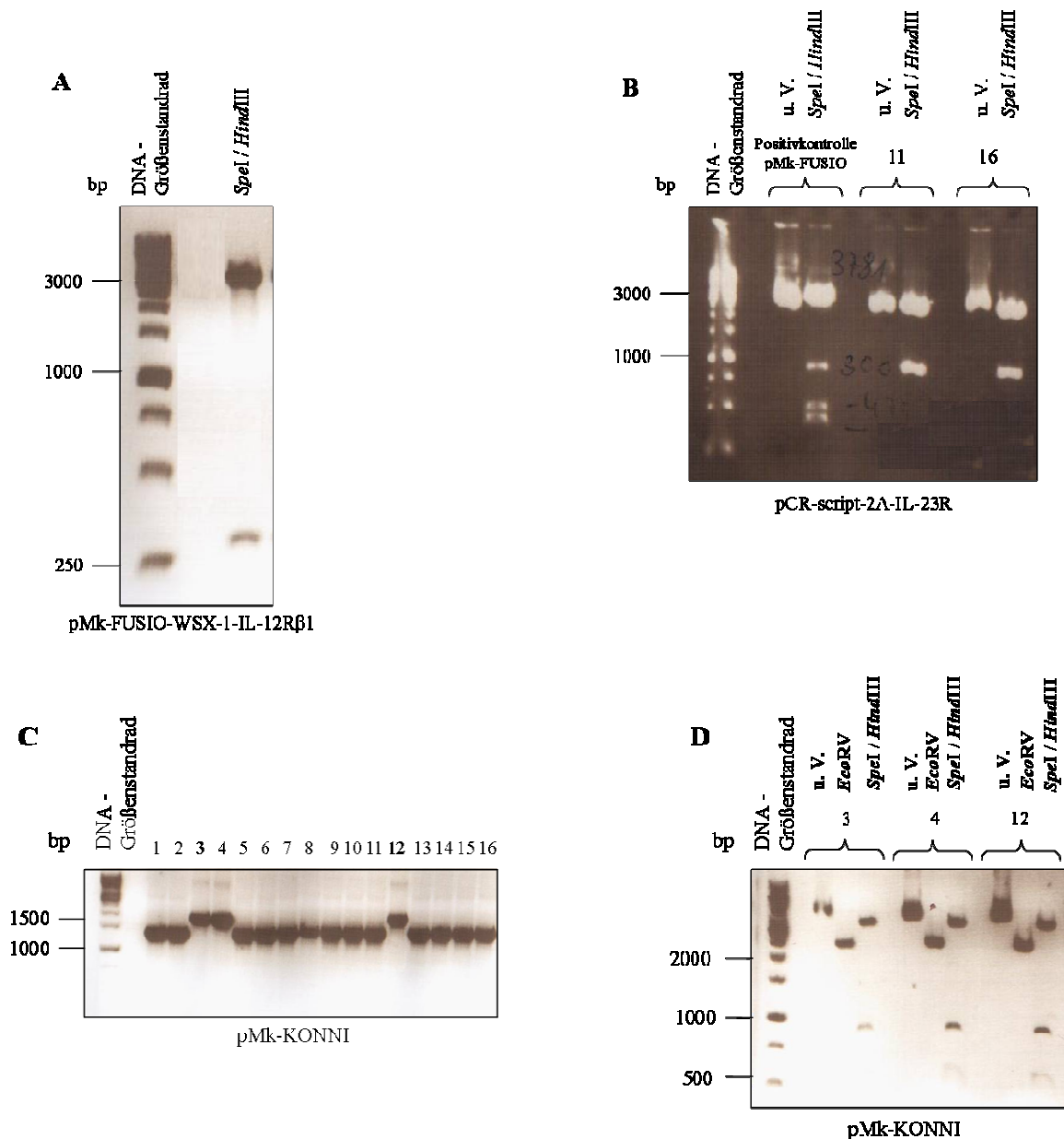


Abbildung 10: Gelelektrophoretische Analysen der Klonierung des Vektors pMk-KONNI. (A) Der Restriktionsverdau des Vektors pMk-FUSIO-WSX-1-IL-12Rβ1 mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *SpeI* ergab zwei Fragmente der Größe 3781 bp und 381 bp. (B) Restriktionsverdau des Vektors pCR-script-2A-IL-23R mit *HindIII* und *SpeI* mit zwei Fragmenten von 2872 bp und 800 bp. (C) Die Klone 3; 4 und 12 des Vektors pMk-KONNI stellten sich in eine Kolonie-PCR mit den Primern mIL-23_{for} und mIL-12Rβ1_{rev} als positiv dar. (D) Die Kontrollrestriktion der positiven Klone 3; 4 und 12 des Vektors pMk-KONNI mit *HindIII* und *SpeI* wies die erwarteten Fragmentgrößen von 3311 bp, 876 bp und 470 bp auf.

3.3 Subklonierung von KONNI in die Vektoren pMOWS und p409

Im nächsten Schritt wurde das Fusionskonstrukt KONNI zweifach subkloniert: in den retroviralen Vektor pMOWS und für zukünftige Expressionsstudien in den Expressionsvektor p409. Abbildung 11 stellt die zweifache Subklonierung des Konstrukts KONNI schematisch dar.

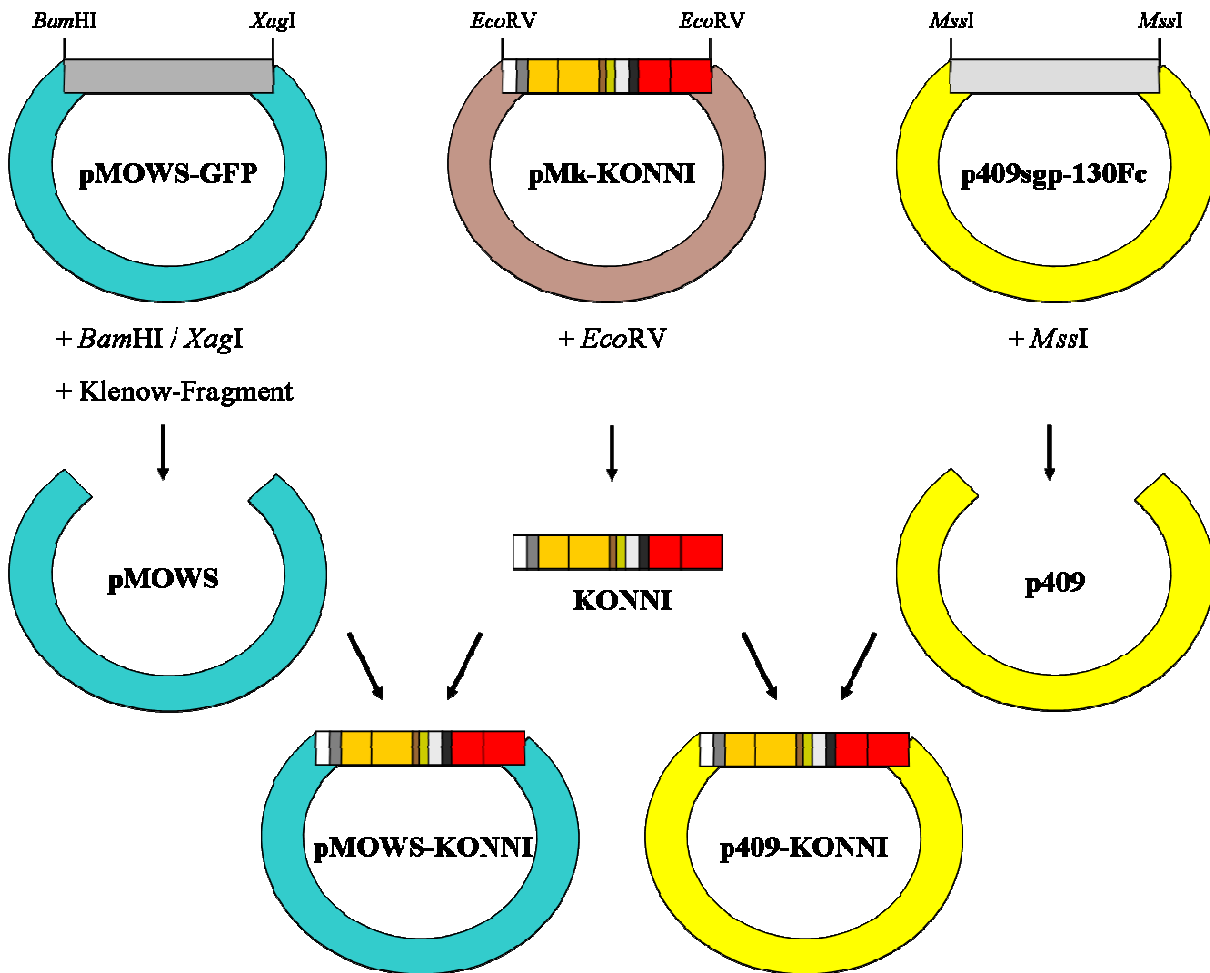


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Subklonierung des KONNI-Konstrukts. Durch Restriktionsverdau der Vektoren pMOWS-GFP (mit *Bam*HI und *Xag*I) und p409sgp-130Fc (mit *Mss*I) mit anschließender Gelextraktion wurden zwei Plasmide zur Subklonierung hergestellt: der retrovirale Vektor pMOWS und der Expressionsvektor p409. Nach Restriktionsverdau von pMk-KONNI mit *Eco*RV wurde die für KONNI kodierende Sequenz aus dem Gel extrahiert und in die zwei linearisierten Vektoren subkloniert.

Hierfür wurde das Plasmid pMk-KONNI (Klon 12) mit dem glatt schneidenden Restriktionsenzym *Eco*RV verdaut, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (vgl. Abbildung 12A) und der für KONNI kodierende Abschnitt aus dem Gel extrahiert. Um den linearisierten Vektor pMOWS zu erhalten, wurde pMOWS-GFP mit *Bam*HI und *Xag*I restringiert und nach der Auftrennung aus dem Gel (vgl. Abbildung 12B) extrahiert. Da diese Enzyme *sticky ends* produzieren, wurden mit dem Klenow-Fragment zuerst *blunt ends* geschaffen, dann der Vektor dephosphoryliert und mit KONNI ligiert. Per Restriktionsverdau mit *Spe*I (vgl. Abbildung 12C) und anschließender Sequenzierung konnten die Klone 26 und 39 des retroviralen Vektors pMOWS-KONNI als korrekt bestätigt werden.

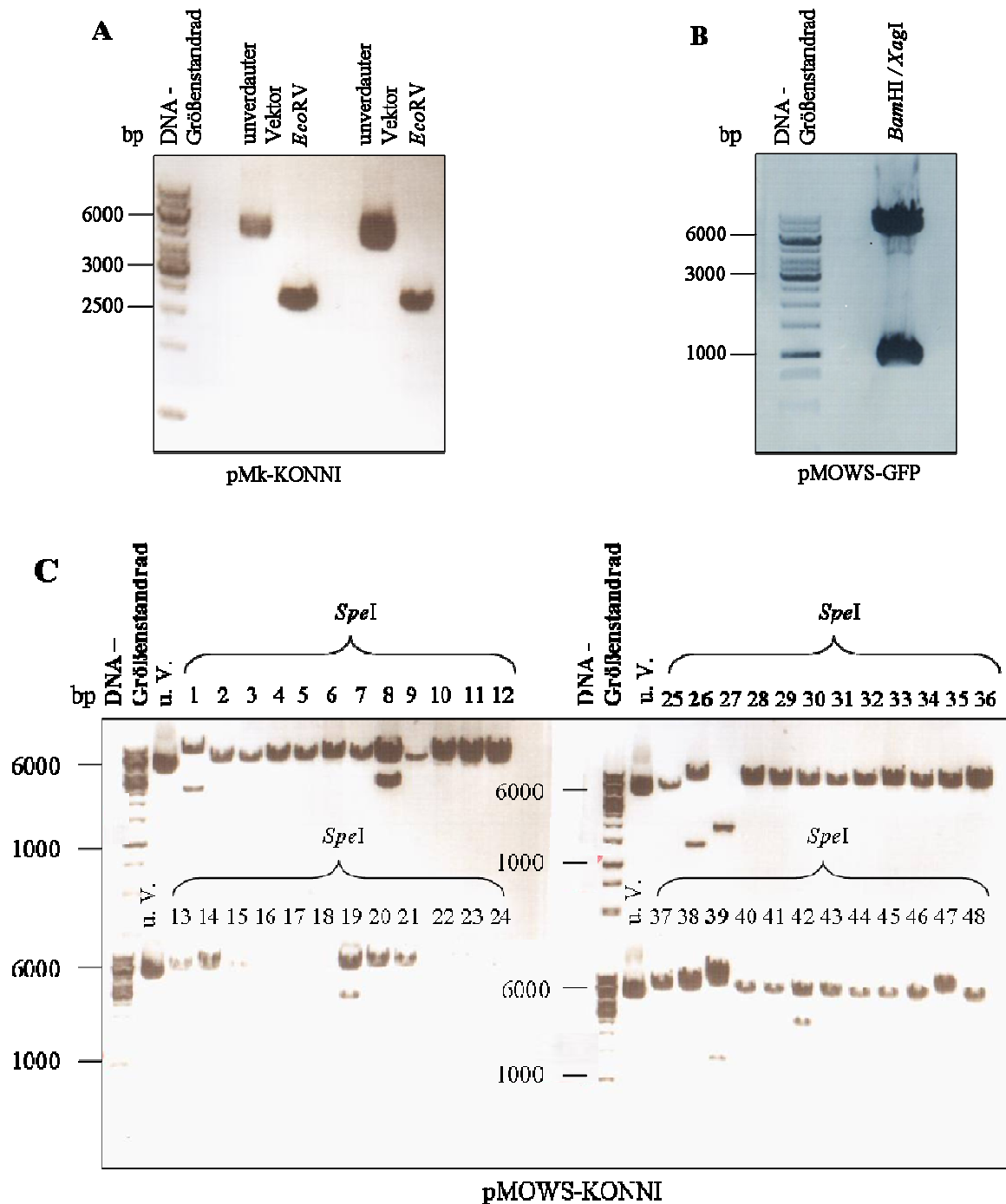


Abbildung 12: Gelelektrophoretische Analysen der Klonierung des Vektors pMOWS-KONNI. (A) Restriktionsverdau des Vektors pMk-KONNI mit *EcoRV* mit zwei Fragmenten der Größe 2352 bp und 2296 bp. (B) Der Restriktionsverdau des Vektors pMOWS-GFP mit den Enzymen *BamHI* und *XagI* ergab zwei Fragmente der Größe 5721 bp und 806 bp. (C) Durch einen Restriktionsverdau des Vektors pMOWS-KONNI mit *SpeI* konnten die Klone 26 und 39 mit den Fragmentgrößen von 6812 bp und 1261 bp als korrekt ermittelt werden.

Ebenso wie pMOWS wurde auch der Vektor p409sgp-130Fc mit dem ebenfalls glatte Enden generierenden Enzym *MssI* verdaut (vgl. Abbildung 13A). Im Anschluss wurde der *backbone* aus dem Gel extrahiert, dephosphoryliert und mit KONNI ligiert. Anhand von Kolonie-PCR

(Primer: p409_{fwd} und mL-23R_{rev}) (vgl. Abbildung 13B) und Restriktionsverdau mit *Hind*III bzw. *Spe*I (vgl. Abbildung 13C) wurde Klon 10 des resultierenden Plasmids p409-KONNI als korrekt ermittelt und im Weiteren durch Sequenzierung verifiziert.

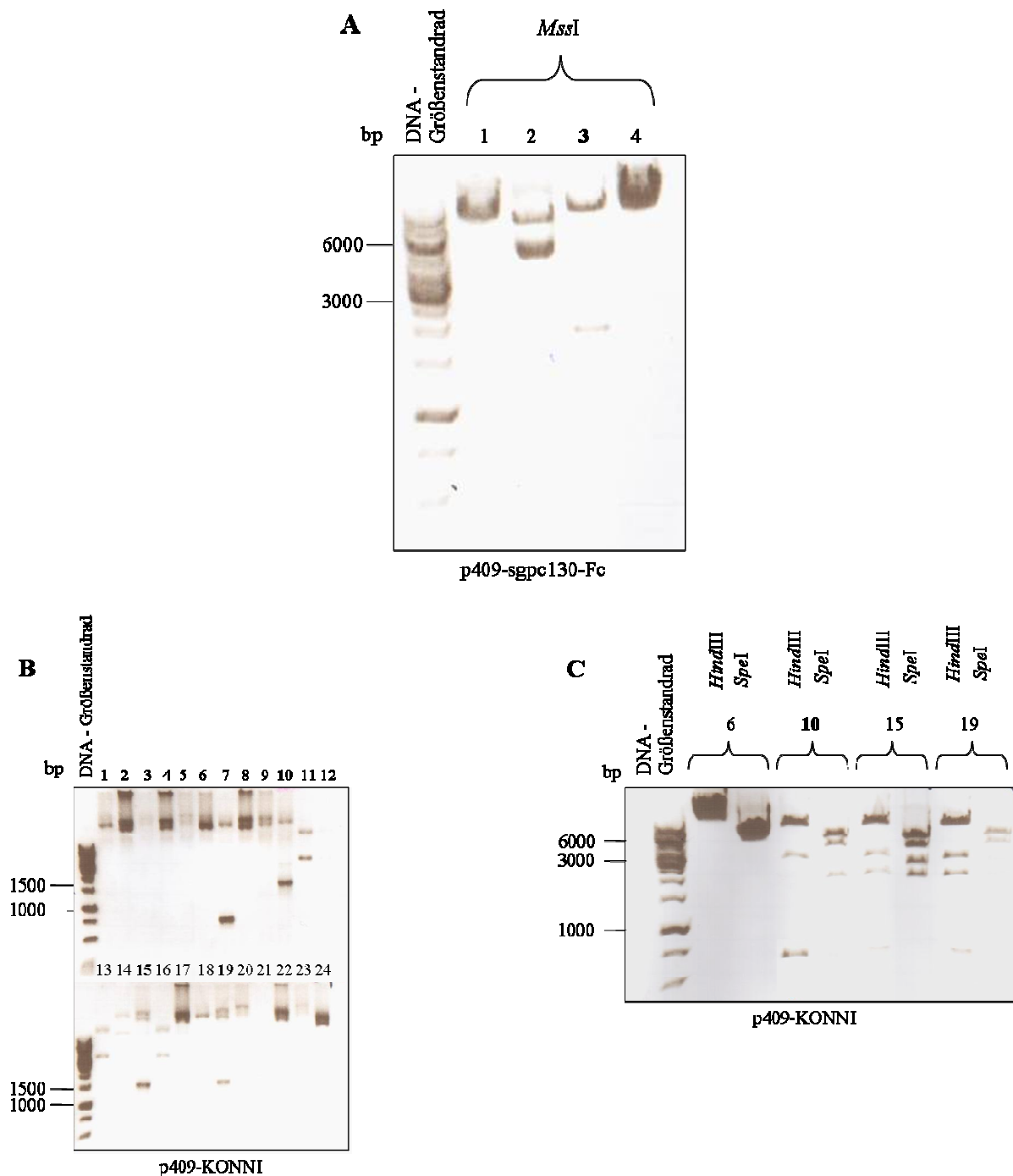


Abbildung 13: Gelelektrophoretische Analysen der Klonierung des Vektors p409-KONNI. (A) Bei dem Restriktionsverdau des Vektors p409sgp-130Fc mit dem Enzym *Mss*I zeigte Spur 3 die gewünschten Fragmente der Größe 2682 bp und 7603 bp. (B) Kolonie-PCR des Vektors p409-KONNI mit den Primern p409_{fwd} und mL-23R_{rev}. Die Klone 10; 15 und 19 wiesen das erwartete PCR-Produkt mit einer Größe von 1442 bp auf. (C) Durch eine Kontrollrestriktion des Vektors p409-KONNI mit den Enzymen *Hind*III und *Spe*I konnte Klon 10 mit den Fragmenten 6917 bp, 2676 bp und 470 bp (*Hind*III) bzw. 4639 bp, 3583 bp und 1841 bp (*Spe*I) als korrekt ermittelt werden.

3.4 Generierung von stabil transduzierten Ba/F3 gp130-KONNI Zelllinien

Nach der erfolgreichen Klonierung der retroviralen Vektoren pMOWS-KONNI 26 und pMOWS-KONNI 39 wurden mittels retroviraler Transduktion vier stabile Zelllinien geschaffen: Ba/F3 gp130-KONNI 26I, Ba/F3 gp130-KONNI 26II, Ba/F3 gp130-KONNI 39I und Ba/F3 gp130-KONNI 39II. Ba/F3 Zellen entstammen der murinen prä-B-Lymphozytenzelllinie, deren natürlicher Stimulus IL-3 ist und die endogen keine Zytokinrezeptoren der IL-6/IL-12-Familie, der auch der in dieser Arbeit untersuchte Rezeptor IL-23 angehört, exprimieren. Daher sind sie besonders geeignet, um den IL-23-Rezeptor zu untersuchen. Ba/F3 gp130 Zellen sind Ba/F3 Zellen, die stabil mit dem chimären Rezeptor gp130 transduziert wurden (Stuhlmann-Laeisz *et al.*, 2006). Durch Zugabe des Designer-Zytokins Hyper-IL-6 bindet dieses an gp130 und führt zur Aktivierung des JAK/STAT und des Raf/Ras/MAPK Signaltransduktionsweges und somit zur Proliferation der Zellen. Ein Entzug von Hyper-IL-6 bzw. IL-3 hingegen führt innerhalb von 24 – 36 h zum Zelltod durch Apoptose. Der retrovirale Vektor pMOWS trägt eine Antibiotikaresistenz gegen Puromycin, diese Eigenschaft ermöglicht eine Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen durch die Zugabe von Puromycin zum Nährmedium. Nach zweiwöchiger Antibiotikaselektion wurden die vier generierten Zelllinien zweimal mit PBS gewaschen und somit das Zytokin Hyper-IL-6 entfernt. Im Folgenden wurden die Zellen ohne Hyper-IL-6 kultiviert und auf ihre zytokinunabhängige Proliferation hin untersucht.

3.5 Nachweis des Rezeptorkomplexes mittels RT-PCR in Ba/F3 gp130 Zellen

Um die Expression der transduzierten chimären Rezeptoren in den Ba/F3 gp130 Zellen auf mRNA-Ebene nachzuweisen, wurden die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen und pelletiert. Die gesamte RNA wurde nun aus den Zellen isoliert und daraus anschließend über Reverse Transkription DNA synthetisiert, welche mittels einer PCR mit spezifischen Primern nachgewiesen werden konnte (Primer: sushi-mIL-12R β 1: KONNI-mIL-12RpR_{rev} und SPgp130-FUSIO_{for}, IL-15-mIL-23R: mIL-23R_{rev} und IL-15_{for}, β -Actin: β -actin_{rev} und β -actin_{for}). Analysiert wurden die mittels des Fusionskonstrukts erstellten vier Ba/F3 gp130-KONNI Zelllinien und als Negativkontrolle nicht transduzierte Ba/F3 gp130 Zellen mit und ohne Zugabe von Hyper-IL-6. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, konnte eine Rezeptorexpression in allen vier transduzierten Ba/F3 gp130-KONNI Zelllinien nachgewiesen werden. Allerdings waren unerwarteterweise auch die nicht transduzierten Ba/F3 gp130 Zellen mit Hyper-IL-6-Zugabe positiv für den Rezeptor sushi-mIL-12R β 1.

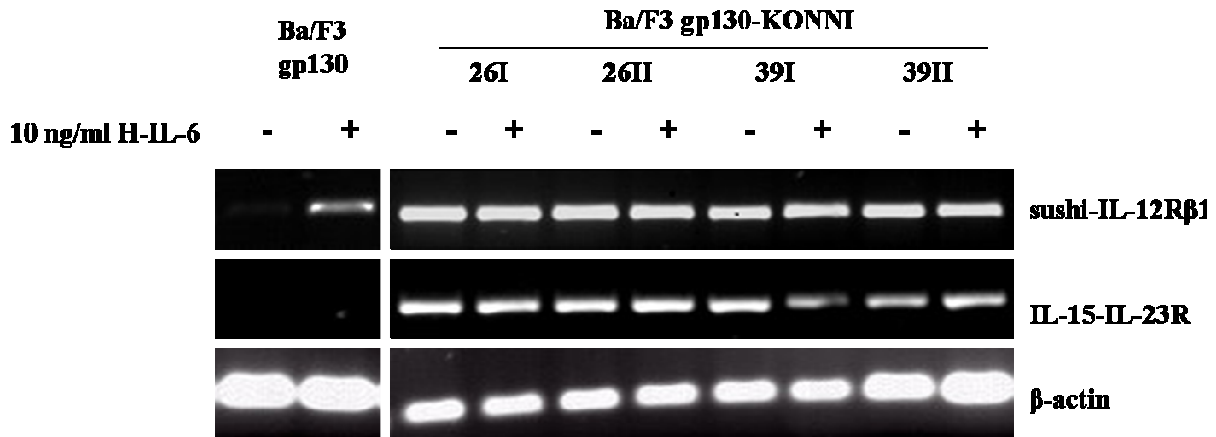


Abbildung 14: Nachweis der Rezeptorexpression auf mRNA-Ebene in Ba/F3 gp130-KONNI Zelllinien. Gelelektrophoretische Analyse der RT-PCRs zum Nachweis der Expression der Rezeptoren sushi-IL-12Rβ1 und IL-15-IL-23R in allen vier mit KONNI stabil transduzierten Ba/F3 gp130 Zelllinien. Als Negativkontrolle dienten nicht transduzierte Ba/F3 gp130 Zellen, mit und ohne Hyper-IL-6 Stimulation.

3.6 Untersuchung des Signaltransduktionswegs der stabil transduzierten Ba/F3 gp130-KONNI Zelllinien

Aufgrund der artifiziell herbeigeführten Dimerisierung des IL-23-Rezeptorkomplexes ist der Rezeptor auch ohne Ligand konstitutiv aktiv. Signaltransduktion findet dauerhaft statt und es kommt hierdurch unter anderem zur Aktivierung durch Phosphorylierung der Effektorproteine STAT1 und STAT3 sowie der MAP-Kinasen ERK1/2. Die vier mit KONNI transduzierten Ba/F3 gp130 Zelllinien sowie nicht transduzierte Ba/F3 gp130 Zellen wurden mit und ohne Hyper-IL-6-Stimulation mittels Western Blot analysiert. Die Western Blot-Analyse wurde mit spezifischen monoklonalen Antikörpern durchgeführt, die phosphorylierte STAT1, STAT3 und ERK1/2 erkennen. Wie Abbildung 15 zeigt, ist in den Lysaten der Ba/F3 gp130-KONNI Zellen eine ligandenunabhängige Phosphorylierung (das heißt, ohne Zugabe von Hyper-IL-6) sowohl von STAT1 und STAT3 als auch von ERK1/2 nachweisbar. Allerdings ist das Signal der STAT1-Aktivierung deutlicher schwächer als das der Anderen. Im Gegensatz dazu ist in den Ba/F3 gp130 Zelllinien nur unter Zytokin-Zugabe eine Aktivierung der Signaltransduktion zu sehen. Die unstimulierten Zellen zeigen dagegen erwartungsgemäß kein oder allenfalls ein sehr schwaches Signal. Desweiteren ist auffällig, dass bei beinahe allen Ba/F3 gp130-KONNI Zelllinien eine stärkere STAT1- und ERK1/2-Phosphorylierung detektierbar war, wenn diese zuvor mit Hyper-IL-6 stimuliert wurden.

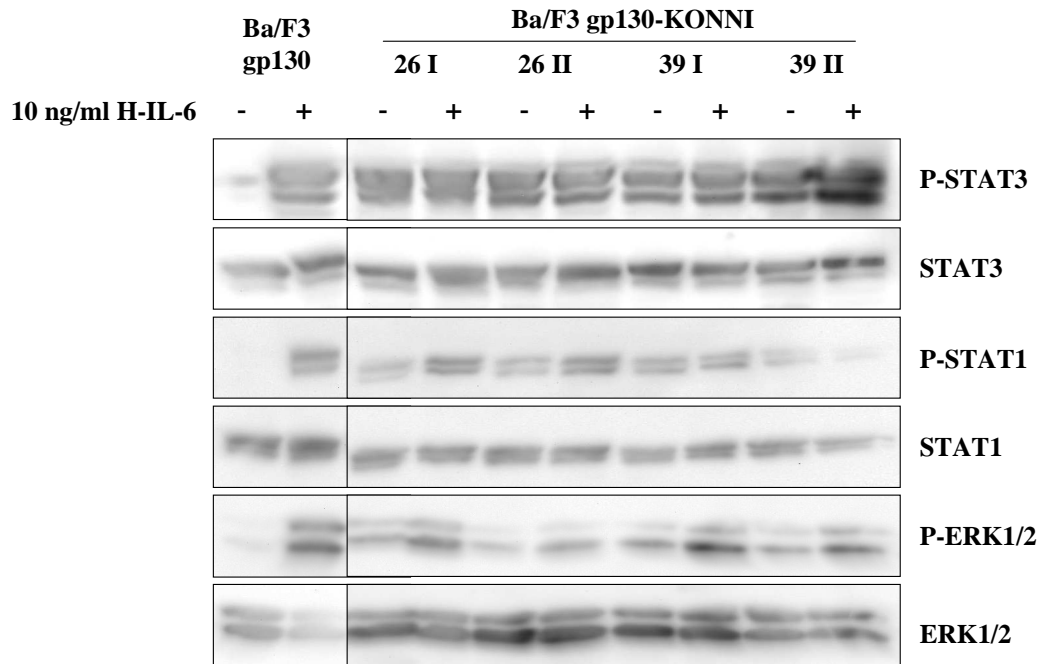


Abbildung 15: Analyse der Signaltransduktionswege JAK/STAT und MAPK. Die Phosphorylierung der STAT1/3 und ERK1/2 Proteine in mit KONNI stabil transduzierten Ba/F3 gp130 Zelllinien wurde anhand des Western Blot-Verfahrens untersucht.

3.7 Oberflächenexpression des Rezeptorkomplexes

Die Oberflächenexpression der chimären Rezeptoren wurde per FACS-Analyse getestet. Die Untersuchung wurde für die stabil transduzierte Ba/F3 gp130-KONNI 39II Zelllinie durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden Ba/F3 gp130 Zellen verwendet. Abbildung 16 zeigt die Daten der FACS-Analyse für die Messung mit den anti-IL-15-Antikörper zur Detektion des IL-15-IL-23R-Komplexes und den anti-myc Antikörper zum Nachweis der an ein Myc-Tag gekoppelte sushi-mIL-12R β 1. Der Nachweis des IL-15-IL-23R-Komplexes an der Oberfläche der Ba/F3 gp130 Zellen erfolgte mittels Bindung des anti-IL-15 Antikörpers, denn die Zellen, die diesen Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen, zeigen eine stärkere Fluoreszenzintensität in der Durchflusszytometrie als die untransduzierten Ba/F3 gp130 Zellen. Das Gleiche gilt für die Detektion der Rezeptoruntereinheit sushi-mIL-12R β 1 mithilfe des Myc-Tags. Abbildung 16 zeigt deutlich, dass die Ba/F3 gp130-KONNI 39II Zellen eine stärkere Fluoreszenzintensität für beide spezifische Färbungen aufweisen als die Ba/F3 gp130 Zellen. Somit konnte gezeigt werden, dass die mit dem Fusionskonstrukt transduzierten Zellen den Rezeptorkomplex auch auf ihrer Oberfläche exprimieren.

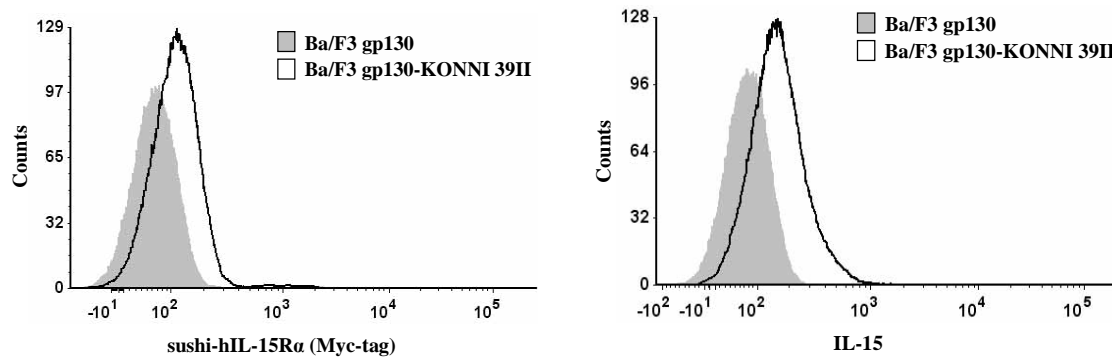


Abbildung 16: Durchflusszytometrie der Zelllinie Ba/F3 gp130 KONNI 39II. Um die Oberflächenexpression der chimären Rezeptoren IL-15-IL-23R und sushi-IL-12R β 1 zu bestätigen, wurde eine FACS-Analyse der Zelllinie Ba/F3 gp130-KONNI 39II durchgeführt. Es wurden ein primärer Antikörper gegen IL-15 und c-myc verwendet. Als sekundärer Antikörper kam im Falle des IL-15 ein Allophycocyanin konjugierter anti-Maus Antikörper und im Falle von c-myc ein Alexa Fluor 488 konjugierter anti-Kaninchen Antikörper zum Einsatz.

3.8 Überprüfung der ligandenunabhängigen Proliferation

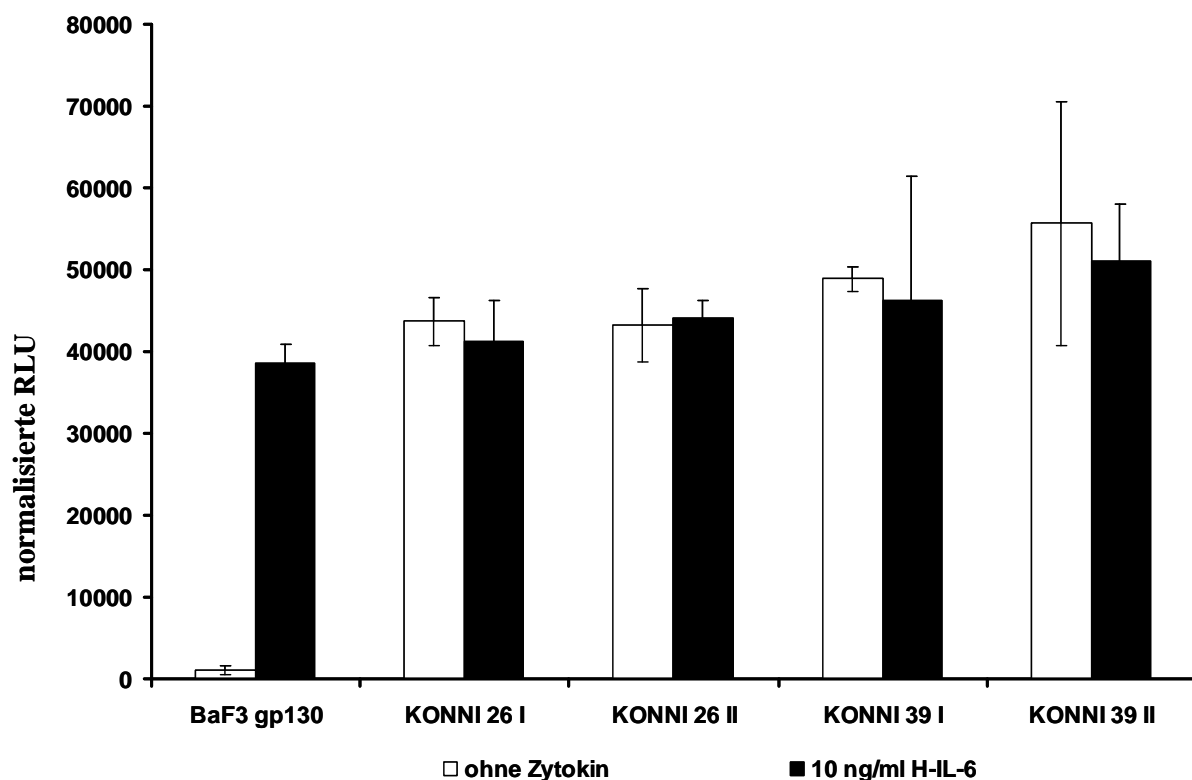


Abbildung 17: Proliferationsassay der vier generierten Ba/F3 gp130-KONNI Zelllinien. Das ligandenunabhängige Wachstum der vier mit KONNI transduzierten Ba/F3 gp130 Zelllinien wurde anhand eines Proliferationsassays untersucht. Die Zellen wurden dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden 5×10^3 Zellen pro Well ausgesät und drei Tage lang mit oder ohne Zytokinzugabe kultiviert. Die Messung der Zellproliferation erfolgte mittels CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay. Der jeweilige Proliferationswert ist als normalisierte RLU (*relative light unit*) dargestellt.

Ba/F3 gp130 Zellen proliferieren nur in Abhängigkeit von IL-3 bzw. Hyper-IL-6, ohne Zugabe eines dieser Zytokine sterben sie ab. Um das zytokinunabhängige Wachstum der mit KONNI stabil transduzierten Ba/F3 gp130 Zellen zu untersuchen, wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Die zuvor gewaschenen Zellen wurden hierfür drei Tage lang in Abwesenheit des Zytokins Hyper-IL-6 kultiviert und anschließend mittels CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay analysiert und die Fluoreszenz im Lambda Fluoro 320 Fluorimeter gemessen. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse dieser Analyse. Wie zu erwarten, wachsen die Ba/F3 gp130 Zellen nur unter Zugabe von Hyper-IL-6. Kultivierte man diese Zellen ohne Zytokin, sterben sie ab. Die vier KONNI Zelllinien hingegen zeigen eine zytokinunabhängige Zellproliferation, was auf eine funktionell aktive Heterodimerisierung hinweist.

4 Diskussion

4.1 Die ligandenunabhängige Dimerisierung des IL-23-Rezeptorkomplexes und deren Auswirkungen auf stabil transduzierte Ba/F3 gp130 Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde beschrieben, wie eine ligandenunabhängige, erzwungene Heterodimerisierung des IL-23-Rezeptorkomplexes erzeugt wurde und welche Auswirkungen dies auf stabil transduzierte Ba/F3 gp130 Zellen hat. Als Erstes wurden in einem mehrschrittigen Klonierungsverfahren die extrazellulären Domänen der Rezeptoruntereinheiten IL-23R und IL-12R β 1 mit IL-15 bzw. IL-15R α -sushi ersetzt. Desweiteren wurde das entstandene Fusionskonstrukt zweifach subkloniert: für die stabile Transduktion in den retroviralen Vektor pMOWS und, für zukünftige Expressionsstudien, in den Expressionsvektor p409. Anschließend gelang es, Hyper-IL-6 abhängige Ba/F3 gp130 Zellen mit den beiden chimären Rezeptoren IL-15-IL-23R und sushi-IL-12R β 1 retroviral zu transduzieren. Mittels RT-PCR konnte die Expression beider Rezeptoren in den transduzierten Ba/F3 gp130 Zellen nachgewiesen werden. Allerdings waren unerwarteterweise auch die nicht-transduzierten Zellen mit Hyper-IL-6-Zugabe positiv für den Rezeptor sushi-mIL-12R β 1, was sich möglicherweise durch eine Verunreinigung dieser Probe erklären lässt. Anhand einer durchflusszytometrischen Analyse konnte gezeigt werden, dass die transduzierten Ba/F3 gp130 Zellen den heterodimeren Rezeptorkomplex auf ihrer Oberfläche tragen. Die Funktionalität des IL-23-Rezeptorkomplexes konnte durch die Untersuchung der Signaltransduktionswege JAK/STAT und MAPK bewiesen werden. Die Dimerisierung führt zu einer ligandenunabhängigen STAT1-, STAT3- und ERK1/2-Phosphorylierung. Das Signal der STAT1-Aktivierung ist deutlicher schwächer als das der Anderen, was mit der eher untergeordneten Rolle von STAT1 in der Signaltransduktion des IL-23-Rezeptors erklärbar ist. Desweiteren ist auffällig, dass bei beinahe allen transduzierten Ba/F3 gp130 Zellen eine stärkere STAT1- und ERK1/2-Phosphorylierung detektierbar war, wenn diese zuvor mit Hyper-IL-6 stimuliert wurden. Dies lässt sich damit begründen, dass es wahrscheinlich aufgrund der kurzen Hyper-IL-6-Stimulation von 5 min nicht zur SOCS-vermittelten Dephosphorylierung (Yoshimura *et al.*, 2007) kommen kann. Die SOCS-Proteine dienen der internen Regulation der Signaltransduktion und inhibieren die Zytokin-induzierte Signaltransduktion. Vermutlich kommt es bei den transduzierten Zellen, in denen der IL-23-Rezeptorkomplex dauerhaft aktiviert ist, zu einer Inhibition der Signalkaskade durch SOCS-Proteine und damit zu einem schwächeren Signal des phosphorylierten STAT1 und ERK1/2. Da STAT3 einer der Hauptvermittler der IL-23-Signaltransduktion ist, wird der Vorgang der Herunterregulation nicht so deutlich wie bei STAT1 und ERK1/2 in den Ergebnissen

widergespiegelt. Denn trotz SOCS-Inhibition ist noch ausreichend phospho-STAT3 in den unstimulierten Proben enthalten, um ein ebenso starkes Signal wie die stimulierten Zellen zu zeigen. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ba/F3 gp130 Zellen aufgrund der dauerhaften Aktivierung des künstlich dimerisierten IL-23-Rezeptorkomplexes ligandenunabhängig Signalkaskaden auslösten. Schlussendlich wurde noch ein Proliferationsassay durchgeführt. Dieses belegt eindeutig, dass die Transduktion der Ba/F3 gp130 Zellen mit dem chimären Rezeptorkomplex ein dauerhaft ligandenunabhängiges Wachstum bewirkt.

Folgende Aussagen können aus den vorliegenden Daten gemacht werden:

- 1) Die Anwendung des IL-15/IL-15R α -sushi-System erzielt die erwartete Heterodimerisierung des IL-23-Rezeptorkomplexes und bewirkt eine dauerhafte Aktivierung der IL-23-Signaltransduktionsweges.
- 2) Die Integration der chimären Rezeptoren in Ba/F3 gp130 Zellen führt durch die permanente Aktivierung zu einer ligandenunabhängigen, längerfristigen Zellproliferation.
- 3) Es konnten sowohl die Expression als auch die Funktionalität der künstlich erzeugten chimären Rezeptoren unter Beweis gestellt werden.

4.2 Anwendung der IL-15/IL-15R α -sushi-Dimerisierungsstrategie auf den IL-23 Rezeptorkomplex

In der Literatur werden verschiedene Methoden beschrieben, Rezeptoren dauerhaft und ligandenunabhängig künstlich zu dimerisieren. Bereits 1996 wurden die extrazellulären Domänen des dimeren *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*- (GM-CSF) Rezeptorkomplexes mit den Leucinzipper-Domänen der Transkriptionsfaktoren Fos bzw. Jun ersetzt (Patel *et al.*, 1996). Die Leucinzipper-Domänen von Fos und Jun bilden sowohl Hetero- als auch Homodimere, obwohl Heterodimere eindeutig überwiegen, da sie energetisch die günstigste Kombination darstellen (O'Shea *et al.*, 1989). In vorherigen Studien wurde der Fos-Jun-Leucinzipper bereits genutzt für die Formierung zweiteiliger Antikörper (Kostelny *et al.*, 1992) und für die Initiierung einer Aspartat-Rezeptor-vermittelten Chemotaxis in *Escherichia coli* (Cochran *et al.*, 1996). Nach Ko-Transfektion der chimären GM-CSF-Rezeptoren in Ba/F3 Zellen konnten sie unter anderem zeigen, dass sowohl die Bildung von Heterodimeren als auch die Bildung von Homodimeren eine Signaltransduktion nach sich zieht. Stuhlmann-Laeisz und Kollegen verwendeten die Leucinzipper-Strategie, um gp130-Rezeptoren konstitutiv zu dimerisieren und konnten ebenfalls zeigen, dass stabil transduzierte Ba/F3 Zellen

ligandenunabhängig und dauerhaft proliferierten (Stuhlmann-Laeisz *et al.*, 2006). Suthaus und Kollegen führten ein neues System der künstlichen Dimerisierung ein, indem sie erstmals die hohen Bindungskräfte des Zytokins IL-15 zur IL-15R α -sushi-Domäne ausnutzten, um gp130 mit LIFR, WSX-1 und GPL zu heterodimerisieren. Sie ersetzten die extrazellulären Domänen der oben genannten Rezeptoren mit IL-15 bzw. der IL-15R α -sushi-Domäne und konnten zeigen, dass sich funktionsfähige heterodimere und homodimere Rezeptorkomplexe bildeten und zuvor Zytokin-abhängige Ba/F3 gp130 Zellen nach stabiler Transfektion mit den chimären Rezeptorkomplexen in der Lage waren, dauerhaft ligandenunabhängig zu proliferieren (Suthaus *et al.*, 2010). Ebenfalls neu in Bezug auf die künstliche Dimerisierung von Zytokinrezeptoren war die Verwendung der 2A-Technologie (Fang *et al.*, 2005) die es ermöglichte, mithilfe der 2A-Sequenz des FMD-Virus aus einem *open reading frame* zwei getrennte Proteine zu exprimieren (siehe Abbildung 7).

Auch in dieser Arbeit wurde die IL-15/IL-15R α -sushi-Dimerisierungsstrategie erfolgreich angewendet. Es gelang, den IL-23-Rezeptorkomplex, der der Gruppe der IL-6-ähnlichen Rezeptoren angehört, mithilfe dieser Technik erstmals dauerhaft zu dimerisieren und ein ligandenunabhängiges Wachstum transduzierter Ba/F3 gp130 Zellen hervorzurufen.

Normalerweise führt die Bindung des Liganden IL-23 an seinen dimeren Rezeptorkomplex zu einer Konformationsänderung und damit zur korrekten Positionierung der intrazellulären Janus-Kinasen mit weiterführender Signaltransduktion. Weder IL-15 noch die IL-15R α -sushi-Domäne besitzen strukturelle Ähnlichkeiten mit den extrazellulären Domänen des IL-23-Rezeptorkomplexes, trotzdem können sie die extrazellulären Domänen und den Liganden IL-23 funktionell ersetzen. Wir können also aus unseren Beobachtungen schließen, dass die spezifischen extrazellulären Domänen des dimeren IL-23-Rezeptors für die Initiierung der Signaltransduktion nicht notwendig sind, solange die Formierung des dimeren Komplexes gesichert ist.

4.3 Mögliche Verwendung des künstlich dimerisierten IL-23-Rezeptorkomplexes *in vitro* und *in vivo*

In Anbetracht der herausragenden Rolle, die IL-23 bei der Entstehung von entzündlichen Autoimmunerkrankungen und auch Krebserkrankungen einnimmt, wäre der ligandenunabhängige, konstitutiv aktive IL-23-Rezeptorkomplex ein sinnvolles Instrument, um in weiteren *in-vitro*-Studien seine biochemischen Eigenschaften zu analysieren. Darüber hinaus würde dessen Anwendung *in vivo* neuartige Möglichkeiten eröffnen, die Auswirkungen ungehemmter IL-23-Aktivität auf den tierischen Organismus zu studieren. Um IL-15-vermittelte

Antworten der chimären Rezeptoren *in vivo* zu vermeiden, wurde eine Mutation des IL-15-Moleküls benutzt, welche nicht an die IL-2R β - und IL-2R γ c-Rezeptorketten des IL-15-Rezeptorkomplexes binden kann, aber trotzdem in der Lage ist, die IL-15R α -sushi-Domäne zu binden (Pettit *et al.*, 1997).

Kürzlich gelang der Beweis, dass eine dauerhafte Aktivierung von Rezeptoren der IL-6-Superfamilie, der auch IL-23 angehört, zu pathologischen Veränderungen bei Patienten führt. Rebouissou und Kollegen fanden heraus, dass 60% der entzündlichen Leberzelladenomen eine deutliche Aktivierung der IL-6-Signaltransduktionsweges aufweisen, hervorgerufen durch eine somatische *gain-of-function*-Mutation der Bindungsstelle der D2-Domäne des Ko-Rezeptors gp130 für IL-6 (Rebouissou *et al.*, 2009). Diese Mutation führt zu ligandenunabhängig konstitutiv aktiven gp130-Rezeptoren und bewirkt, unter Beteiligung der D1-Domäne (Sommer *et al.*, 2012; Schuett *et al.*, 2013) in Abwesenheit des Liganden eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 in Leberzellen (Rebouissou *et al.*, 2009). Derartige Mutationen wurden bislang nicht beim IL-23-Rezeptorkomplex beschrieben. Trotzdem ist es durchaus denkbar, dass IL-23-assoziierte Erkrankungen, bei denen der Mechanismus der Krankheitsentstehung bisher ungeklärt blieb, durch ähnliche Veränderung der Rezeptoren entstehen. Auch in diesem Fall könnten Mutationen der IL-23-Rezeptoren eine dauerhafte Aktivierung der IL-23-Signaltransduktion bewirken und krankhafte Veränderungen im Organismus hervorrufen. Passenderweise konnte unlängst gezeigt werden, dass eine Dysregulation der IL-23-rezeptorvermittelten Signaltransduktion, die mit einem Einzelnukleotid-Polymorphismus (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNPs) des IL-23R korrelieren, in eindeutigem Zusammenhang mit einer Anfälligkeit für CED steht (Zwiers *et al.*, 2012). Diese Ergebnisse implizieren, dass eine kontinuierliche Signaltransduktion des IL-23-Rezeptors zur Aufrechterhaltung von CED beitragen könnte. Diese Situation ist mit den natürlich vorkommenden dauerhaft aktiven gp130-Rezeptoren, sowie mit unserem künstlich geschaffenen IL-23-Rezeptorkomplex vergleichbar. Für die Zukunft wäre es hochinteressant zu untersuchen, ob die Applikation des künstlich dimerisierten IL-23-Rezeptorkomplexes *in vivo* vergleichbare Folgen hätte und ebenfalls pathologische Reaktionen bewirken würde. Auch bei anderen IL-23-assoziierten Krankheiten wie Psoriasis, Rheumatoide Arthritis oder Multipler Sklerose wären weitere Untersuchungen *in vivo* zu den Auswirkungen einer anhaltenden Signaltransduktion des IL-23R bereichernd. Somit könnten weitere Einblicke in die IL-23-vermittelte Entstehung verschiedenster Erkrankungen gelingen.

4.4 Der IL-23-Rezeptor als Ziel bei der Behandlung autoimmuner Entzündungserkrankungen

Wie bereits beschrieben, spielt IL-23 eine erhebliche Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung autoimmuner Entzündungserkrankungen. Der Gedanke, IL-23 und den IL-23-Rezeptor als mögliche therapeutische Angriffspunkte ebendieser Erkrankungen in Erwägung zu ziehen, liegt daher nahe. In der Tat befinden sich zur Zeit etwa 15 IL-23-Rezeptorantagonisten in klinischer oder vorklinischer Entwicklung. Sie alle werden für die Behandlung von Psoriasis, Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Rheumatoider Arthritis und Multipler Sklerose entwickelt. Der Antagonist Ustekinumab ist bislang das einzig zugelassene Medikament. In den Phase III-Studien PHOENIX 1, PHOENIX 2 und ACCEPT gelang ein signifikanter Wirkungsnachweis (Leonardi *et al.*, 2008; Papp *et al.*, 2008; Lebowitz *et al.*, 2010; Griffiths *et al.*, 2010), im Jahr 2009 erhielt das Medikament die Zulassung für die Behandlung chronischer Plaque-Psoriasis (Europa und USA) und im Jahr 2011 für die Behandlung psoriatischer Arthritis (Japan). Ustekinumab ist ein subkutan zu injizierender monoklonaler Antikörper, der gegen die IL-12/IL-23-Untereinheit p40 gerichtet ist. Es verhindert die Interaktion der Zytokine IL-12 und IL-23 mit ihren Rezeptoren und inhibiert somit die Signaltransduktion mit nachfolgender Differenzierung und Zytokinproduktion der IL-23-empfindlichen Zellen. Der IL-23-Rezeptorantagonist Briakinumab zielt ebenfalls auf die p40-Untereinheit von IL-12 und IL-23 ab. Es verhindert die Bindung der beiden Interleukine an NK-Zellen und T-Zellen (Ding *et al.*, 2008) und senkt die Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-12, IFN- γ , IFN- α , IL-6, IL-23 und IL-17 (Tang *et al.*, 2012). Briakinumab hat klinische Studien der Phase I, II und III hinter sich gebracht, in denen die Verträglichkeit und Effektivität als gut bewertet wurden (Kauffmann *et al.*, 2004; Kimball *et al.*, 2008; Gordon *et al.*, 2012). Die Zulassung zum Arzneimittel steht noch aus.

Die Entwicklung moderner Therapeutika wie die der IL-23-Rezeptorantagonisten ist darauf ausgerichtet, zielgerichtet in pathologische Vorgänge einzugreifen und somit effizienter und nebenwirkungsärmer zur Heilung beizutragen. Die Anti-Zytokin-Therapie als Teil der sogenannten *targeted therapy* ist im Falle der Rheumatherapie bereits fest im klinischen Alltag integriert. Die Hoffnung besteht, dass durch die Erforschung der Funktionsweise des IL-23-Rezeptors, wozu die vorliegende Arbeit ihren Teil beiträgt, in Zukunft auch in diesem Bereich gezielt Heilung erreicht werden kann.

5 Zusammenfassung

Interleukin-23 ist Teil der IL-6/IL-12-Superfamilie der heterodimeren Zytokine und besteht aus einer α - und einer β - Kette. Es spielt eine bedeutende Rolle in der Differenzierung von Th17-Zellen und in der Entwicklung entzündlicher Autoimmunerkrankungen. Der IL-23-Rezeptor ist aus zwei Untereinheiten aufgebaut, dem IL-12R β 1 und dem IL-23R. In Anwesenheit des Liganden IL-23 dimerisieren die beiden Rezeptoren und Signaltransduktion wird ausgelöst.

Ziel der Arbeit war die erzwungene Dimerisierung des IL-23-Rezeptorkomplexes mit anschließender Untersuchung seiner Expression und Funktionalität in Abwesenheit des Liganden IL-23. Um dies zu erreichen, wurden die extrazellulären Domänen der IL-23-Rezeptor-Untereinheiten mit IL-15 bzw. IL-15R α -sushi ersetzt. Diese beiden Proteine binden einander mit hoher Affinität und erzeugen somit die künstliche Dimerisierung der chimären Rezeptoren. Per retroviraler Transduktion wurden beiden Konstrukte IL-15-IL-23R und sushi-IL-12R β 1 in Hyper-IL-6-abhängige Ba/F3 gp130 Zellen integriert. Die Durchführung einer RT-PCR konnte die Expression der Rezeptoren bestätigen und eine durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass die transduzierten Ba/F3 gp130 Zellen den dimeren Rezeptorkomplex auf ihrer Oberfläche tragen. Anhand einer Western Blot Untersuchung konnte gezeigt werden, dass MAPK- und JAK/STAT-Signaltransduktionswege durch die Rezeptoraktivierung angeschaltet wurden, indem die Phosphorylierung der STAT1-, STAT3- und ERK1/2-Proteine nachgewiesen werden konnte. Die intrazelluläre Signaltransduktion resultierte in ligandenunabhängiger Proliferation der Ba/F3 gp130 Zellen, welche mit Hilfe von Proliferationsassays überprüft wurde.

In Hinblick auf die Bedeutung von IL-23 bei der Entstehung verschiedenster autoimmuner Entzündungserkrankungen wäre es von großem Nutzen, die Funktionsweise des IL-23-Rezeptors unter Verwendung des in dieser Arbeit erstellten konstitutiv aktiven, zytokinunabhängigen IL-23-Rezeptorkomplexes tiefer gehend zu erforschen. Desweiteren würde dessen Anwendung im Tiermodell es erlauben, die Konsequenzen einer dauerhaften Aktivierung des IL-23-Rezeptors *in vivo* zu studieren.

6 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J. and Gurney, A. L. (2003): Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.*, 278(3), 1910-1914
- Balkwill, F. and Mantovani, A. (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357(9255), 539-545
- Bernard, J., Harb, C., Mortier, E., Quemener, A., Meloen, R. H., Vermot-Desroches, C., Wijdeness, J., van Dijken, P., Grotzinger, J., Slootstra, J. W., Plet, A. and Jacques, Y. (2004): Identification of an interleukin-15 alpha receptor-binding site on human interleukin-15. *J. Biol. Chem.*, 279(23), 24313-24322
- Brentano, F., Ospelt, C., Stanczyk, J., Gay, R. E., Gay, S. and Kyburz, D. (2009): Abundant expression of the interleukin (IL)23 subunit p19, but low levels of bioactive IL23 in the rheumatoid synovium: differential expression and Toll-like receptor-(TLR) dependent regulation of the IL23 subunits, p19 and p40, in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 68(1), 143-150
- Budagian, V., Bulanova, E., Paus, R. and Bulfone-Paus, S. (2006): IL-15/IL-15 receptor biology: A guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev*, 17(4), 259-280
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. and Short, J. M. (1987): XL-1-Blue – a high efficiency plasmid transforming *Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection. *Biotechniques*, 5(4), 376-&
- Cargill, M., Schrodi, S. J., Chang, M., Garcia, V. E., Brandon, R., Callis, K. P., Matsunami, N., Ardlie, K. G., Civello, D., Catanese, J. J., Leong, D. U., Panko, J. M., McAllister, L. B., Hansen, C. B., Papenfuss, J., Prescott, S. M., White, T. J., Leppert, M. F., Krueger, G. G. and Begovich, A. B. (2007): A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am. J. Hum. Genet.*, 80(2), 273-290
- Chen, J. J., Lu, Y., Zhang, H. Z., Ding, Y. B., Ren, C. L., Hua, Z. L., Zhou, Y., Deng, B., Jin, G. F., Hu, Z. B., Xu, Y. C. and Shen, H. B. (2010): A Nonsynonymous Polymorphism in IL23R Gene Is Associated With Risk of Gastric Cancer in a Chinese Population. *Mol. Carcinog.*, 49(10), 862-868
- Chu, H. J., Cao, W. K., Chen, W., Pan, S. D., Xiao, Y., Liu, Y., Gu, H. Y., Guo, W., Xu, L., Hu, Z. B. and Shen, H. (2012): Potentially functional polymorphisms in IL-23 receptor and risk of esophageal cancer in a Chinese population. *Int. J. Cancer*, 130(5), 1093-1097
- Cochran, A. G. and Kim, P. S. (1996): Imitation of *Escherichia coli* aspartate receptor signaling in engineered dimers of the cytoplasmic domain. *Science*, 271(5252), 1113-1116
- Coussens, L. M. and Werb, Z. (2002): Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860-867
- Di Cesare, A., Di Meglio, P. and Nestle, F. O. (2009): The IL-23/Th17 Axis in the Immunopathogenesis of Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, 129(6), 1339-1350

- Ding, C., Xu, J. and Li, J. (2008): ABT-874, a fully human monoclonal anti-IL-12/IL-23 antibody for the potential treatment of autoimmune diseases. *Curr. opin. invest. dr.*, 9(5), 515-522
- Duerr, R. H., Taylor, K. D., Brant, S. R., Rioux, J. D., Silverberg, M. S., Daly, M. J., Steinhart, A. H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., Dassopoulos, T., Bitton, A., Yang, H., Targan, S., Datta, L. W., Kistner, E. O., Schumm, L. P., Lee, A. T., Gregersen, P. K., Barmada, M. M., Rotter, J. I., Nicolae, D. L. and Cho, J. H. (2006): A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*, 314(5804), 1461-1463
- Dunn, G. P., Old, L. J. and Schreiber, R. D. (2004): The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137-148
- Fang, J. M., Qian, J. J., Yi, S. L., Harding, T. C., Tu, G. H., VanRoey, M. and Jooss, K. (2005): Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nat. Biotechnol.*, 23(5), 584-590
- Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J. P. G., Kallen, K. J., Wollmer, A., Grotzinger, J. and RoseJohn, S. (1997): A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat. Biotechnol.*, 15(2), 142-145
- Gearing, D. P., Ziegler, S. F., Comeau, M. R., Friend, D., Thoma, B., Cosman, D., Park, L. and Mosley, B. (1994): Proliferative responses and binding-properties of haematopoietic cells. Transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin-M, and ciliary neurotrophic factor. *PNAS*, 91, 1119-1123
- Giri, J. G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L. S., Cosman, D. and Anderson, D. (1994): Utilization of the beta-chain and gamma-chain of the IL-2 receptor by the novel cytokine-IL-15. *EMBO J.*, 13(12), 2822-2830
- Giri, J. G., Kumaki, S., Ahdieh, M., Friend, D. J., Loomis, A., Shanebeck, K., Dubose, R., Cosman, D., Park, L. S. and Anderson, D. M. (1995): Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha-chain of the IL-2 receptor. *EMBO J.*, 14(15), 3654-3663
- Gordon, K. B., Langley, R. G., Gottlieb, A. B., Papp, K. A., Krueger, G. G., Strober, B. E., Williams, D. A., Gu, Y. and Valdes, J. M. (2012): A Phase III, Randomized, Controlled Trial of the Fully Human IL-12/23 mAb Briakinumab in Moderate-to-Severe Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, 132(2), 304-314
- Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M. A., Ahdieh, M., Johnson, L., Alderson, M. R., Watson, J. D., Anderson, D. M. and Giri, J. G. (1994): Cloning of a T-cell growth-factor that interacts with the beta-chain of the interleukin-2 receptor. *Science*, 264(5161), 965-968
- Griffiths, C. E. M., Strober, B. E., van de Kerkhof, P., Ho, V., Fidelus-Gort, R., Yeilding, N., Guzzo, C., Xia, Y., Zhou, B., Li, S., Dooley, L. T., Goldstein, N. H., Menter, A. and Grp, A. S. (2010): Comparison of Ustekinumab and Etanercept for Moderate-to-Severe Psoriasis. *N. Engl. J. Med.*, 362(2), 118-128

- Kaplan, D. (1996): Autocrine secretion and the physiological concentration of cytokines. *Immunol. Today*, 17(7), 303-304
- Karaderi, T., Harvey, D., Farrar, C., Appleton, L. H., Stone, M. A., Sturrock, R. D., Brown, M. A., Wordsworth, P. and Pointon, J. J. (2011): Association between the interleukin 23 receptor and ankylosing spondylitis is confirmed by a new UK case-control study and meta-analysis of published series (vol 48, pg 386, 2009). *Rheumatology*, 50(6), 1179-1179
- Kastelein, R. A., Hunter, C. A. and Cua, D. J. (2007): Discovery and biology of IL-23 and IL-27: Related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 221-242
- Kauffman, C. L., Aria, N., Toichi, E., McCormick, T. S., Cooper, K. D., Gottlieb, A. B., Everitt, D. E., Frederick, B., Zhu, Y. W., Graham, M. A., Pendley, C. E. and Mascelli, M. A. (2004): A phase I study evaluating the safety, pharmacokinetics, and clinical response of a human IL-12 p40 antibody in subjects with plaque psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, 123(6), 1037-1044
- Ketteler, R., Glaser, S., Sandra, O., Martens, U. M. and Klingmuller, U. (2002): Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther.*, 9(8), 477-487
- Kimball, A. B., Gordon, K. B., Langley, R. G., Menter, A., Chartash, E. K., Valdes, J. and Investigat, A. B. T. P. S. (2008): Safety and efficacy of ABT-874, a fully human interleukin 12/23 monoclonal antibody, in the treatment of moderate to severe chronic plaque psoriasis. *Arch. Dermatol.*, 144(2), 200-207
- Kostelny, S. A., Cole, M. S. and Tso, J. Y. (1992): Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J. Immunol.*, 148(5), 1547-1553
- Langowski, J. L., Zhang, X., Wu, L., Mattson, J. D., Chen, T., Smith, K., Basham, B., McClanahan, T., Kastelein, R. A. and Oft, M. (2006): IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*, 442(7101), 461-465
- Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A. and Cua, D. J. (2005): IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.*, 201(2), 233-240
- Lebwohl, M., Yeilding, N., Szapary, P., Wang, Y., Li, S., Zhu, Y., Reich, K., Langley, R. G. and Papp, K. A. (2010): Impact of weight on the efficacy and safety of ustekinumab in patients with moderate to severe psoriasis: Rationale for dosing recommendations. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 63(4), 571-579
- Leonardi, C. L., Kimball, A. B., Papp, K. A., Yeilding, N., Guzzo, C., Wang, Y., Li, S., Dooley, L. T., Gordon, K. B. and Investigators, P. S. (2008): Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1). *Lancet*, 371(9625), 1665-1674
- Li, J., Zhang, L., Zhang, J., Wei, Y. Y., Li, K., Huang, L. G., Zhang, S., Gao, B., Wang, X. J. and Lin, P. (2013): Interleukin 23 regulates proliferation of lung cancer cells in a concentration-dependent way in association with the interleukin-23 receptor. *Carcinogenesis*, 34(3), 658-666

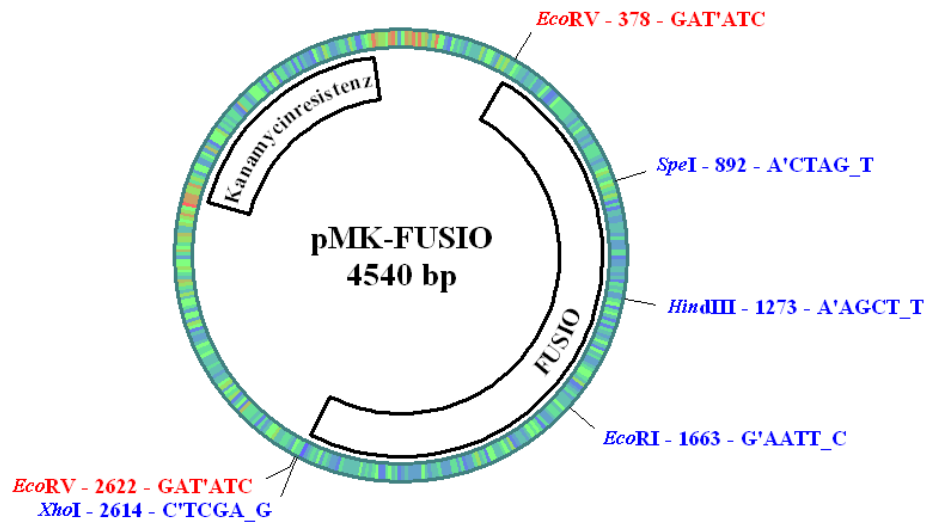
- Lorenzen, I., Dingley, A. J., Jacques, Y. and Grotzinger, J. (2006): The structure of the interleukin-15 alpha receptor and its implications for ligand binding. *J. Biol. Chem.*, 281(10), 6642-6647
- Lupardus, P. J. and Garcia, K. C. (2008): The structure of interleukin-23 reveals the molecular basis of p40 subunit sharing with interleukin-12. *J. Mol. Biol.*, 382(4), 931-941
- Ma, A., Koka, R. and Burkett, P. (2006): Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.*, 24, 657-679
- McGovern, D. and Powrie, F. (2007): The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. *Gut*, 56(10), 1333-1336
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA invitro via a polymerase-catalyzed chain-reaction. *Methods Enzymol.*, 155, 335-350
- Murphy, C. A., Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, C., McClanahan, T., Kastelein, R. A., Sedgwick, J. D. and Cua, D. J. (2003): Divergent pro- and Antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.*, 198(12), 1951-1957
- Nicola, N. A. and Hilton, D. J. (1998): General classes and functions of four-helix bundle cytokines. *Adv. Protein. Chem.*, 52, 1-65
- Norman, D. G., Barlow, P. N., Baron, M., Day, A. J., Sim, R. B. and Campbell, I. D. (1991): 3-dimensional structure of a complement control protein module in solution. *J. Biol. Chem.*, 219(4), 717-725
- Nunez, C., Dema, B., Cenit, M. C., Polanco, I., Maluenda, C., Arroyo, R., Heras, V. d. l., Bartolome, M., de la Concha, E. G., Urcelay, E. and Martinez, A. (2008): IL23R: a susceptibility locus for celiac disease and multiple sclerosis? *Genes Immun.*, 9(4), 289-293
- Oppenheim, J. J. (2001): Cytokines: Past, present, and future. *Int. J. Hematol.*, 74(1), 3-8
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y. M., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M. R., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y. J., 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(5), 715-725
- Oshea, E. K., Rutkowski, R., Stafford, W. F. and Kim, P. S. (1989): Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from FOS and JUN. *Science*, 245(4918), 646-648
- Papp, K. A., Langley, R. G., Lebwohl, M., Krueger, G. G., Szapary, P., Yeilding, N., Guzzo, C., Hsu, M.-C., Wang, Y., Li, S., Dooley, L. T., Reich, K. and Investigators, P. (2008): Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2). *Lancet*, 371(9625), 1675-1684
- 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., Malefyt, R. D. and Moore, K. W. (2002): A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R beta 1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J. Immunol.*, 168(11), 5699-5708
- Patel, N., Herrman, J. M., Timans, J. C. and Kastelein, R. A. (1996): Functional replacement of cytokine receptor extracellular domains by leucine zippers. *J. Biol. Chem.*, 271(48), 30386-30391
- Perkins, S. J., Haris, P. I., Sim, R. B. and Chapman, D. (1988): A study of the structure of human-complement component factor-H by Fourier-transform infrared spectroscopy and secondary structure averaging methods. *Biochemistry*, 27(11), 4004-4012
- Pettit, D. K., Bonnert, T. P., Eisenman, J., Srinivasan, S., Paxton, R., Beers, C., Lynch, D., Miller, B., Yost, J., Grabstein, K. H. and Gombotz, W. R. (1997): Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modelling. *J. Biol. Chem.*, 272(4), 2312-2318
- Rebouissou, S., Amessou, M., Couchy, G., Poussin, K., Imbeaud, S., Pilati, C., Izard, T., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P. and Zucman-Rossi, J. (2009): Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature*, 457(7226), 200-U96
- Rozwarski, D. A., Gronenborn, A. M., Clore, G. M., Bazan, J. F., Bohm, A., Wlodawer, A., Hatada, M. and Karplus, P. A. (1994): Structural comparisons among the short-chain helical cytokines. *Structure*, 2(3), 159-173
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *PNAS*, 74(12), 5463-5467
- Schuett, A., Zacharias, M., Schneider, N., Horn, S., Groetzinger, J., Rose-John, S. and Schmidt-Arras, D. (2013): gp130 activation is regulated by D2-D3 interdomain connectivity. *Biochem. J.*, 450, 487-496
- Sommer, J., Effenberger, T., Volpi, E., Waetzig, G. H., Bernhardt, M., Suthaus, J., Garbers, C., Rose-John, S., Floss, D. M. and Scheller, J. (2012): Constitutively Active Mutant gp130 Receptor Protein from Inflammatory Hepatocellular Adenoma Is Inhibited by an Anti-gp130 Antibody That Specifically Neutralizes Interleukin 11 Signaling. *J. Biol. Chem.*, 287(17), 13743-13751
- Stuhlmann-Laeisz, C., Lang, S., Chalaris, A., Paliga, K., Sudarman, E., Eichler, J., Klingmuller, U., Samuel, M., Ernst, M., Rose-John, S. and Scheller, J. (2006): Forced dimerization of gp130 leads to constitutive STAT3 activation, cytokine-independent growth, and blockade of differentiation of embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell*, 17(7), 2986-2995
- Suthaus, J., Tillmann, A., Lorenzen, I., Bulanova, E., Rose-John, S. and Scheller, J. (2010): Forced Homo- and Heterodimerization of All gp130-Type Receptor Complexes Leads to Constitutive Ligand-independent Signaling and Cytokine-independent Growth. *Mol. Biol. Cell*, 21(15), 2797-2807
- Tang, C. L., Chen, S., Qian, H. and Huang, W. L. (2012): Interleukin-23: as a drug target for autoimmune inflammatory diseases. *Immunology*, 135(2), 112-124

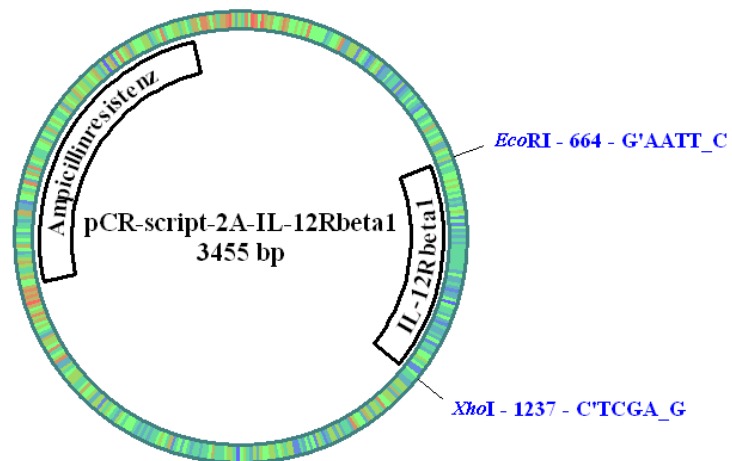
- Uhlig, H. H., McKenzie, B. S., Hue, S., Thompson, C., Joyce-Shaikh, B., Stepankova, R., Robinson, N., Buonocore, S., Tlaskalova-Hogenova, H., Cua, D. J. and Powrie, F. (2006): Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity*, 25(2), 309-318
- Yoshimura, A., Naka, T. and Kubo, M. (2007): SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.*, 7(6), 454-465
- Zheng, J., Jiang, L., Zhang, L., Yang, L., Deng, J., You, Y., Li, N., Wu, H., Li, W., Lu, J. and Zhou, Y. (2012): Functional genetic variations in the IL-23 receptor gene are associated with risk of breast, lung and nasopharyngeal cancer in Chinese populations. *Carcinogenesis*, 33(12), 2409-2416
- Zou, J., Presky, D. H., Wu, C. Y. and Gubler, U. (1997): Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta 1 and beta 2 and JAK kinases. *J. Biol. Chem.*, 272(9), 6073-6077
- Zwiers, A., Kraal, L., Kraan, T. C. T. M. v. d. P., Wurdinger, T., Bouma, G. and Kraal, G. (2012): Cutting Edge: A Variant of the IL-23R Gene Associated with Inflammatory Bowel Disease Induces Loss of MicroRNA Regulation and Enhanced Protein Production. *J. Immunol.*, 188(4), 1573-1577

7 Anhang

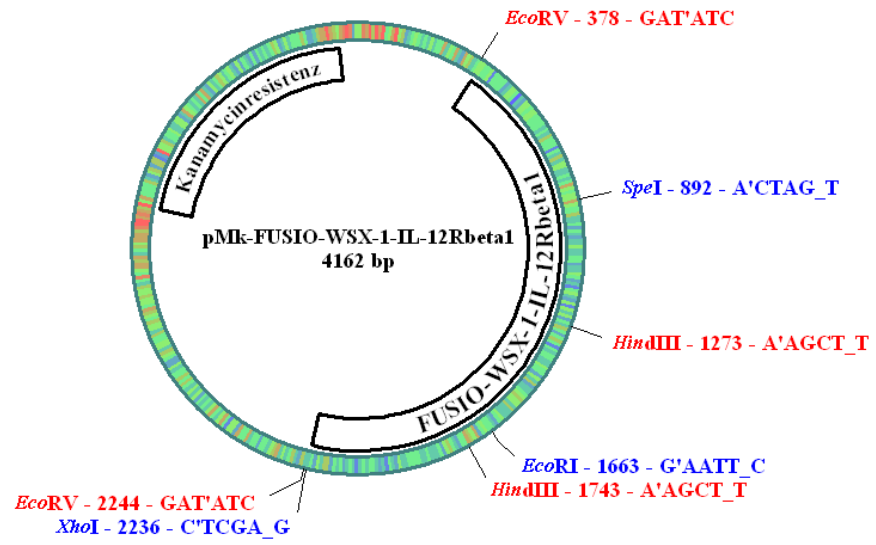
7.1 Vektorkarten



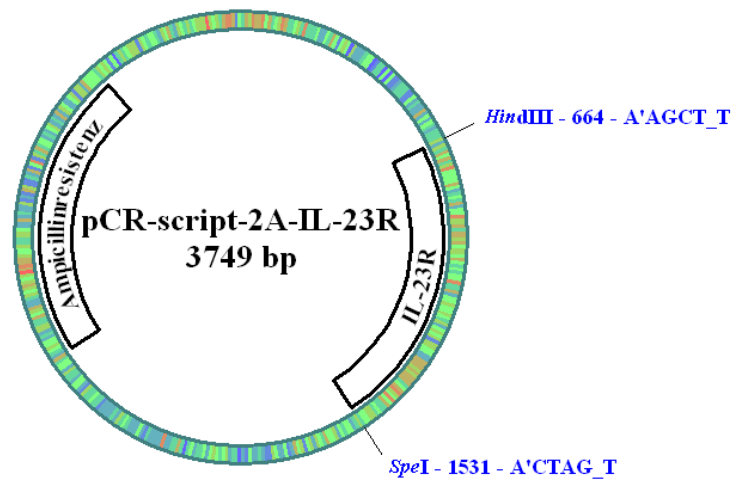
A



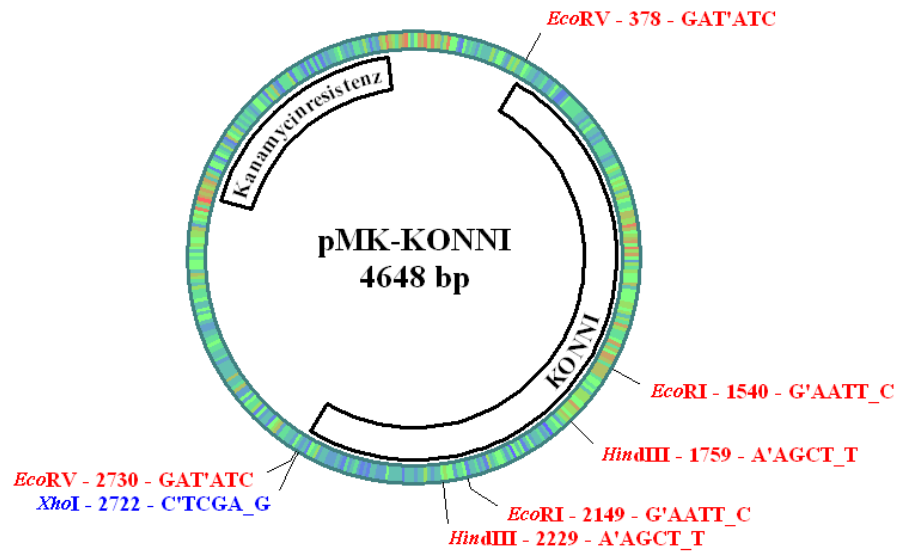
B



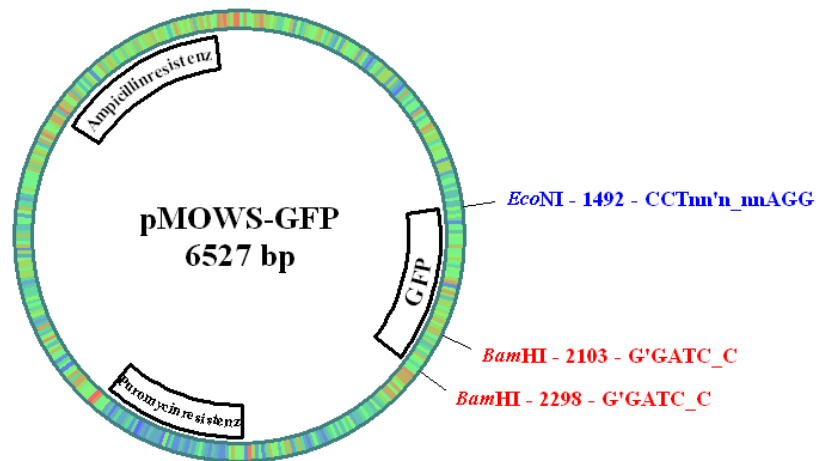
C



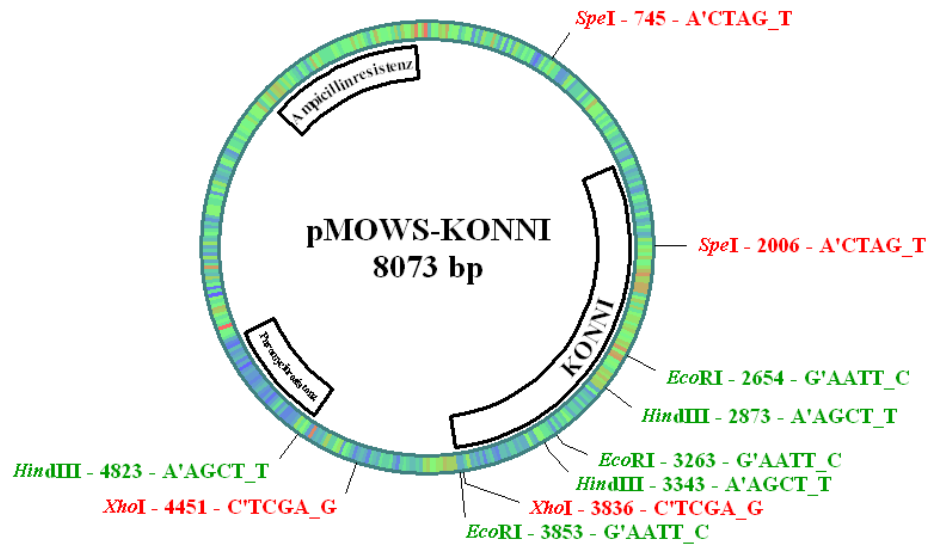
D



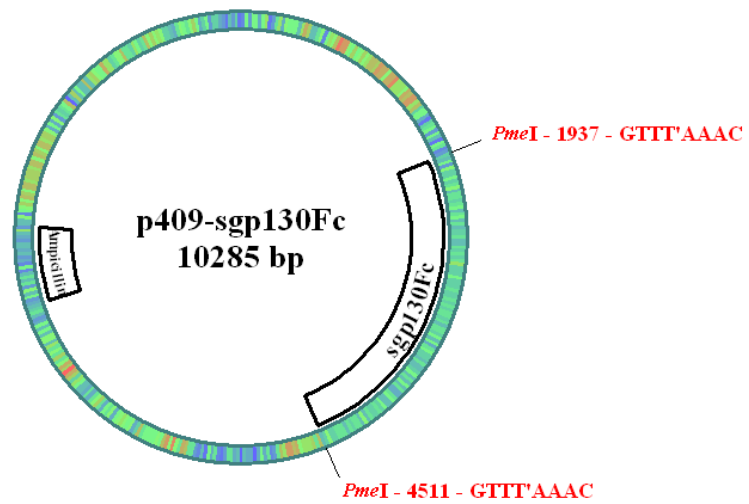
E



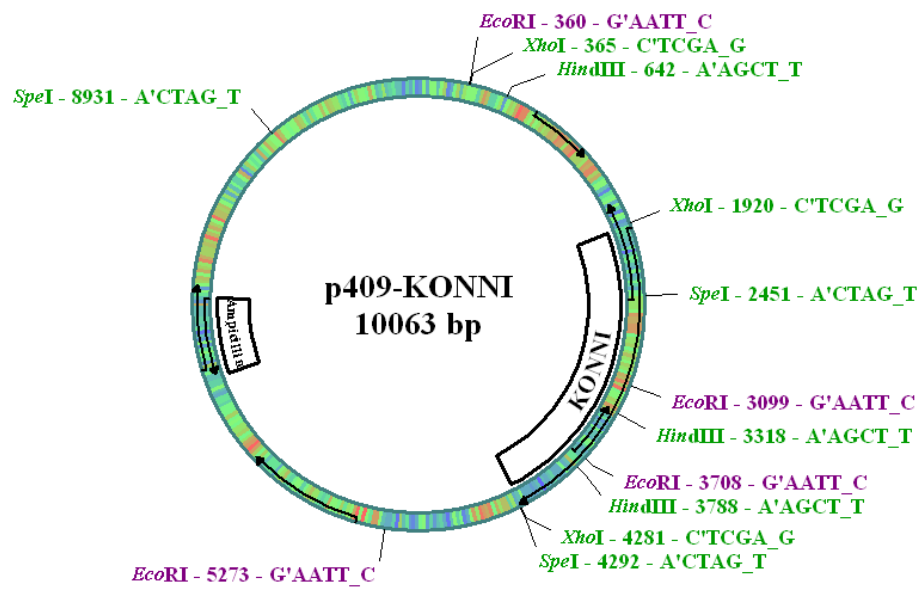
F



G



H



I

Abbildung 18: (A – I) Vektorkarten aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

7.2 Nukleotidsequenzen

FUSIO:

GATAT CTCTAGAGCC ACCATGGACA

401 GCAAGGGCTC TAGCCAGAAG GCCGGCAGCA GACTGCTCCT GCTCCTGGTC
451 GTGTCCAACC TGCTGCTGTG CCAGGGCGTG GTGTCCACCA CCAGAGACTA
501 CAAGGACGAC GACGACAAGG CGGCCGCCGG CCTGCCCAAG ACCGAGGCCA
551 ACTGGGTGAA CGTGATCAGC AGCCTGAAGA AGATCGAGGA CCTGATCCAG
601 AGCATGCACA TCGACGCCAC CCTGTACACA GAGAGCGACG TCCACCCAG
651 CTGCAAGGTG ACCGCCATGA AGTGCTTTCT GCTGGAGCTG CAGGTCATCA
701 GCCTGGAGAG CGGCGACGCC AGCATCCACG ACACCGTGGA GAACCTGATC
751 ATCTGGCCA ACAACAGCCT GAGCAGCAAC GGCAACGTGA CCGAGAGCGG
801 CTGCAAGGAG TGCAGGAGC TGGAGGAGAA GAACATCAAG GAGTTTCTGC
851 AGAGCTTCGT GCACATCGTG TCCATGTTCA TCAACACAAG CACTAGTAGC
901 CTGCATCTGC CCGACAACAG AATCAGATGG AAGGCCCTGC CCTGGTTCCT
951 GAGCCTGTGG GGCTGTCTGC TGATGGGCTG TGGCCTGAGC CTGGCCAGCA
1001 CCCGGTGTCT GCAGGCCAGA TGCCTGCATT GGCGGCACAA GCTGCTGCC
1051 CAGTGGATCT GGGAGAGAGT GCCCGACCCC GCCAACAGCA ACAGCGGCCA
1101 GCCCTACATC AAGGAGGTGT CCCTGCCCCA GCCCCCCAAG GACGGCCCA
1151 TCCTGGAGGT GGAAGAGGTG GAGCTGCAGC CCGTGGTGA GAGCCCTAAG
1201 GCCAGCGCCC CCATCTACAG CGGCTACGAG AAGCACTTCC TGCCCACCCC
1251 TGAGGAGCTG GGACTGCTGG TGAAGCTTAG AGCCAAGAGG GCCCTGTGA
1301 AGCAGACCTT GAACTTCGAC CTGCTGAAGC TGGCCGGCGA CGTGGAGAGC
1351 AACCTGGCC CTGCTAGCAT GCTGACCCTG CAGACCTGGC TGGTGCAGGC
1401 CCTGTTTCATC TTCTGACCA CCGAGAGCAC CGGCGAGCAG AAGCTGATCA
1451 GCGAGGAGGA TCTGATCACC TGCCCCCCTC CCATGAGCGT GGAGCACGCC
1501 GACATCTGGG TGAAGTCCTA CTCTCTGTAT TCCAGAGAGC GGTACATCTG
1551 CAACTCCGGC TTCAAGAGAA AGGCCGGCAC CAGCTCCCTG ACCGAGTGCG
1601 TGCTGAACAA GGCCACCAAC GTGGCCCACT GGACCACCCC CAGCCTGAAG
1651 TGCATCAGGG ACGAATTCAC CTTACCACC CCCAAGTTCG CTCAGGGCGA
1701 GATTGAGGCC ATCGTGGTGC CCGTGTGCC TGGCCTTCCTG CTGACAACCC
1751 TGCTGGGCGT GCTGTTCTGC TTCAACAAGC GGGACCTGAT CAAGAAGCAC
1801 ATCTGGCCCA ACGTGCCTGA CCCAGCAAG AGCCACATCG CCCAGTGGAG
1851 CCCCCACACC CCCCCAGAC ACAACTTCAA CAGCAAGGAC CAGATGTACA
1901 GCGACGGCAA CTTACCGAC GTGTCTGTGG TGGAGATCGA GGCTAACAAC
1951 AAGAAGCCCT GCCCCGACGA CCTGAAGTCC GTGGACCTGT TTAAGAAGGA
2001 GAAGGTCTCC ACCGAGGGCC ACAGCAGCGG CATCGGCGGC AGCAGCTGCA
2051 TGAGCAGCAG CAGACCCAGC ATCAGCAGCA ACGAGGAGAA CGAGAGCGCC
2101 CAGAGCACCG CCAGCACCGT GCAGTACAGC ACCGTGGTGC ACTCCGGCTA
2151 CAGACACCAG GTGCCAGCG TGCAGGTGTT CAGCAGAAGC GAGAGCACCC
2201 AGCCCCTGCT GGACAGCGAG GAGAGGCCCG AGGACCTGCA GCTGGTCGAC
2251 AGCGTGGACG GCGGCGACGA GATCCTGCC AGACAGAGCT ACTTCAAGCA
2301 GAACTGCAGC CAGCCCGAGG CTTGCCCCGA GATCAGCCAC TTTCGAGAGAA
2351 GCAACCAGGT GCTGTCCGGC AATGAGGAGG ACTTCGTCAG ACTGAAGCAG
2401 CAGCAGGTGT CCGACCACAT CAGCCAGCCT TACGGCAGCG AGCAGAGAAG
2451 GCTGTTCCAG GAGGGCAGCA CCGCCGACGC TCTCGGAACA GGCGCCGACG
2501 GCCAGATGGA GAGATTGAG AGCGTGGGCA TGGAGACAAC CATCGACGAG
2551 GAGATCCCCA AGAGCTACCT GCCCCAGACC GTGCGGCAGG GCGGCTACAT
2601 GCCCCAGTGA TGACTCGAGG ATATC

KONNI:

AT CTCTAGAGCC ACCATGGACA
 401 GCAAGGGCTC TAGCCAGAAG GCCGGCAGCA GACTGCTCCT GCTCCTGGTC
 451 GTGTCCAACC TGCTGCTGTG CCAGGGCGTG GTGTCCACCA CCAGAGACTA
 501 CAAGGACGAC GACGACAAGG CGGCCGCCGG CCTGCCAAG ACCGAGGCCA
 551 ACTGGGTGAA CGTGATCAGC AGCCTGAAGA AGATCGAGGA CCTGATCCAG
 601 AGCATGCACA TCGACGCCAC CCTGTACACA GAGAGCGACG TCCACCCAG
 651 CTGCAAGGTG ACCGCCATGA AGTGCTTTCT GCTGGAGCTG CAGGTCATCA
 701 GCCTGGAGAG CGGCGACGCC AGCATCCACG ACACCGTGGA GAACCTGATC
 751 ATCCTGGCCA ACAACAGCCT GAGCAGCAAC GGCAACGTGA CCGAGAGCGG
 801 CTGCAAGGAG TGCAGGAGC TGGAGGAGAA GAACATCAAG GAGTTTCTGC
 851 AGAGCTTCGT GCACATCGTG TCCATGTTCA TCAACACAAG CACTAGTGCT
 901 ACAATCTTCA GAGGACATCC TGCTTCAGGT AATCATCAAG ACATTGGACT
 951 TTTGTCCGGA ATGGTCTTCT TGGCCATCAT GTTGCCGATT TTTTCTCTGA
 1001 TTGGGATATT TAACAGATCA CTTCGAATAG GAATTAAAAG AAAAGTTTTA
 1051 CTGATGATCC CAAAGTGGCT TTATGAAGAT ATTCCTAATA TGGAAAATAG
 1101 CAATGTTGCA AAATTATTAC AGGAAAAAAG TGTATTTGAG AATGATAATG
 1151 CCAGTGAGCA GGCCCTGTAT GTGGATCCTG TCCTTACAGA GATAAGTGAA
 1201 ATCTCTCCCC TGGAACACAA ACCCACAGAT TACAAAGAAG AAAGGCTCAC
 1251 AGGACTCCTT GAGACAAGAG ACTGTCTCT AGGAATGTTG TCTACCAGTT
 1301 CTTCTGTTGT GTATATTCTT GACCTCAACA CTGGATACAA ACCCCAGTT
 1351 TCAAATGTTT CTCCTGGAGG AAACCTTTTC ATTAACAGAG ATGAAAGAGA
 1401 CCCTACATCC CTTGAGACCA CAGATGACCA CTTTGCCAGA TTGAAAACAT
 1451 ATCCCAACTT CCAATTTTCT GCTTCAAGTA TGGCTTTACT AAACAAAACA
 1501 CTAATTCTTG ATGAATTGTG CCTCGTTTTA AATCAAGGAG AATTCAATTC
 1551 TCTTGACATA AAAAACTCAA GACAGGAGGA AACCAGCATC GTTTTGCAA
 1601 GTGACTCACC CAGTGAAACT ATCCAGCGC AGACTCTGTT GTCTGATGAA
 1651 TTTGTCTCCT GTTTGGCAAT TGGGAATGAA GACTTGCCAT CTATTAATTC
 1701 TTACTTTCCA CAGAACGTTT TGGAAAGCCA TTTCAGTAGA ATTTACTCT
 1751 TCCAAAAGAA GCTTAGAGCC AAGAGGGCCC CTGTGAAGCA GACCCTGAAC
 1801 TTCGACCTGC TGAAGCTGGC CGGCGACGTG GAGAGCAACC CTGGCCCTGC
 1851 TAGCATGCTG ACCCTGCAGA CCTGGCTGGT GCAGGCCCTG TTCATCTTCC
 1901 TGACCACCGA GAGCACCAGC GAGCAGAAGC TGATCAGCGA GGAGGATCTG
 1951 ATCACCTGCC CCCCTCCCAT GAGCGTGGAG CACGCCGACA TCTGGGTGAA
 2001 GTCCTACTCT CTGTATTCCA GAGAGCGGTA CATCTGCAAC TCCGGCTTCA
 2051 AGAGAAAGGC CGGCACCAGC TCCCTGACCG AGTGCGTGCT GAACAAGGCC
 2101 ACCAACGTGG CCCACTGGAC CACCCCAGC CTGAAGTGCA TCAGGGACGA
 2151 ATTCGCCTGG AGTCATCCCC AGCGCTTTAG CTTTGAGGTG CAGATTTCCC
 2201 GTTTATCCAT CATTTTCGCG TCTCTGGGAA GCTTCGCCAG CGTCTCCTC
 2251 GTGGGCAGTC TCGGATACAT TGGCTTAAAC AGGGCCGCCT GGCATTGTG
 2301 CCCACCCCTG CCTACACCCT GTGGCAGCAC TGCCGTGGAG TTCCCTGGCA
 2351 GCCAGGGCAA GCAGGCTTGG CAGTGGTGCA ACCCTGAGGA CTTCGCGAG
 2401 GTGTTGTACC CGCGAGATGC GCTGGTGGTC GAGATGCCCG GAGACAGAGG
 2451 CGACGGGACA GAGTCGCCCC AGGCCGCCCC TGAGTGCGCC CTGGACACAA
 2501 GCGGCCCTT GGAGACTCAG AGGCAGAGGC AGGTGCAGGC ACTGTCAGAG
 2551 GCCAGGCGCC TGGGCCTGGC TAGGGAGGAC TGTCCCCGTG GTGACCTGGC
 2601 CCACGTGACA CTCCCGCTGC TCCTGGGAGG TGTGACCCAG GGAGCCTCTG
 2651 TACTTGACGA TCTTTGGAGG ACCATAAGA CTGCGGAGCC GGGACCGCCC
 2701 ACTTTGGGGC AAGAGGCCTG ACTCGAGGAT

8 Danksagung

Zunächst möchte ich ganz herzlich Prof. Dr. Stefan Rose-John sowie Prof. Dr. Jürgen Scheller dafür danken, dass ich diese interessante Arbeit bei Ihnen im Institut anfertigen durfte und für die ausgezeichnete Betreuung im Verlauf meiner Arbeit.

Prof. Dr. Björn Rabe gilt mein besonderer Dank für die konstruktiven und freundlichen Ratschläge bei der Korrektur meiner Arbeit.

Ich danke Dr. Doreen Floss für die Einführung sowohl in die Thematik als auch in die Laborarbeit. Ein großes Dankeschön geht an Jessica Schneider für ihre unendliche Geduld bei der Lösung all meiner technischen Probleme und an Dr. Jan Suthaus für die vielen wertvollen experimentellen Tipps.

Dr. Katja Möller-Hackbarth, Dr. Christoph Garbers, Annett Lickert, Jessica Schneider sowie dem gesamten Team der Abteilung „Molekulare Biologie der Zytokine“ danke ich für die schöne Zeit, die lustigen Momente und für ihre Hilfestellungen im Laboralltag.

Meiner kleinen Schwester danke ich für ihre aufwändige Hilfe bei der Erstellung meiner Arbeit. Du hast mir alles sehr erleichtert, danke!

Marcus Peter schulde ich großen Dank für die Hilfe bei der Formatierung dieser Arbeit.

Der größte Dank aber geht an meine Eltern: Für Euren jahrelangen finanziellen und vor allem emotionalen Beistand im Verlauf meines Studiums werde ich Euch immer dankbar sein.

Zu guter Letzt danke ich meinem Mann, der mir bei der Erreichung aller meiner Ziele und Wünsche unermüdlich mit seiner Liebe und Unterstützung zur Seite steht.

9 Lebenslauf

Name: Anne Oberdoerster

Geboren am: 28.06.1984

Geburtsort: Berlin

Familienstand: verheiratet, 3 Kinder

1996 – 2004 Besuch des Archenholdgymnasiums in Berlin mit Abschluss Abitur

2001 – 2002 Besuch der Connetquot Highschool in New York, USA

2004 – 2005 Absolvierung von Praktika und Sprachschulen in Warschau (Polen), Playa del Carmen (Mexiko), Berlin und Wien

2005 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Hamburg

2007 – 2008 Elternzeit

2008 Ärztliche Vorprüfung

2008 Fortsetzung des Medizinstudiums an der Christians-Albrecht-Universität zu Kiel

2009 Beginn der experimentellen Doktorarbeit bei Prof. Dr. Stefan Rose-John und Prof. Dr. Jürgen Scheller

2010 – 2011 Elternzeit

2011 Teilnahme am internationalem Studentenkongress der I.M. Sechenova in Moskau, mit Auszeichnung

2011 – 2013 Famulaturen in den Fächern Kinder- und Jugendpsychiatrie, Neurologie, Rechtsmedizin und Allgemeinmedizin in Kiel, sowie am „Institute for Indian Mother and Child“ in Kalkutta, Indien

2010 – 2013 Dozententätigkeit im Fach Chirurgie für Pflegeschüler und Pflegeassistenten am Städtischen Krankenhauses Kiel, Wissenschaftliche Hilfskraft in der Pathologie des Universitätsklinikums Kiel, ehrenamtliche Mitarbeit im Medibüro Kiel

2013 Elternzeit

2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung