

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR
KLINISCHE CHEMIE UND LABORATORIUMSMEDIZIN
PROF. DR. GERD SCHMITZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DIFFERENTIELLES SHEDDING DES LÖSLICHEN INTERLEUKIN 6-REZEPTORS
DURCH AKUT-PHASE PROTEINE
DER PENTRAXIN- UND APOLIPOPROTEIN-FAMILIE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Judith Elisabeth Maier

2008

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR
KLINISCHE CHEMIE UND LABORATORIUMSMEDIZIN
PROF. DR. GERD SCHMITZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DIFFERENTIELLES SHEDDING DES LÖSLICHEN INTERLEUKIN 6-REZEPTORS
DURCH AKUT-PHASE PROTEINE
DER PENTRAXIN- UND APOLIPOPROTEIN-FAMILIE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Judith Elisabeth Maier

2008

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Mariam Klouche
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Fleck
Tag der mündlichen Prüfung: 28. 11. 2008

Für meine Eltern
Hans und Romy Maier

Für meinen Großvater
Anton Wolf

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	4
1. 1. Vorwort	4
1. 2. Zentrale Rolle des IL-6 in der Regulation der Akut-Phase Reaktion	5
1. 3. Aufbau und Signaltransduktion des IL-6-Rezeptorkomplex	6
1. 3. 1. Der spezifische IL-6-Rezeptor	8
1. 3. 2. Gp130: ubiquitärer Signaltransduktior für die Zytokine der IL-6-Familie	9
1. 4. Transsignalling: reziproke Interaktion von APP mit dem IL-6-System ?	10
1. 5. Generierung löslicher Zytokinrezeptoren durch Shedding	12
1. 5. 1. Mechanismus des Ektodomänen-Shedding	13
1. 5. 1. 1. Shedding des sIL-6R durch Metalloproteasen	13
1. 5. 1. 2. Shedding von sgp130	14
1. 5. 1. 3. Shedding von sL-Selektin	15
1. 5. 2. Akut-Phase Protein-induziertes Shedding	17
1. 5. 2. 1. Die Pentraxin-Familie von APP	18
1. 5. 2. 1. 1. Struktur-Funktionsprinzip der Pentraxine am Beispiel des CRP	19
1. 5. 2. 1. 2. Pentraxin-3: erstes primär extrahepatitisches APP	20
1. 5. 2. 2. Serum-Amyloid A: APP mit spezifischem Rezeptor	21
2. FRAGESTELLUNG	24
3. MATERIAL UND METHODEN	26
3. 1. Material	26
3. 1. 1. Zellkulturmedien	26
3. 1. 2. Kulturplatten	26
3. 1. 3. Stimuli	26
3. 1. 4. Lösungsmittel	28
3. 1. 5. Quantifizierung von sIL-6R, sgp130 und sL-Selektin	28
3. 1. 6. Material für die Elutriation humaner Monozyten	29
3. 1. 7. Einwegartikel	29
3. 2. Methoden	29
3. 2. 1. Methodischer Ansatz	29

3. 2. 2. Spenderauswahl-Kriterien	30
3. 2. 3. Isolierung humaner Monozyten	30
3. 2. 4. Analyse des Akut-Phase Protein-induzierten Shedding von sIL-6R	33
3. 2. 4. 1. Stimulation von undifferenzierten Monozyten mit APP	33
3. 2. 4. 2. Stimulation von differenzierten Makrophagen	34
3. 2. 4. 3. Funktionelle Charakterisierung des Shedding-Mechanismus	35
3. 2. 4. 4. Quantifizierung des Gehalts an löslichem Rezeptor	37
3. 3. Statistische Auswertung	38
3. 3. 1. Signifikanz	38
3. 3. 2. Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben	39
3. 3. 3. Korrelation	42
<u>4. ERGEBNISSE</u>	43
4. 1. Konstitutive Freisetzung von sIL-6R, sgp130 und sL-Selektin	43
4. 1. 1. Spontane Freisetzung von sIL-6R	44
4. 1. 1. 1. Kinetik der spontanen sIL-6R -Freisetzung	44
4. 1. 1. 2. Positive Korrelation von Leukozytenzahl und IL-6R-Shedding	46
4. 1. 1. 3. Geschlechtsprädiktion des spontanen sIL-6R-Shedding	47
4. 1. 1. 4. Funktionelle Analyse des konstitutiven sIL-6R-Shedding	48
4. 1. 2. Spontane Generierung von sgp130	49
4. 1. 2. 1. Vergleich der konstitutiven Freisetzung von sgp130 und sIL-6R	50
4. 1. 3. Charakteristika der spontanen Freisetzung von sL-Selektin	52
4. 1. 3. 1. Kinetik der konstitutiven sL-Selektin-Freisetzung	52
4. 1. 3. 2. Funktionelle Untersuchung der konstitutiven sL-Selektin-Freisetzung	53
4. 2. Differentielle Induktion der sIL-6R-Freisetzung durch APP	54
4. 2. 1. sIL-6R-Freisetzung unter physiologischen APP-Konzentrationen	56
4. 2. 2. Signifikante Induktion der Freisetzung von sIL-6R durch SAA	57
4. 2. 2. 1. APP-spezifische und Rezeptor-selektive Induktion des Shedding	58
4. 2. 2. 2. Dosis-Abhängigkeit der SAA-induzierten sIL-6R-Freisetzung	61
4. 2. 2. 3. Kinetik der SAA-vermittelten sIL-6R-Freisetzung	62
4. 2. 2. 4. Funktionelle Analyse der SAA-vermittelten Freisetzung von sIL-6R	63

5. DISKUSSION	65
5. 1. Differentielle Induktion des sIL-6R-Shedding durch SAA	65
5. 1. 1. Selektivität des APP-vermittelten sIL-6R-Shedding	65
5. 1. 2. Dosis-Wirkungs-Beziehung und Kinetik des SAA-vermittelten Shedding	66
5. 1. 3. Rezeptor-Spezifität des SAA-vermittelten Shedding	67
5. 1. 4. Mechanismus des SAA-induzierten sIL-6R-Shedding	68
5. 1. 5. Abhängigkeit des sIL-6R-Shedding vom Zelltyp	69
5. 2. Mögliche pathophysiologische Implikationen	70
5. 2. 1. Lokale SAA-Überexpression in der Rheumatoide Arthritis	70
5. 2. 2. Atherosklerose als chronische Entzündung	71
6. ZUSAMMENFASSUNG	73
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	74
8. LITERATUR	77
9. DANKSAGUNG	97
10. LEBENSLAUF	98

1. EINLEITUNG

1. 1. Vorwort

In Konfrontation mit einem inflammatorischen Stimulus ist eine der ersten u. a. auch laborchemisch erfassbaren Reaktionen des menschlichen Organismus die sogenannte „Akut-Phase Reaktion“ (APR). Sie ist gekennzeichnet durch den raschen und starken Anstieg der Konzentration bestimmter Proteine im Blutplasma - der „Akut-Phase Proteine“ (APP) - sowie der Aktivierung von Leukozytensubpopulationen und Rekrutierung an den Ort des entzündlichen Geschehens [01]. In der Verschiebung des Plasma-Proteinmusters dominieren quantitativ die Pentraxine und Lipid-artigen APP, deren klassische Vertreter das C-reaktive Protein (CRP) bzw. das inflammatorische Apolipoprotein Serum-Amyloid A (SAA) darstellen [02]. Obwohl die Synthese von Akut-Phase Proteinen in erster Linie in der Leber erfolgt, konnte mit dem Pentraxin-3 (PTX3) auch ein primär extrahepatisches APP identifiziert werden.

Die Regulation der Akut-Phase Reaktion erfolgt durch Zytokin-vermittelte Signalkaskaden. Insbesondere die proinflammatorischen Zytokine Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 1 (IL-1) und TNF α (Tumor necrosis factor alpha) spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Unklar ist jedoch, ob auch eine reziproke Interaktion der APP mit den regulatorischen Zytokinen möglich ist.

1. 2. Zentrale Rolle des IL-6 in der Regulation der Akut-Phase Reaktion

Die hepatische und extrahepatische Expression von Akut-Phase Proteinen wird durch proinflammatorische Zytokine reguliert. Der zentrale Regulator der Akut-Phase Reaktion ist das pleiotrope Zytokin IL-6, sowie weitere Zytokine der IL-6-Familie [03] [04] [05] [06] [07] [08]. Zu dieser Familie von proinflammatorischen Zytokinen zählen auch das IL-11, der ziliare neurotrophische Faktor (CNTF), das Cardiotrophin 1 (CT-1), der Leukemia inhibitory factor (LIF) und das Oncostatin M (OSM). [18]. Im Jahr 2004 konnten mit dem Cardiotrophin like cytokine (CLC) (synonym auch Novel Neurotrophin 1 (NNT1) bzw. B-Cell Stimulating Factor 3 (BSF3)) und IL-27 zwei neue Mitglieder dieser Zytokin-Familie identifiziert werden [09].

Neben IL-6 als zentralem Regulator üben auch weitere Zytokine wie z. B. das Interleukin 1 β (IL-1 β), der TNF α , das Interferon γ (IFN γ) und der Transforming Growth Factor β (TGF β) einen modulierenden Effekt auf die Synthese von Akut-Phase Proteinen aus. Allerdings ist sowohl in Hepatozytenkulturen als auch *in vivo* eine direkte Induktion der CRP-Expression nur durch IL-6 möglich. [04] [10].

Die Regulation der APP-Genexpression findet hierbei hauptsächlich auf der Ebene der Transkription durch Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren statt [11]. Darüber hinaus sind aber auch durch das IL-6 vermittelte post-transkriptionale Veränderungen der APP-Moleküle bedeutsam, wie etwa die IL-6-induzierte Glykosilierung der Peptidketten, durch die die Stabilität und über das Bindungsverhalten auch die immunologische Funktion beeinflusst werden [12]. Zudem kommt den spezifischen Interaktionen des IL-6 mit den oben angeführten modulierend wirkenden Zytokinen eine bedeutende Rolle für eine kontrollierte Genexpression zu, da die in das inflammatorische Geschehen involvierten Zellen in der Regel nicht nur mit einem einzelnen Zytokin konfrontiert werden. So konnten Untersuchungen an Knock-out Mäusen für IL-6 [13] und IL-1 β [14] zeigen, daß die Expression von Akut-Phase Proteinen entscheidend von der Art des jeweiligen inflammatorischen Stimulus abhängt, da diese die jeweils vorherrschende Zytokin-Konstellation bestimmt

Die induktive Wirkung des IL-6 auf die APP-Expression resultiert in einer bis zu 1000fach erhöhten plasmatischen Konzentration dieser Proteine. Im Rahmen akut-inflammatorischer

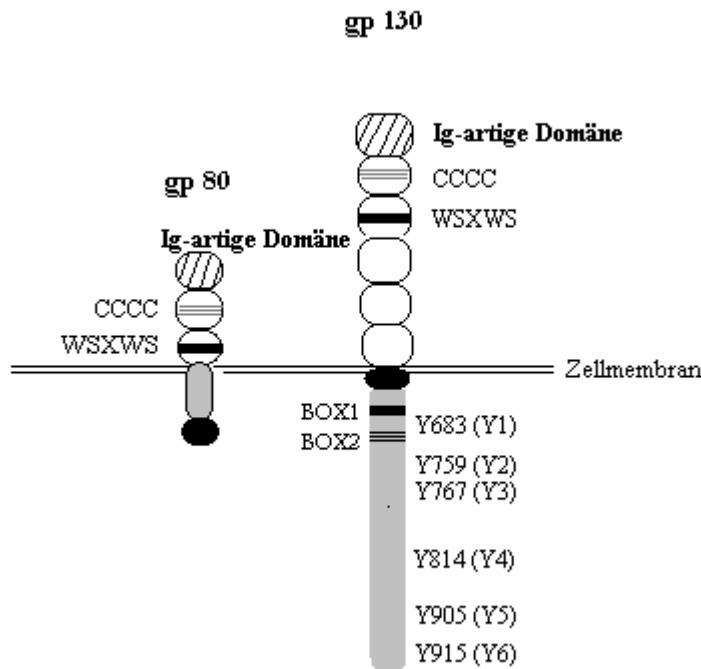
Prozesse erfolgt dieser dramatische Konzentrations-Anstieg binnen weniger Stunden nach der primären Konfrontation des Organismus mit dem inflammatorischen Stimulus.

Neben der Steuerung der APP-Synthese als humorales Element der Akut-Phase Reaktion ist das IL-6 auch gleichzeitig der zentrale Regisseur der zellulären Aktivität [03]. So vermittelt es durch sequenzielle Apoptoseinduktion einerseits sowie neben speziellen Chemokinen andererseits auch über Chemotaxis ein „Shift“ des leukozytären Profils im entzündlich veränderten Gewebe, dessen histomorphologisches Korrelat der Wandel des primären Neutrophilen-Infiltrats hin zu einer dominierenden mononukleären Zellpopulation darstellt [05] [06]. Gleichzeitig moduliert IL-6 Bedarfs-adaptiert die spezifische mononukleäre Zell-Differenzierung, so daß der Makrophagen-Phänotyp im zeitlichen Verlauf der akuten Inflammation den der dendritischen Zellen überwiegt [15]. Diese koordinierte Rekrutierung und „Clearance“ der Leukozyten-Subpopulationen scheint vor allem beim Übergang der akuten Inflammation in einen chronisch-entzündlichen Zustand gestört zu sein, so daß es nach fehlender oder unvollständiger Zell-Elimination zum lokalen Verbleib einer aktivierten leukozytären Mischpopulation kommt [05].

1. 3. Aufbau und Signaltransduktion des IL-6-Rezeptorkomplex

Charakteristisches Merkmal der Zytokine aus der IL-6-Familie ist der Aufbau des membranständigen Rezeptor-Komplexes aus dem für das jeweilige Zytokin spezifischen Liganden und dem Glykoprotein 130 (gp130) als Vermittler der Signaltransduktion [08] [16]. Die Expression der spezifischen Liganden ist dabei auf wenige Zellarten beschränkt. Dabei handelt es sich um Monozyten, Makrophagen, Hepatozyten und aktivierte B- und T-Lymphozyten [17]. Gp130 wird dagegen ubiquitär auf nahezu allen Zellarten des menschlichen Organismus exprimiert [18]. Abbildung 1 illustriert die molekulare Struktur des IL-6-Rezeptorkomplex:

Abbildung 1: Struktur des IL-6-Rezeptorkomplex



CCCC: vier Cytosin-Reste, evolutionär konserviertes Sequenzelement der Ektodomäne von Typ I-Zytokin-Rezeptoren

WXWSW: Sequenzmotiv „Tryptophan-Serin-X Tryptophan-Serin“ ebenfalls charakteristische für Typ I-Zytokin-Rezeptoren

Y 1 – 6: spezifische Tyrosylreste der zytoplasmatischen Domäne von gp130, die nach Phosphorylierung und Bildung von Disulfidbrücken die für die Expression von Akut-Phase Proteinen erforderlichen Transkriptionsfaktoren binden

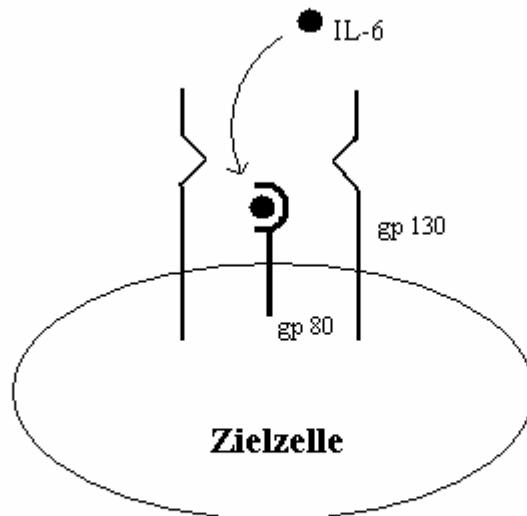
BOX1,2: evolutionär konservierte juxtamembranäre Aminosäure-Motive, verantwortlich für die JAK-Bindung

Ursprüngliche Konzeption entnommen aus [08]

Zur erfolgreichen Umsetzung des IL-6-Signals bindet zirkulierendes IL-6 auf der Zelloberfläche zunächst an gp80 als spezifischen Liganden. Daher wird gp80 synonym auch als IL-6-Rezeptor (IL-6R) bezeichnet. Dieser Komplex aus IL-6R und gebundenem IL-6 assoziiert mit gp130, was zu einer Dimerisierung zweier gp130-Moleküle führt und die Signaltransduktion initiiert. Dieser Mechanismus mit der Bildung eines gp130-Homodimers gilt auch für das IL-11 und seinen spezifischen Rezeptor. Im Falle des CNTF und CT-1 kommt es dagegen zur Bildung eines Heterodimers aus gp130 und dem

verwandten LIF-Rezeptor [08]. Abbildung 2 zeigt schematisch die Bindung von freiem IL-6 an den spezifischen Liganden gp80 mit Bildung des gp130-Homodimers.

Abbildung 2: Interaktion von IL-6 mit dem membranständigen IL-6-Rezeptorkomplex



Gp80: spezifischer Ligand für freies IL-6, transmembranares Glykoprotein mit Molekulargewicht von 80 kDa, synonym auch IL-6R

Gp130: ubiquitär exprimierte transmembranares Glykoprotein, Signal-transduzierende Untereinheit der Rezeptoren der IL-Familie

Ursprüngliche Konzeption entnommen aus [19]

1. 3. 1. Der spezifische IL-6-Rezeptor

IL-6R ist ein transmembranares Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 80 kDa und einer Länge von 449 Aminosäuren (AS). Das extrazelluläre N-terminale Ende weist eine Immunglobulin-artige Domäne auf und ähnelt damit in der Molekularstruktur den Rezeptoren für M-CSF (macrophage colony stimulating factor), PDGF (platelet-derived growth factor) und IL-1. Der intrazelluläre Anteil hat eine Länge von 82 Aminosäuren, zeigt aber von der Molekularstruktur her keine Übereinstimmung mit anderen Rezeptormolekülen [17]. Der Genort für gp80 befindet sich beim Menschen auf Chromosom 1 (1q21) [20].

Durch posttranskriptionale Modifikation des fertigen Rezeptormoleküls entstehen zwei verschiedene Formen des IL-6R, die sich durch ihre Bindungsaffinität zum IL-6 unterscheiden (K_{dis} : 10^{-9} und 10^{-11} M). Da sich aber die biologische Aktivität von IL-6 bereits bei um einige Zehnerpotenzen geringeren Konzentrationen entfaltet, nahm man an, daß möglicher Weise weitere Isoformen des Rezeptors oder auch bisher unbekannte Rezeptormoleküle für das IL-6 existieren könnten. Heute weiß man, daß diese Funktion durch gp130 übernommen wird, indem es durch Assoziation mit spezifischen Rezeptormolekülen wie IL-6R oder LIF-R, die selbst eine relativ geringe Ligandenaffinität aufweisen Komplexe bildet, die dann eine hohe Affinität zu den entsprechenden Liganden aufweisen. Deshalb wird gp130 auch als "affinity-converter" bezeichnet [21]. Diese Fähigkeit zur Steigerung der Ligandenaffinität scheint dabei strukturell mit einem definierten Bereich des N-Terminus von gp130 assoziiert zu sein [22].

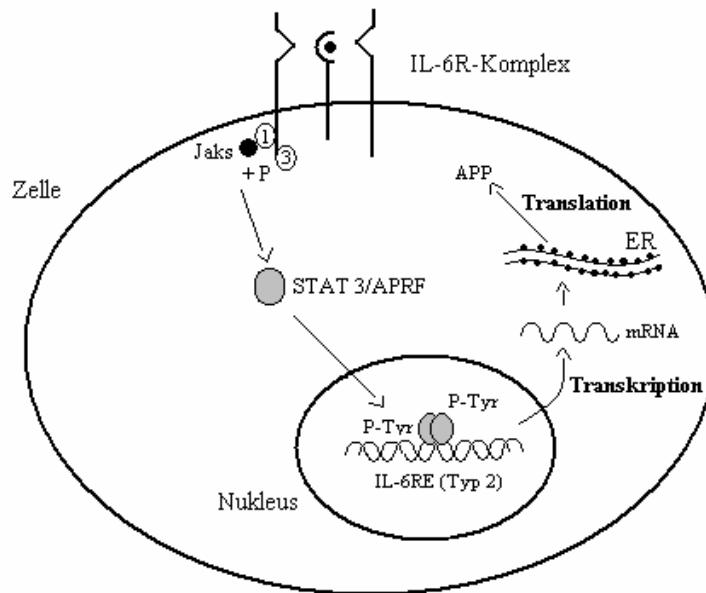
1. 3. 2. Gp130: ubiquitärer Signaltransduktör für die Zytokine der IL-6-Familie

Das ubiquitär exprimierte gp130 (CD130) dient den Zytokinen der IL-6-Familie als gemeinsamer Vermittler der Signaltransduktion. Der Signaltransduktions-Mechanismus ist dabei mit der 277 AS langen intrazellulären Domäne des transmembranären Glykoproteins assoziiert. Im Gegensatz dazu hat die intrazelluläre Domäne von gp80 keine Signaling-transduzierende Funktion [08].

Die IL-6-vermittelte Induktion der Expression von Akut-Phase Proteinen erfolgt über den gp130-abhängigen JAK/STAT-Aktivierungsweg: Der initiale Schritt zum Ablauf der Signaltransduktionkaskade nach der Homodimerisierung von gp130 markiert die Phosphorylierung von tyrosinspezifischen Kinasen, den JAKs (JAK = Janus kinase). Diese haben zuvor an bestimmte konservierte Sequenzen der juxtamembranären Domäne von gp130 (BOX1 u. BOX2) gebunden [23]. Durch die aktivierte JAKs werden wiederum Tyrosylreste der zytoplasmatischen gp130-Domäne phosphoryliert (siehe Abbildung 2: Y1-Y6), an die über Ausbildung von Disulfidbrücken bestimmte Transkriptionsfaktoren – die STATs (Signal transducers and activators of transcription) – binden. Diese durch Phosphorylierung aktivierte STATs dimerisieren und werden in den Zellkern transloziert, wo sie an Erkennungssequenzen in den Promoterregionen der Zielgene binden und die Transkription dieser Gene induzieren. [08] [24]. Im Falle der Induktion der APP-Synthese ist insbesondere STAT3 sowie STAT 1 und 5 von Bedeutung.

Für STAT3 konnte gezeigt werden, daß es die Transkription von CRP induziert und wurde deshalb ursprünglich als APRF (Acute Phase Response Factor) bezeichnet. Abbildung 3 illustriert zusammenfassend diese Signaltransduktionskette.

Abbildung 3: Signaltransduktionsweg der IL-6 induzierten APP-Synthese



Jak: Janus Kinase,

P: Phosphatrest

STAT3/APRF: Signal Transducer and Activator of Transcription 3, synonym Acute Phase Response Factor

P-Tyr: phosphorylierte Tyrosylreste

IL-6RE: IL-6 Response Element in den APP-Genen

mRNA: messenger Ribonukleinsäure

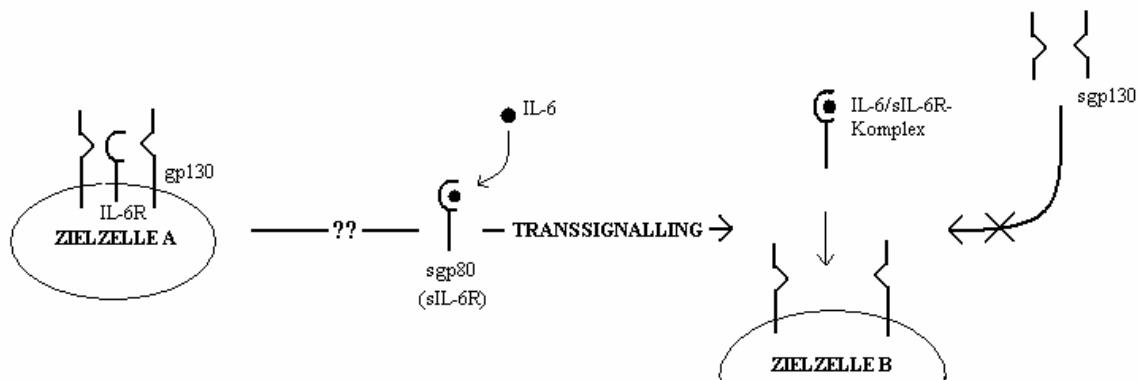
ER: Endoplasmatisches Retikulum

1. 4. Transsignalling: reziproke Interaktion von APP mit dem IL-6-System ?

Eine Eigenschaft durch die sich das IL-6 von allen anderen Interleukinen wesentlich unterscheidet, ist das „Transsignalling“. Das IL-6-Signal wird nämlich nicht nur über den membranständig exprimierten IL-6R vermittelt, sondern auch über funktionelle lösliche Formen dieses spezifischen IL-6-Liganden (sIL-6R, s = soluble). Zirkulierendes IL-6 kann an diesen löslichen Rezeptor mit gegenüber dem membranständigen vergleichbarer

Affinität binden und bildet so den sIL-6R/IL-6-Komplex. Dieser wirkt agonistisch, d. h. er bindet an Zellen, die ursprünglich nicht mit IL-6 interagieren konnten, da sie lediglich gp130 und nicht IL-6R (gp80) exprimieren, und aktiviert dort die Signaltransduktion über gp130. Diesen Vorgang bezeichnet man als “Transsignalling“ [25] [26] [27]. Durch das ubiquitäre Vorkommen von gp130 wird damit das Spektrum an Zielzellen für das IL-6-Signal erheblich erweitert. Somit erscheint eine systemische Responsivität für IL-6 möglich. Die Regulation des Transsignalling scheint interessanterweise auch durch lösliche Formen des gp130 (sgp130) zu erfolgen, die sich im Plasma gesunder Personen mit einer Konzentration von ca. 390 ng/ml finden [28]. Dimerisiertes lösliches gp130 kann an den sIL-6R/IL-6-Komplex binden und dadurch das Transsignalling inhibieren [29] [30] [31] [32] [33]. Ein weiterer zentraler Aspekt im Hinblick auf die Regulation der sIL-6R-Freisetzung ist zudem die quantitativ unterschiedliche gp80-Dichte auf den verschiedenen Zellpopulationen. So exprimieren Hepatozyten im Vergleich zu Monozyten deutlich mehr gp 80 auf der Zelloberfläche. Abbildung 4 zeigt schematisch den Zusammenhang zwischen löslichem IL-6R und dem Transsignalling bzw. die Inhibition durch sgp130.

Abbildung 4: Mechanismus des Transsignalling



Zielzelle A: IL-6-responsiv (z. B. Monozyt, Makrophage, Granulozyt)

Zielzelle B: ursprünglich nicht IL-6-responsiv (z. B. Endothelzelle, glatte Muskelzelle)

Ursprüngliche Konzeption entnommen aus [30]

Im Hinblick auf die immunoregulatorischen, proliferativ-differenzierenden und hämatopoetischen Eigenschaften von IL-6 ließ sich die funktionelle Aktivität des sIL-6R/IL-6-Komplexes bereits durch zahlreiche Untersuchungen bestätigen [34 – 42].

Das IL-6-Transsignalling stellt somit einen zentralen neuen Mechanismus der Signalvermittlung im Netzwerk proinflammatorischer Zytokine dar. Im Hinblick auf die Akut-Phase Reaktion konnte gezeigt werden, daß der sIL-6R/IL-6-Komplex via Transsignalling eine Induktion sowie Modulation der APP-Synthese bewirken kann [43 - 45]. Zudem scheint es an der regulierten Rekrutierung von Leukozytensubpopulationen in das lokal entzündlich veränderte Gewebe beteiligt zu sein [46].

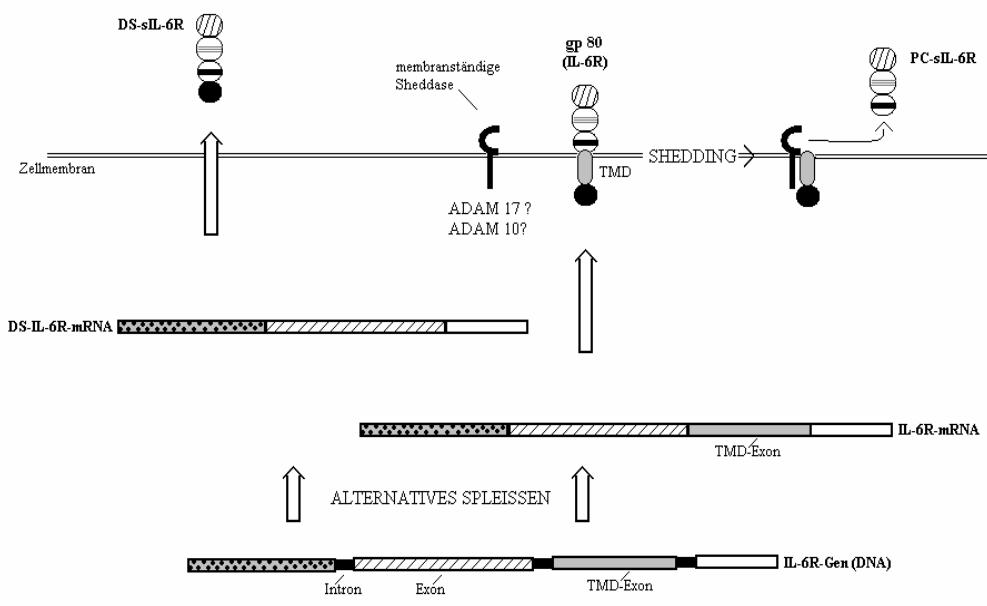
1. 5. Generierung löslicher Zytokinrezeptoren durch Shedding

Bisher kennt man zwei Wege der Generierung von sIL-6R:

- **Alternatives Spleißen** der IL-6R-mRNA (DS-sIL-6R mit DS = Differential Splicing) [47 – 50]
- **Shedding** als proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne des IL-6R (PC-sIL-6R mit PC = Proteolytic Cleavage) [27] [47] [50]

Beide Mechanismen können prinzipiell in einer Zelle gleichzeitig ablaufen, sofern die entsprechende Zellart den vollständigen IL-6-Rezeptorkomplex exprimiert [50]. Abbildung 5 illustriert diesen Vorgang:

Abbildung 5: Generierung von sIL-6R durch Alternatives Spleißen und Shedding



Ursprüngliche Konzeption entnommen aus [08] [47]

DS-sIL-6R scheint im Plasma physiologischer Weise gegenüber PC-sIL-6R zu dominieren [52]. Darüber hinaus scheint auch der potenzielle natürliche Inhibitor des IL-6-Transsignalling sgp130 hauptsächlich durch alternatives Spleißen generiert zu werden [53]. Ein entscheidender Unterschied des alternativen Spleißens im Vergleich zum Shedding insbesondere im Hinblick auf die experimentelle Analyse besteht in der Kinetik der Freisetzung von sIL-6R. Während das alternative Spleißen eines Zeitraums von mehreren Stunden nach Einsetzen des induktiven Stimulus bis zum quantitativen Nachweis des dadurch freigesetzten sIL-6R bedarf, geschieht dies beim Ektodomänen-Shedding binnen weniger Minuten. Unter experimentellen Bedingungen kann somit durch entsprechend kurz gewählte Stimulationszeiten ein signifikanter Beitrag des alternativen Spleißens zur Generierung des sIL-6R weitgehend ausgeschlossen werden.

1. 5. 1. Mechanismus des Ektodomänen-Shedding

Das Prinzip des Ektodomänen-Shedding ist nicht spezifisch für Zytokinrezeptoren wie der IL-6R, sondern betrifft vielmehr ein breites Spektrum sowohl strukturell als auch funktionell unterschiedlicher Moleküle. Dazu gehören neben den Zytokinrezeptoren auch Zytokinvorläufer, Leukozytenadhäsionsmoleküle (z. B. L-Selektin), membrangebundene Wachstumsfaktoren und Ektoenzyme wie das ACE (Angiotensin Converting Enzyme). Angesichts dieses breiten Spektrums an Shedding-sensiblen Molekülen erscheint ein allgemein zugrunde liegender Mechanismus als „kleinster gemeinsamer Nenner“ für das Shedding eher unwahrscheinlich. Allerdings wurden für einige dieser Moleküle bereits wichtige Aspekte bezüglich des Shedding-Mechanismus geklärt.

1. 5. 1. 1. Shedding des sIL-6R durch Metalloproteasen

Die Generierung von sIL-6R durch Ektodomänen-Shedding setzt eine Expression des vollständigen IL-6-Rezeptorkomplex voraus und ist somit *in vivo* neben den Hepatozyten als ortsständige Zellen auf die Leukozytensubpopulationen der Monozyten bzw. differenzierten Makrophagen, neutrophilen Graulozyten sowie B- und T-Lymphozyten

beschränkt. Die Freisetzung von sIL-6R durch Shedding basiert auf der proteolytischen Abspaltung der Rezeptor-Ektodomäne von der Zellmembran. Dies wurde physiologischerweise insbesondere für die Gruppe der Metalloproteasen gezeigt, die im Rahmen der akuten oder chronischen Inflammation eine wesentliche Rolle spielen [54] [55]. Zudem können auch bakterielle Proteasen als exogene Faktoren die proteolytische Freisetzung von sIL-6R bewirken [56] [57]. Das Protease-abhängige Shedding kann zum einen spontan, d. h ohne Einwirkung eines Aktivators stattfinden, zum anderen aber auch durch einen Stimulus induziert werden. Diese Induktionsfähigkeit deutet darauf hin, daß es sich beim Protease-abhängigen Shedding um einen regulierten Prozess handelt. Im Hinblick auf den Mechanismus des Protease-abhängigen sIL-6R-Shedding scheint der Aktivierung der Proteinkinase C eine zentrale Funktion zuzukommen, wie die verstärkte Freisetzung von sIL-6R nach Stimulation mit PMA (Phorbol-Myristat-Azetat) zeigte [58]. In der Folge konnte zudem mit Hilfe von Mutationsanalysen nachgewiesen werden, daß die proteolytische Abspaltung in unmittelbarer Nachbarschaft der Zellmembran stattfindet [59], während aber das durch bakterielle Proteasen exogen induzierte Shedding in einer anderen Region der Ektodomäne stattfindet [56]. Diese Befunde implizieren in Zusammenschau mit der Inhibition des sIL-6R-Shedding in Gegenwart von Metalloproteinaseinhibitoren wie TAPI (TNF α Protease Inhibitor) [55] die potenzielle Existenz einer membransständigen Metalloprotease ("Sheddase"), die für das Shedding verantwortlich zeichnet. Einen Hinweis zur Identifizierung dieser Sheddase ergab eine in vitro-Analyse mit humanen Blutmonozyten sowie THP-1 und Hep3B-Zellen, in der nachgewiesen werden konnte, daß die Zink-abhängigen Metalloproteasen der ADAM-Familie (*a disintegrin and metalloproteinase domain*) ADAM 10 und ADAM 17 (syn. TACE: TNF α converting enzyme) das Shedding von sIL-6R im Rahmen einer zellulären Cholesterol-Depletion vermitteln [60]. Allerdings zeigte sich dieses ADAM-vermittelte Shedding unabhängig von einer Aktivierung der Proteinkinase C, so daß möglicherweise unterschiedliche Proteasesysteme involviert sind.

1. 5. 1. 2. Shedding von gp130

Prinzipiell kann die lösliche Form von gp130 ebenfalls durch limitierte Proteolyse der Ektodomäne im Sinne eines Shedding von der Zelloberfläche generiert werden, wie eine in vitro-Untersuchung an mit humanisiertem IL-6R transfizierten MDCK-Zellen (*Madine-*

Darby Canine Kidney) [53]. Dieses Shedding von sgp130 wird allerdings nicht durch PMA induziert, so daß ein Mechanismus zugrunde zu liegen scheint, der unabhängig von einer Aktivierung der Proteinkinase C ist [53]. Das mittels Immunopräzipitation nachweisbare Ausmaß der Freisetzung von sgp130 durch Shedding war aber im direkten Vergleich mit sIL-6R vernachlässigbar gering [53]. Deshalb wurde davon ausgegangen, daß das im Plasma vorhandene sgp130 möglicherweise in erster Linie ein Produkt von alternativem Spleißen darstellt.

Um die minimalen Erfordernisse für das Shedding im juxtamembranären Bereich der Ektodomäne weiter zu klären, generierte eine weitere Arbeitsgruppe chimäre gp130-Moleküle, indem sie Peptidsequenzen in unmittelbarer Nachbarschaft zur Zellmembran gegen Sequenzen aus einer der bekannten Abspaltungsregionen u. a. des IL-6R austauschten [61]. Transfizierte COS-Zellen exprimierten diese chimären gp130-Moleküle, die weiterhin zur Signaltransduktion fähig waren, wie die Aktivierung von STAT3 bei diesen Zellen zeigte. Im Gegensatz zum Wildtyp gp130, das kein Ektodomänen-Shedding nach PMA-Stimulation zeigt, unterlagen diese rekombinanten Proteine jedoch dem PMA-induzierten Shedding. Darüber hinaus konnte derselbe Effekt auch durch den Austausch mit korrespondierenden Sequenzen im LIF-R erzielt werden. Durch eine einzelne Punktmutation wurde dagegen keine Fähigkeit zum Shedding erworben. Diese Ergebnisse scheinen darauf hinzuweisen, daß nicht bestimmte Homologien in der Aminosäuresequenz, sondern Änderungen in der strukturellen Integrität die Fähigkeit zum Shedding auf gp130 übertragen, d.h. durch Veränderungen in der dreidimensionalen Struktur erlangen die Sheddasen erst Zugang zu den Peptidsequenzen, in denen die Abspaltung stattfindet.

Alle bisherigen Analysen zum Shedding von sgp130 waren allerdings auf transfizierte Zellreihen beschränkt. Eine Untersuchung mit Zellen, die *in vivo* den IL-6-Rezeptorkomplex exprimieren wie etwa mononukleäre Phagozyten steht jedoch noch aus.

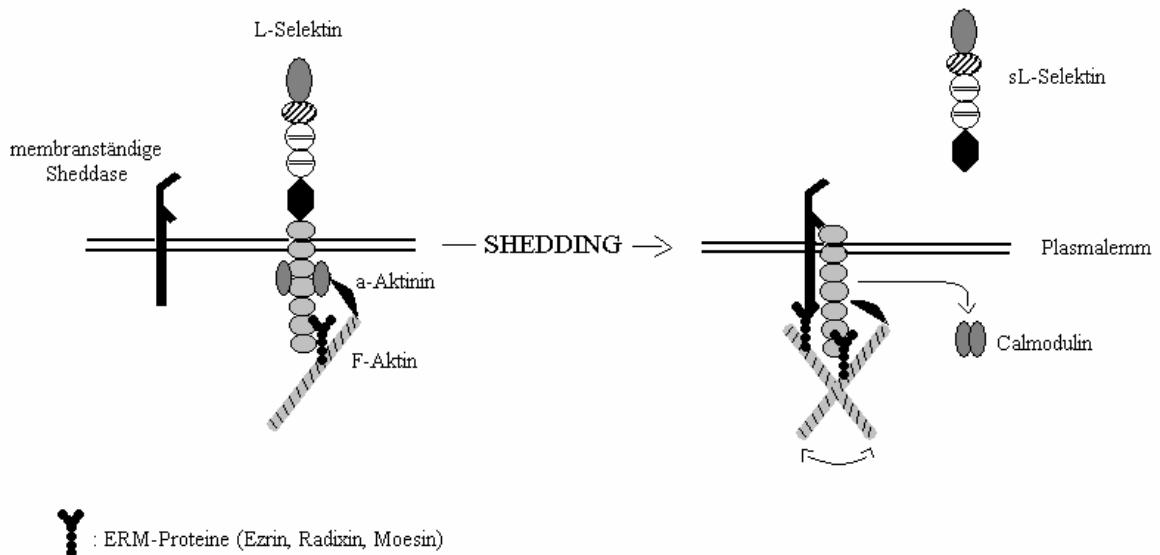
1. 5. 1. 3. Shedding von sL-Selektin

Lösliche Formen von transmembranären Glykoproteinen finden sich nicht nur bei Zytokin-Rezeptoren, wie das Beispiel des Leukozytenadhäsionmoleküls L-Selektin zeigt: L-

Selektin (CD62L) dient als sogenannter „Homing-Rezeptor“ auf der Oberfläche von mononukleären Phagozyten, Granulozyten und Lymphozyten für die Migration dieser Zellen ins entzündlich veränderte Gewebe durch Interaktion mit spezifischen Liganden auf Endothelzellen. Analog zum sIL-6R existieren lösliche Formen des L-Selektin (sL-Selektin), die über eine agonistische intrinsische Aktivität verfügen [62]. Im Gegensatz zum Transsignalling des sIL-6R besteht aber ein qualitativer Unterschied, da sL-Selektin zur Entfaltung dieser Aktivität keiner Komplexbildung mit dem spezifischen Liganden bedarf.

L-Selektin ist bezüglich des Shedding das am besten untersuchte transmembranäre Glykoprotein: Nach der Aktivierung der Leukozyten wird L-Selektin mit einer sehr schnellen Kinetik spontan durch Shedding von der Oberfläche abgespalten. Diese rasche Kinetik des spontanen sL-Selektin-Shedding ist mit dem raschen Protease-vermitteltem Shedding von sIL-6R vergleichbar.. Das Shedding erfolgt in einem definierten juxtamembranären Bereich der Ektodomäne von L-Selektin [63]. Neben diesem spontanen Shedding können auch Phorbolester wie PMA [64], chemotaktische Faktoren wie FMLP [65] oder bakterielle Superantigene wie Streptolysin O [66] ein L-Selektin-Shedding bewirken. Des Weiteren scheint die Abspaltung von unspezifischen Umgebungsfaktoren wie beispielsweise osmotischem Stress abzuhängen. So führt *in vitro* bei neutrophilen Granulozyten ein hypotoner Milieu [67] ebenso zum Shedding, wie ein hypertoner [68]. Die verschiedenen Stimuli bewirken das L-Selektin-Shedding durch Induktion unterschiedlicher Signal-Transduktionswege. So aktiviert PMA die Protein Kinase C, während das Streptolysin O-induzierte Shedding auf Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase beruht. Zudem gibt es Hinweise auf einen weiteren Protein Kinase C-unabhängigen Mechanismus des L-Selektin Shedding der aus der Aktivierung von Tyrosin-Kinasen resultiert [69]. Sowohl das PMA als auch das FMLP-vermittelte Shedding von L-Selektin bei neutrophilen Granulozyten wird in Gegenwart von Hydroxamat-basierten Metalloprotease-Inhibitoren wie TAPI gehemmt [70] [71]. Dies weist analog dem IL-6R auf eine Metalloprotease als verantwortliche Sheddase hin. In Abbildung 6 sind die bisher bekannten Aspekte zum Mechanismus des sL-Selektin-Shedding schematisch dargestellt.

Abbildung 6: Mechanismus des L-Selektin-Shedding



Ursprüngliche Konzeption entnommen aus [72]

Eine wesentliche Rolle bezüglich der Interaktion der Sheddase mit L-Selektin scheint hierbei intrazellulär Calmodulin zu übernehmen: Calmodulin ist in ruhenden Leukozyten konstitutiv mit der zytoplasmatischen Domäne von L-Selektin assoziiert. Nach Stimulation mit dem Phorbolester PMA dissoziert Calmodulin, wodurch es - vermittelt durch sog. ERM-Proteine (Ezrin, Radixin, Moesin) - zu einer Veränderung der strukturellen Konfiguration der extrazellulären Domäne von L-Selektin kommt. Dadurch wird potenziell die proteolytische Abspaltung von sL-Selektin ermöglicht. Scheinbar involviert dieser Mechanismus auch Elemente des Zytoskeletts wie α -Aktinin und F-Aktin. Diese interagieren mit der zytoplasmatischen Domäne von L-Selektin. ERM-Proteine können ein Cross-linking dieser Zytoskelettelemente bewirken, das der membranständigen Sheddase erst den räumlichen Zugang zur Abspaltungsregion gewährt [72]. Dieser Calmodulin-abhängige Mechanismus des Shedding von sL-Selektin stellt somit einen entscheidenden Unterschied zum PMA-induzierten Shedding des sIL-6R dar, das durch eine Aktivierung der Proteinkinase C vermittelt wird.

1. 5. 2. Akut-Phase Protein-induziertes Shedding

Physiologischerweise, d. h. ohne zusätzliche Stimulation findet sich sIL-6R im Plasma mit einer Konzentration von ca. 30 ng/ml. Bei bestimmten, insbesondere entzündlich-

proliferativen Krankheiten wie etwa der rheumatoïden Arthritis und Morbus Crohn als Autoimmunerkrankungen, dem Plasmozytom als Neoplasie des Immunsystems sowie AIDS als erworbene Störung der Immunantwort, ist diese Konzentration sowohl im Plasma (max. ca. 80 ng/ml), als auch im entzündlich veränderten Gewebe signifikant erhöht [73 - 76]. Dies läßt darauf schließen, daß ein möglicher endogener inflammatorischer Stimulus eine Induktion des sIL-6R-Shedding bewirkt. Diese Induktion ist möglicherweise Ausdruck einer Regulation des Sheddingprozesses. Eine Identifizierung dieses endogenen Regulators steht allerdings noch aus. Eine *in vitro*-Analyse mit neutrophilen Granulozyten gab jedoch den Hinweis, daß es sich bei diesem endogenen Regulator potentiell um Akut-Phase Proteine wie das CRP handeln könnte [77]. Die prinzipielle Möglichkeit einer Induktion von Shedding durch CRP konnte auch schon für das Shedding-sensitive L-Selektin nachgewiesen werden [78]. Zudem konnte mittels *in situ*-Hybridisierung demonstriert werden, daß die IL-6-induzierte Expression von APP lokal mit einer verstärkten Sezernierung von sIL-6R assoziiert war [45]. Angesichts dieser spärlichen Datenlage stellt sich die bisher nicht diskutierte Frage nach einer möglichen reziproken Interaktion von APP mit dem IL-6-System durch reguliertes Shedding des sIL-6R.

1. 5. 2. 1. Die Pentraxin-Familie von APP

Die Pentraxine-Familie von APP umfasst eine Gruppe von evolutionär stark konservierten Akut-Phase Proteinen. Das Pentraxin C-reaktives Protein (CRP, syn. Pentraxin-1, PTX1) ist das klassische Akut-Phase Protein und findet routinemäßige Verwendung als laborchemischer Marker des akuten oder chronischen inflammatorischen Geschehens. Es wurde erstmals 1930 von W. S. Tillet und T. Francis beschrieben, die im Rahmen ihrer Untersuchungen am Avery Laboratory des Rockefeller Institute im Plasma an Pneumonie erkrankter Patienten ein neues Protein entdeckten, das mit dem C-Polysaccharid der Pneumokokken-Kapsel interagierte [79]. Es folgten zahlreiche weitere Arbeiten, die sich mit den Veränderungen im Plasma-Proteinmuster bei inflammatorischen Zuständen beschäftigten, und in diesem Zusammenhang wurde schließlich der Begriff der „Akut-Phase Reaktion“ geprägt.

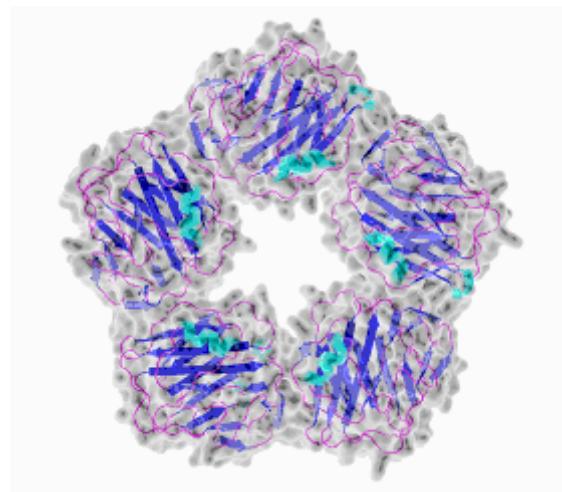
Im Rahmen akut-entzündlicher Prozesse wie der Sepsis kann die plasmatische CRP-Konzentration binnen weniger Stunden auf bis zu 500 µg/dl ansteigen (Normwert < 1

$\mu\text{g}/\text{dl}$) [02] [80]. Intermittierend oder kontinuierlich erhöhte CRP-Spiegel sind außerdem mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen assoziiert.

1. 5. 2. 1. 1. Struktur-Funktionsprinzip der Pentraxine am Beispiel des CRP

Charakteristisches architektonisches Merkmal der Pentraxine ist die pentamere Grundstruktur. Der Aufbau besteht aus fünf nicht-kovalent gebundenen identischen Polypeptidketten (Untereinheiten: UE), die eine planare pentagonale Quartärstruktur bilden. Abbildung 7 zeigt exemplarisch die dreidimensionale Struktur des CRP.

Abbildung 7: Kristall-Struktur von CRP



entnommen aus [81]

Jede der fünf identischen Monomere (Untereinheiten) des CRP ist 206 Aminosäuren lang und besitzt zwei Kalzium-Bindungsregionen. Die eine wird von den Aminosäureresten 134-148 und die andere von 152-176 gebildet. Allerdings hat die letztgenannte eine dreifach höhere Affinität zum Kalzium-Ion (Ca^{2+}). Die Fähigkeit zur Kalzium-Bindung ist eine wesentliche Voraussetzung für die CRP-vermittelte Clearance von exogenem oder endogenem Material durch Bindung von Phosphorylcholin (PC) [80] [81]: Dieses wird als Bestandteil bakterieller oder körpereigener Zellmembranen im Rahmen von Gewebsuntergängen unterschiedlicher Genese freigesetzt. Durch die Bindung dieser antigenen Strukturen wirkt CRP als Opsonin. PC wird in einer flachen taschenartigen Vertiefung jeder Untereinheit durch Interaktion der Phosphatgruppe mit den beiden Ca^{2+} -Ionen gebunden. Nach der Bindung von Phosphorylcholin kann dann das

Komplementsystem über den klassischen Weg aktiviert und somit die Clearance von Immunkomplexen eingeleitet werden. Die Aktivierung des Komplementsystems durch CRP kann aber auch durch die Komplementkomponente C1q erfolgen. C1q wird auf der gegenüberliegenden Seite der CRP-Monomere Kalzium-unabhängig gebunden.

Darüber hinaus induziert CRP in humanen Monozyten die Expression von proinflammatorischen Zytokinen [83]. Allerdings konnte bisher kein spezifischer Rezeptor und konsekutiv kein Signaltransduktionsweg identifiziert werden, der diese Funktion vermittelt. Einen Teil seiner Aktivität scheint CRP jedoch durch Interaktion mit dem Fc γ Rezeptor-IIa auszuüben [84]. Des Weiteren ist das CRP durch Hemmung der Chemotaxis [85] und Aktivierung von Superoxid-Generierung [86] eng mit der immunologischen Funktion von neutrophilen Granulozyten assoziiert.

1. 5. 2. 1. 2. Pentraxin-3: erstes primär extrahepatisches APP

Gemäß jüngeren Forschungsergebnissen lassen sich innerhalb der Pentraxinfamilie „kurze“ und „lange“ Pentraxine unterscheiden, wobei zu ersteren das CRP und das SAP (Serum-amyloid P-component) gezählt werden. 1992 wurden die sogenannten langen Pentraxine als neue Mitglieder der Pentraxinfamilie identifiziert. Wie der Name schon andeutet, zeichnen sich diese Proteine durch längere Aminosäuresequenzen (Primärstruktur) ihrer Untereinheiten im Vergleich zu den kurzen Pentraxinen aus. Als erstes langes Pentraxin wurde das PTX3 entdeckt [87] [88]. Die ersten 203 C-terminalen Aminosäuren (AS) dieses Proteins bilden eine Domäne, die komplett homolog zum CRP-Molekül ist, wohingegen die verbleibenden 178 N-terminalen AS einer jeden monomeren Untereinheit keine Homologien zu anderen bekannten Proteinstrukturen aufweisen. Daraus lässt sich folgern, daß das PTX3 eventuell einen evolutionären Prototyp der kurzen Pentraxine darstellt [87 - 90]. Die Pentraxinsequenzen haben sich im Verlauf der Evolution der Wirbeltiere als äußerst stabil gegenüber mutagenen Einflüssen erwiesen. Dies impliziert, daß die Expression von Pentraxinen bereits frühen Organismen einen so großen Überlebensvorteil verschaffte, daß gemäß den Gesetzen von Mutation und Selektion keine Notwendigkeit zu einer grundlegenden Veränderung im Sinne einer Verbesserung dieser Molekülstruktur bestand, was die zentrale – aber lange nicht vollständig geklärte Funktion der Pentraxine als Akut-Phase Proteine im Rahmen der unspezifischen Immunität unterstreicht. Man ging

bislang davon aus, daß die Expression von Pentraxinen entwicklungsgeschichtlich gesehen auf die Vertebraten beschränkt sei. Man nahm an, daß CRP und SAP das Resultat einer Genduplikation während der Wirbeltierevolution darstellten. Bei Untersuchungen an *Limulus polyphemus*, einer phylogenetisch sehr alten Krabbenart, die man als „lebendes Fossil“ ansehen kann, konnten jedoch beide Proteine nebeneinander nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass diese kurzen Pentraxine bereits in den gemeinsamen Vorfahren der Arthropoden und Chordaten nebeneinander existierten [91].

Trotz der ausgeprägten Konservierung der Pentraxin-Sequenzen existieren wesentliche Unterschiede zwischen dem CRP und dem PTX3. So wird PTX3 im Gegensatz zu den klassischen Pentraxinen nicht in der Leber sondern primär extrahepatatisch exprimiert. Zu den Zelltypen, für die bereits eine PTX3-Expression nachgewiesen werden konnte, gehören Endothelzellen [92], Fibroblasten [92] [93], Hepatozyten [92], vaskuläre glatte Muskelzellen [94] sowie Kasposi-Sarkom Zellen [95]. Bisher konnte als endogener Induktor der PTX3-Expression hauptsächlich IL-1 β [87 - 91], IL-4 und IFN γ scheinen einen modulierenden Einfluss auf die PTX3-Expression auszuüben [96] [97]. In funktioneller Hinsicht besteht mit der fehlenden Ca-Bindung ein wesentlicher Unterschied zum CRP. Die Aktivierung des Komplementsystems über C1q erfolgt jedoch analog [93]. Eine zentrale immunologische Funktion des PTX3 scheint die Bindung apoptotischer Zellen zu sein, die konsekutiv eine Clearance durch dendritische Zellen ermöglicht [98].

Angesichts der starken Strukturhomologie des CRP zu seinem evolutionsgeschichtlichem Vorläufer PTX3 stellt sich die Frage ob gleichzeitig eine korrespondierende „Funktionshomologie“ existiert, d. h. ob PTX3 ebenfalls die Fähigkeit zur Induktion des IL-6R-Shedding in sich birgt.

1. 5. 2. Serum-Amyloid A: APP mit spezifischem Rezeptor

Während der Akut-Phase Reaktion zeigt neben dem CRP das inflammatorische Apolipoprotein Serum-Amyloid A (SAA) einen in quantitativem Ausmaß (bis zum 1000fachen des Normwerts) und Kinetik vergleichbar dramatischen Anstieg der Plasmakonzentration [01]. Angesichts der darüber hinaus ausgeprägten evolutionären Konservierung der SAA-Sequenzen [99] impliziert dies eine zentrale physiologische

Funktion, die noch weitgehend ungeklärt ist. Gesichert ist allerdings die Tatsache, daß SAA während der Akut-Phase Reaktion das reguläre Apolipoprotein AI (Apo AI) im HDL-Partikel ersetzt (HDL: High density lipoprotein) [100] [101] [102] [103] [104]. Im Gegensatz zu den Pentraxinen wird unter dem Begriff „SAA“ eine Gruppe kleiner Proteine subsumiert, von denen beim Menschen bisher vier verschiedene identifiziert werden konnten (SAA 1, 2, 3, und 4) [105]. Von diesen werden vor allem SAA 1 und 2 während inflammatorischer Prozesse exprimiert. Die SAA-Subtypen sind unterschiedliche Transkriptionsprodukte eines Genclusters auf Chromosom 11 (11p15) [106]. Ihre Primärstrukturen variieren in der Länge zwischen 104 und 112 Aminosäuren. Die Expression von APP findet wie die des CRP hauptsächlich in der Leber statt, ist aber nicht auf diese beschränkt und kann u. a. auch in Zellen des mononukleären Phagozyten-Systems stattfinden [107]. Die Induktion der Genexpression erfolgt durch IL-6, IL-1 und TNF α [108] [109]. Bezuglich der dreidimensionalen Struktur des fertigen Proteins ergaben sich Hinweise, daß SAA eine hexamere Ringstruktur mit zentralem Kanal bildet [110].

Ein zentraler Aspekt der immunmodulatorischen Funktion des SAA ist Fähigkeit, bei Neutrophilen Granulozyten die Expression von IL-8, IL-1 β und TNF α zu induzieren [111], wobei für die Expression des IL-8 der verantwortliche Signaltransduktionsmechanismus geklärt werden konnte [112]: SAA bindet s an den 7-Transmembrandomänen-Rezeptor FPRL-1 (Formyl Peptide Receptor-Like 1, synonym Lipoxin A4-Rezeptor). Konsekutiv kommt es zu einer Aktivierung der Proteinkinase C und intrazellulären Mobilisierung von Kalzium. Diese Signalkaskade spielt gleichzeitig eine wesentliche Rolle bei der Generierung des sIL-6R durch Shedding. FPRL-1 wird von Monozyten, Neutrophilen Granulozyten und Hepatozyten exprimiert [113]

SAA wirkt chemotaktisch auf Monozyten. Auch dieser Effekt wird durch eine Aktivierung der Proteinkinase C und intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Mobilisation vermittelt [114]. Interessanter Weise bindet der bakterielle chemotaktische Faktor FMLP ebenfalls an FPRL-1 und führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase C und Mobilisation von Ca $^{2+}$. Weitere Experimente dieser Arbeitsgruppen zur Ligandenbindung konnten in diesem Zusammenhang zeigen, daß SAA neben Monozyten und Neutrophilen auch spezifisch an transgene embryonale Nierenzellen bindet, die FPRL-1 exprimierten, und konsekutiv eine stärkere agonistische Aktivität entfaltet, als FMLP [115]. SAA scheint somit der physiologische Ligand dieses Rezeptors zu sein. FMLP wiederum kann als exogener

Faktor bei neutrophilen Granulozyten ein Shedding des IL-6R induzieren [116]. SAA stellt demnach als physiologischer Ligand des Rezeptors für FMLP einen potenziellen Kandidaten als endogener Aktivator des IL-6R-Shedding dar.

2. FRAGESTELLUNG

Das pleiotrope Zytokin IL-6 ist der Hauptinduktor der Expression von Akut-Phase Proteinen. Dabei ist im Hinblick auf die Regulation insbesondere auch der extrahepatischen Akut-Phase Reaktion ein zentraler Aspekt noch weitgehend unberücksichtigt geblieben, nämlich dahingehend, ob eine reziproke Interaktion der Akut-Phase Proteine mit dem IL-6-System im Sinne einer Feedback-Regulation existiert. Eine besondere Eigenschaft des IL-6-Systems ist die agonistische Aktivität des sIL-6R. Dadurch erhält das IL-6-Signal eine potenziell systemische Responsivität. Ein Mechanismus der Generierung von funktionellem sIL-6R ist das Shedding, d. h. die proteolytische Abspaltung der Rezeptor-Ektodomäne von der Zelloberfläche. Obwohl schon zahlreiche exogene Mediatoren des Shedding nachgewiesen worden sind, steht eine Identifizierung des endogenen und damit physiologischen Stimulus noch aus. Bisher gibt lediglich eine einzige Untersuchung mit polymorphkernigen Granulozyten einen Hinweis darauf, daß es sich hierbei um Akut-Phase Proteine handeln könnte. Daher erscheint eine vergleichende Analyse von Pentraxinen und dem lipid-artigen SAA bezüglich der Fähigkeit zur Induktion eines Shedding des sIL-6R als möglicher Weg einer reziproken Interaktion mit dem IL-6-System sinnvoll.

Vor diesem Hintergrund geht die vorliegende Arbeit den nachfolgend aufgeführten und bisher nicht untersuchten Fragen nach:

1. Neben neutrophilen Granulozyten treten vor allem auch bei chronischen Entzündungen Monozyten und Makrophagen als IL-6 exprimierende inflammatorische Zellen auf. Deshalb stellt sich die Frage, ob CRP ein Shedding des IL-6R bei diesen Zelltypen induzieren kann.
2. Mit PTX3 ein evolutionärer Vorläufer der Pentraxine und prototypisches extrahepatisches Akut-Phase Protein identifiziert. In Analogie zur Strukturhomologie zum CRP ergibt sich daher die Frage nach einer „Funktionshomologie“ im Sinne der Fähigkeit zur Induktion des IL-6R-Shedding bei Monozyten bzw. Makrophagen. Zur Prüfung einer möglichen Pentraxin-Spezifität des Shedding-Prinzips wird vergleichend das inflammatorische Apolipoprotein SAA untersucht.

3. Zu den bisher bekannten Mechanismen der Generierung von sIL-6R gehören das differentielle Spleißen der IL-6R-mRNA und das Shedding durch membranständige Proteasen. Bei letzterem spielen insbesondere Metalloproteasen eine entscheidende Rolle. Zur funktionellen Klärung des, einem möglichen APP-induziertem Shedding zugrunde liegenden Mechanismus, wird deshalb untersucht, ob dieses in Gegenwart eines Metalloprotease-Inhibitors wirksam gehemmt wird.
4. Die Fähigkeit zum Shedding ist nicht auf die Zytokinrezeptoren beschränkt, sondern betrifft auch andere Klassen von Oberflächenrezeptoren. Für das Leukozytenadhäsionsmolekül L-Selektin ist die Generierung löslicher Formen mit intrinsischer Aktivität durch Shedding bereits gut untersucht. Deshalb wird zur Analyse einer möglichen Rezeptor-Spezifität des APP-induzierten Shedding ein Vergleich mit L-Selektin angestellt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3. 1. Material

3. 1. 1. Zellkulturmedien

Isolierte humane Monozyten wurden in Dulbecco`s MEM 1x (modified eagles medium, DMEM) kultiviert (Biochrom, Berlin, Deutschland). Die Kultur Monozyten-abgeleiteter Makrophagen erfolgte mit Makrophagen SFM-Medium 1x (mit Glutamin, ohne antibiotische Zusätze) (GIBCO InVitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

3. 1. 2. Kulturplatten

Für die Differenzierung und Kultur von Monozyten-abgeleiteten Makrophagen wurden sterile Polystyren-Kulturplatten mit spezial beschichteten Oberflächen verwendet, die mittels Adhäsion der Monozyten die Differenzierung zu Makrophagen unterstützten (Sarstedt Incorporated., Newton, USA). Um dagegen für die Experimente mit Monozyten eine weitere Differenzierung zu vermeiden, wurden diese in analogen Kulturplatten mit hydrophober Oberflächenbeschichtung kultiviert, so daß eine Adhäsion nicht möglich war (Corning Life Sciences, New York, USA).

3. 1. 3. Stimuli

- **Rekombinantes humanes M-CSF** (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

Quelle: *Escherichia coli* (durch Expression einer cDNA-Sequenz, die für die ersten 158 Aminosäuren der extrazellulären Domäne von reifem humanen M-CSF codiert)

Molekulargewicht: rekombinantes Monomer ca. 18 kDa

Reinheit: 97 %

Präparation: in PBS-Puffer

Verwendete Ausgangskonzentration zur weiteren Verdünnung:
0,468 mg/ml

- **C-reaktives Protein (CRP)** (SIGMA-Aldrich Incorporated, Saint Louis, USA)

Quelle: humanes Plasma

Molekulargewicht: ca. 118 kDa

Präparation: vorbereitet als Lösung in 20 mM Tris-Puffer bei pH 8 mit 280 mM NaCl, Rekonstitution in 20 mM Tris-Puffer

- **Rekombinantes humanes Apo-SAA** (Tebu-Bio, Offenburg, Deutschland)

Quelle: *Escherichia coli*

Molekülgröße: Polypeptid mit 104 Aminosäuren

Präparation: vorbereitet als steril filtrierte Lösung in 10 mM Tris-Puffer bei pH 9, Rekonstitution in steril-filtriertem H₂O

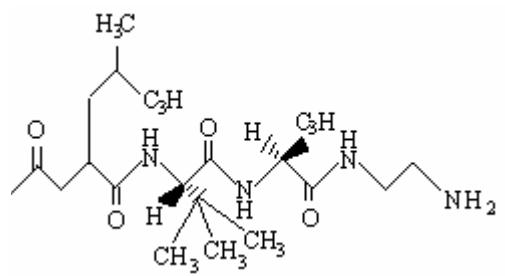
- **PTX3F** (BACHEM, Weil am Rhein, Deutschland)

Fragmente des PTX3, die zu den Aminosäureresten 175 -205 der vollständigen Polypeptidkette eines PTX3-Monomers korrespondieren. Die Peptide wurden durch Alignment mit den entsprechenden homologen Regionen von CRP ausgewählt und über Peptidsynthese als Reinsubstanz hergestellt.

- **TAPI-2** (N-(R)-[2-(Hydroxyaminocarbonyl)methyl]-4-methylpentanoyl-L-t-butyl-alanyl-alanin, 2-Aminoethylamid (TNFα Protease Inhibitor-2) (CALBIOCHEM, Merk, Darmstadt, Deutschland)

Molekulargewicht: 415,5 Da

Strukturformel:



Reinheit: > 98 %

Präparation: Lösen in Ethanol (5 mg/ml) oder steril-filtriertem H₂O (5mg/ml)

3. 1. 4. Lösungsmittel

- Ethanol 97 % für TAPI-2
- H₂O steril-filtriert für SAA
- DMSO (Dimethylsulfoxid) für PTX3F
- Tris-Puffer 20 mM pH 8 für CRP

3. 1. 5. Quantifizierung von sIL-6R, sgp130 und sL-Selektin

Zum quantitativen Nachweis von humanem löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6R), löslichem gp130 (sgp130) und löslichem L-Selektin (sL-Selektin, CD62L) wurden Enzym-Immunoassays mit rekombinanten Antikörpern verwendet (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

- Mikrotiterplatte beschichtet mit monoklonalem Antikörper der Maus gegen sIL-6R, sgp130 und sL-Selektin (CD62L)
- Konjugat (polyklonaler Antikörper der Maus gegen sIL-6R, sgp 130, oder sL-Selektin) konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase
- Standard rekombinantes humanes sIL-6R, sgp 130 und sL-Selektin
- Verdünnungspuffer
- Kalibrator-Verdünnungslösung
- Waschpufferkonzentrat
- Farbreagenz A: 12,5 ml Hydrogen-Peroxid
- Farbreagenz B: 12,5 ml Tetramethylbenzidin

- Stopp-Lösung: 6 ml 2N Schwefelsäure

3. 1. 6. Material für die Elutriation humaner Monozyten

- BSA: steriles Rinderalbumin 5 % (Bovine serum albumin)
- 3 x 5 ml Penicillin/Streptomycin und 1 x 4 ml Glukose 40 %
(aliquotiert in 15 Falcon tubes, Lagerung bei – 20 °C)
- 3 x 500 ml steriles PBS (Phosphat-buffered saline) (GIBCO)
- steriles Aqua destillata (Braun, Melsungen AG, Deutschland)
- NaCl 0,9 % (Braun)
- Propanol-2 70 % (Braun)
- Zellsieb
- Falcon tubes 15 ml, 50 ml (Falcon, Becton Dickinson)

3. 1. 7. Einwegartikel

- Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- 5 ml-, 10 ml-Einwegpipetten
- Falcon tubes 15 ml, 50 ml (Falcon, Becton Dickinson)
- Eppendorf-Cups 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

3. 2. Methoden

3. 2. 1. Methodischer Ansatz

Zum Nachweis eines durch Akut-Phase Proteine vermittelten Shedding wurden mittels Elutriation aus dem peripheren Blut gesunder Spender gereinigte Monozyten bzw. *in vitro* differenzierte Monozyten-abgeleitete Makrophagen mit unterschiedlichen Konzentrationen von CRP, PTX3-Fragmenten (PTX3F) und SAA stimuliert. Zur Kontrolle wurde jeweils die gleiche Anzahl Monozyten und Makrophagen derselben Spender mit DMEM ohne Zusätze für die gleiche Zeit inkubiert. Die gewählten Konzentrationen der Stimuli reichten dabei mit 0,1 bis 50 mg/l von physiologischen Konzentrationen bis hin zu Konzentrationsbereichen, die den Status einer akuten Inflammation repräsentieren.

Neben der Dosis-Wirkungsbeziehung wurden Kinetiken der Freisetzung der löslichen Rezeptoren durch variierende Inkubationszeiten untersucht. Nach entsprechender Stimulation der Monozyten und Makrophagen mit den Akut-Phase Proteinen oder deren Fragmenten wurde sIL-6R, sgp130 und sL-Selektin mittels spezifischer Immunoassays in den Überständen quantifiziert. Es wurden nur Stimulationszeiten von 15 Minuten bis maximal 4 Stunden untersucht, um selektiv das Shedding und keine De novo-Expression der Zytokine zu erfassen.

3. 2. 2. Spenderauswahl-Kriterien

Es wurden peripher-venöse Blutproben von freiwilligen gesunden Spendern im Alter von 23 – 35 Jahren gewonnen (n = 12, davon 5 weiblich und 7 männlich). Durch laborchemische und körperliche Untersuchung vor der Blutabnahme wurde bei den Spendern ein akut- oder chronisch-entzündlicher Krankheitszustand ausgeschlossen. Es durften keine Leukozytose, keine Erhöhung der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), keine erhöhten CRP-Spiegel und keine inflammatorischen Symptome wie Fieber, Husten, Schnupfen, Halsschmerzen, lokale Rötung, Schwellung und Überwärmung bzw. Verletzung vorliegen.

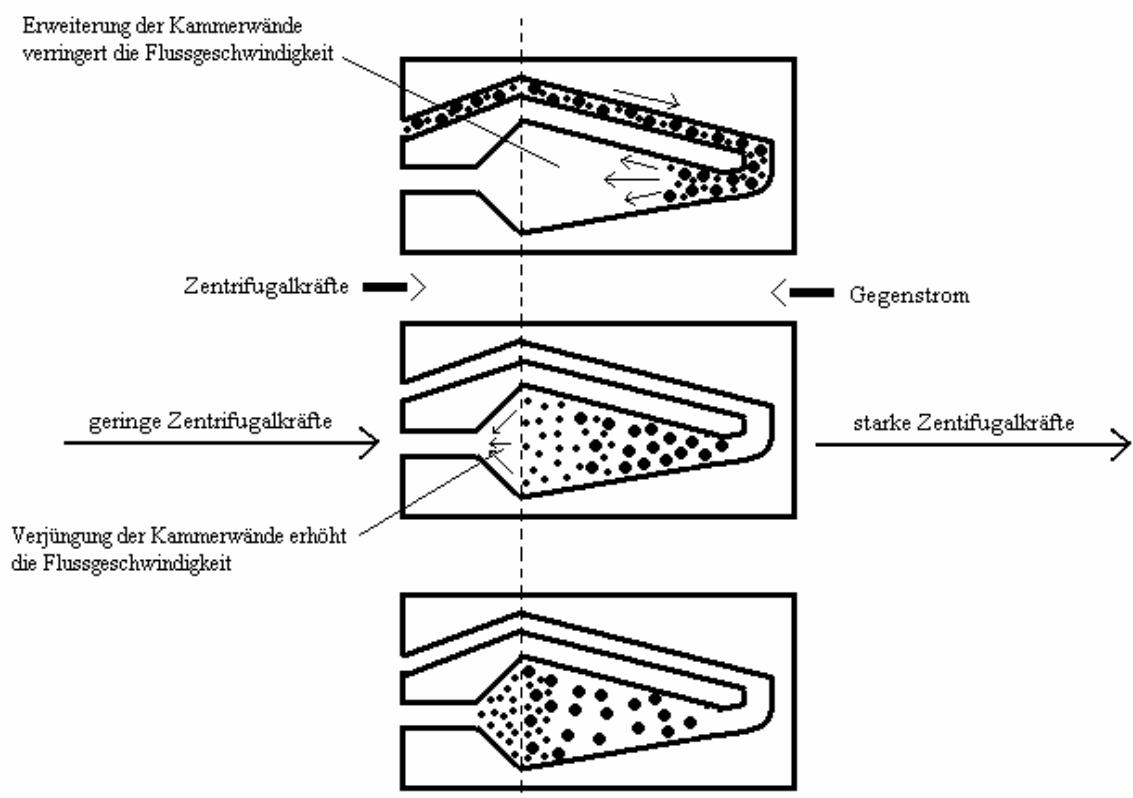
3. 2. 3. Isolierung humaner Monozyten

Die Monozyten wurden mittels Leukapherese von gesunden freiwilligen Spenderinnen/Spendern gewonnen. Die Separierung der Monozyten von den übrigen Leukozytenfraktionen erfolgte durch Elutriation. Dabei handelt es sich um eine Aufreinigung nach Partikel- respektive Zellgröße durch Zentrifugation im Gegenstromprinzip: Der Elutriationsrotor wird mit der Zellsuspension beschickt und die Elutriationskammer wird während der Zentrifugation kontinuierlich mit einer bestimmten Flussrate von Medium durchströmt. Diese Flußrate bestimmt die radiale Gleichgewichtsposition jeder Zelle entsprechend ihrer Größe. Vergrößert man die Flußrate, so werde die kleinsten Zellen an der sogenannten “elutriation boundery“ in Richtung des Kammerausgangs beschleunigt und können in Fraktionen abgenommen werden. Durch schrittweise Steigerung der Flußrate kann so die gesamte ursprüngliche Zellpopulation des Leukaphereseparats in Einzelfraktionen nach Zellgröße sortiert werden. Man erhält auf

diese Weise Monozytenfraktionen mit einer Reinheit > 90 %. Vorteil dieser Methode ist, daß die Monozyten nur wenig voraktiviert werden.

Abbildung 8 zeigt schematisch die Vorgänge in der Elutriationskammer.

Abbildung 8:



Für den eigentlichen Elutriationsvorgang mit dem Beckmann JE-6B Elutriation-Systems mußte das von der Transfusionsmedizin bereitgestellte Leukapheresepräparat zunächst gut durchmischt werden, bevor es mit Hilfe eines Zellsiebs zu jeweils 25 ml auf 50 ml Falcon tubes verteilt wurde. Daraus wurden dann 100 bzw. 200 µl Präparat für die 1:5- und 1:10-Verdünnung entnommen und in die vorbereiteten Cups pipettiert, um die Monozytenkonzentration durchflusszytometrisch am ADVIA 120 (Bayer) zu bestimmen und die voraussichtliche Zellausbeute zu berechnen. Mittels Durchflusszytometrie (Facs) werden die Oberflächeneigenschaften von Zellen durch ein spezifisches Floureszenzsignal nachgewiesen: Monoklonale Antikörper mit einer fluoreszierenden Gruppe markieren bestimmte Oberflächenmerkmale (zum Nachweise von Monozyten oder Makrophagen CD14 bzw. CD45). Beim Auftreffen monochromatischen Lichtes werden Elektronen des

Farbstoffes auf ein höheres Energieniveau angehoben. Bei der Rückkehr auf das ursprüngliche Niveau werden proportional zur Zahl der Oberflächenmoleküle Photonen emittiert, die gemessen werden. Zusätzlich geben Streulichteigenschaften Auskunft über den Zelltyp (Vorwärtsstreulicht: Auskunft über Zellgröße, Seitwärtsstreulicht: Auskunft über Granularität des Zellinhalts zur Unterscheidung Monozyt, Granulozyt, Lymphozyt)

Das in den Falcon tubes vorgelegte Präparat wurde mit je 25 ml Laufpuffer (PBS mit 1mg/ml Glukose, 3,33 mg/ml Rinderalbumin und antibiotischem Zusatz von Penicillin G 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml) versetzt. Es wurden jeweils gleiche Volumina an Präparat und Laufpuffer eingesetzt. Vor dem Starten der Zentrifuge mit der Einstellung 2040 U/min, 15 h, 23 °C wurde das System mit 200 ml Laufpuffer Luftblasen-frei gefüllt und im Anschluß daran mit dem Inhalt der Falcon tubes (Präparat + Laufpuffer) beschickt. Danach ließ man den Laufpuffer erneut durch das System ansaugen und konnte das entstandene Elutriat in den vorbereiteten 50 ml Falcon tubes auffangen. Zur Facsanalyse, die die Einstellung der Pumpe bestimmt, wurden jeweils 500 µl des Elutriats in die entsprechenden Facsröhrchen pipettiert. Durch Erhöhung der Laufpufferfördermenge bei gleichbleibender Zentrifugen-Umdrehungszahl wurden der Reihe nach Thrombozyten, Erythrozyten, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten aus dem Präparat elutriert. Der Elutriationslauf wurde beendet, wenn die Facs-Messung weniger als ein Prozent Granulozyten oder mehr als neunzig Prozent ergab. Dann wurde die Monozyten-Suspension in den Falcon tubes bei 1200 U/min für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand anschließend unter sterilen Bedingungen abgenommen und das Pellet mit je 5 ml SFM-Medium resuspendiert. Nach dem Poolen der Monozyten-Suspension in einem neuen Falcon tube wird erneut eine 1:5 und 1:10-Verdünnung am Facs analysiert. Aus der erhaltenen Leukozytenkonzentration wurde abschließend der Absolutwert der Monozyten im Elutriat berechnet

Beispiel:

$$2,5 \times 10^3/\mu\text{l} \times 5 \text{ (Verdünnung 1:5)} = 12,5 \times 10^6/\text{ml} \text{ (Konzentration in ml)} \times 30 \text{ (6 Fraktionen à 5 ml)} = 375 \times 10^6 \text{ Monozyten gesamt}$$

3. 2. 4. Analyse des Akut-Phase Protein-induzierten Shedding von sIL-6R

Zur Analyse der Generierung des löslichen IL-6-Rezeptors, gp130 sowie L-Selektin wurden sowohl humane Monozyten als auch Makrophagen mit den Akut-Phase Proteinen CRP, SAA und dem Pentraxinfragment PTX3F aktiviert. Dabei wurde angestrebt, möglichst von den gleichen gesunden Spendern Monozyten als auch von diesen abgeleitete differenzierte Makrophagen zu untersuchen, sofern die Zellausbeute dies zuließ.

3. 2. 4. 1. Stimulation von undifferenzierten Monozyten mit APP

Um eine weitere Aktivierung der Monozyten zu vermeiden, wurden unmittelbar nach der Elutriation jeweils 2×10^6 Monozyten pro well in 500 µl DMEM ohne Zusätze auf den nicht-adhärenten Kulturplatten (Corning Inc.) resuspendiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. DMEM mußte zuvor im Wasserbad bei 37 °C für ca. 20 Minuten erwärmt werden. Zur Stimulation der Monozyten wurden unter sterilen Bedingungen Stammlösungen von CRP, PTX3F und SAA durch Rekonstitution in Tris-Puffer 20 mM pH 8 (CRP), DMSO (PTX3F) und steril filtriertem H₂O (SAA) hergestellt. Die Konzentrationen der Stammlösungen betrugen jeweils 1 mg/ml für CRP und SAA und 50 mg/ml für PTX3F. Kurz vor Durchführung der Stimulationsexperimente wurden diese Lösungen bis zu den benötigten Endkonzentrationen in DMEM ohne Zusätze weiter verdünnt. Anschließend wurden die 2×10^6 Monozyten pro well nach einer lichtmikroskopischen Kontrolle und vorsichtigem Absaugen der DMEM-Überstände mit jeweils 2 ml zu den im Schema (siehe Tabelle 2) angegebenen Akut-Phase Protein-Konzentrationen für die entsprechenden Inkubationszeiten bei 37 °C / 5 % CO₂ stimuliert. Als Kontrolle wurden jeweils die gleiche Menge Monozyten derselben Spender mit 2 ml DMEM ohne Zusätze inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Überstände der wells abgenommen, in Eppendorf-Cups überführt und, um eine zellfreie Lösung zu erhalten 5 min bei 3000g zentrifugiert. Anschließend wurden die zellfreien Überstände aliquotiert und bis zur Quantifizierung der löslichen Rezeptoren bei - 80 °C asserviert. Die Pellets wurden verworfen.

3. 2. 4. 2. Stimulation von differenzierten Makrophagen

Zur Induktion der Differenzierung wurden die humanen Monozyten unmittelbar nach der Isolierung durch Elutriation in einer Konzentration von 2×10^6 pro ml über Adhäsion an spezielle Plastikoberflächen (Sarstedt Inc.) in Makrophagen SFM-Medium in Anwesenheit von Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (M-CSF) der Konzentration 0,01 µg/ml inkubiert. Das Medium wurde alle fünf Tage gewechselt und erneut mit 2 ml SFM-Medium pro well mit der gleichen Konzentration M-CSF bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach insgesamt sieben Tagen wurde die Differenzierung der Makrophagen lichtmikroskopisch anhand der typischen morphologischen Veränderungen mit langen Zellausläufern kontrolliert und gleichzeitig eine bakterielle Kontamination ausgeschlossen, bevor die differenzierten Makrophagen für die Experimente verwendet wurden.

Nach der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen wurde der Überstand der wells an SFM-Medium mit M-CSF vorsichtig abgesaugt und die Zellen nochmals mit 2 ml DMEM ohne Zusätze gewaschen. Analog den Monozyten-Experimenten wurden ausgehend von den CRP-, PTX3F- und SAA-Stammlösungen die benötigten Stimulusendkonzentrationen (siehe Tabelle 2) hergestellt und die differenzierten Makrophagen mit den entsprechenden Akut-Phase Protein-Konzentrationen bei 37 °C, 5 % CO₂ für die gewählte Inkubationszeit stimuliert. Zur Kontrolle wurden wiederum die gleiche Anzahl Makrophagen pro well mit DMEM ohne Zusätze inkubiert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Überstände der wells in Eppendorf-Cups überführt und bis zur ELISA-Messung bei - 80 °C analog den Monozyten asserviert. Da die Differenzierung der Makrophagen im Gegensatz zu den Monozyten durch Adhäsion an die Kulturplatten unterstützt wurde, befand sich in den Zellüberständen ein vergleichsweise geringer Anteil an gelösten Zellen bzw. Zelldebris. Deshalb wurde auf eine weitere Zentrifugation verzichtet.

Tabelle 1 zeigt das Stimulationsschema für Monozyten und Makrophagen.

Tabelle 1: Monozyten-/Makrophagen-Stimulationsschema *

Stimulus:	Stimuluskonzentration:	Stimulationszeit:
CRP	1 µg/ml	15 min
CRP	1 µg/ml	1h
CRP	1 µg/ml	4h
CRP	10 µg/ml	15 min
CRP	10 µg/ml	1h
CRP	50 µg/ml	15 min
CRP	50 µg/ml	1h
CRP	50 µg/ml	4h
SAA	1 µg/ml	15 min
SAA	1 µg/ml	1h
SAA	1 µg/ml	4h
SAA	10 µg/ml	15 min
SAA	10 µg/ml	1h
SAA	50 µg/ml	15 min
SAA	50 µg/ml	1h
SAA	50 µg/ml	4h
PTX3F	1 µg/ml	15 min
PTX3F	1 µg/ml	1h
PTX3F	1 µg/ml	4h
PTX3F	10 µg/ml	15 min
PTX3F	10 µg/ml	1h
PTX3F	50 µg/ml	15 min
PTX3F	50 µg/ml	1h
PTX3F	50 µg/ml	4h
Kontrolle	0	15 min
Kontrolle	0	1h
Kontrolle	0	4h

* Aufgrund varierender Monozytenzahlen konnte das Schema nicht bei allen Spendern vollständig umgesetzt werden.

3. 2. 4. 3. Funktionelle Charakterisierung des Shedding-Mechanismus

Zur funktionellen Untersuchung des Shedding-Mechanismus wurden die Stimulationsexperimente von Monozyten und Makrophagen zusätzlich in An- und Abwesenheit von TAPI-2 durchgeführt. Es handelt sich dabei um einen Hydroxamat-basierten Inhibitor von Matrix-Metalloproteasen und TACE (TNF α converting enzyme), der das Aktivierungs-induzierte Shedding von L-Selektin bei Neutrophilen, Eosinophilen und Lymphozyten inhibiert. Darüber hinaus hemmt er das PMA-induzierte Shedding des IL-6R. TAPI-2 wurde gemäß den Herstellerangaben in Ethanol 97 % zu 5mg/ml rekonstituiert. Ausgehend von dieser Stammlösung wurde der Proteaseinhibitor mit DMEM ohne

Zusätze, das zuvor im Wasserbad erwärmt worden war, bis zu einer Konzentration von 20 μM verdünnt. Es wurde dann zunächst eine 15 minütige Vorinhibition durchgeführt. Dabei wurde zu den in 500 μl DMEM resuspendierten Monozyten jeweils 500 μl TAPI-2 20 μM pipettiert, so dass sich insgesamt eine Konzentration von 10 μM ergab. Nach 15 Minuten wurden die Überstände der wells vorsichtig abgesaugt und pro well 1 ml der doppelten Stimulusendkonzentration (siehe Tabelle 2) und 1 ml TAPI-2 20 μM erneut hinzupipettiert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Überstände der wells in Eppendorf-Cups überführt, 5 min bei 3000g zentrifugiert, die Überstände wiederum in neue Cups pipettiert und die Proben bei - 80 °C asserviert. Analog wurde bei den Makrophagen am Tag 7 die Überstände abgenommen, mit 2 ml DMEM ohne Zusätze pro well gewaschen, und eine 15 minütige Vorstimulation mit TAPI-2 10 μM durchgeführt. Anschließend wurden die Überstände erneut abgesaugt und wieder gleichzeitig mit Akut-Phase Proteinen und TAPI-2 10 μM für die entsprechende Zeit stimuliert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände in Eppendorf-Cups überführt und bei - 80 °C bis zur ELISA-Messung asserviert. Als Kontrollen dienten bei den Inhibitionsexperimenten die mit DMEM und TAPI-2 10 μM für die gleiche Zeit inkubierten Monozyten bzw. Makrophagen derselben Spender.

Tabelle 2 zeigt schematisch die Stimuluskonzentrationen und Stimulationszeiten in Gegenwart von TAPI.

Tabelle 2: Schema Inhibitionsexperimente mit TAPI-2

Stimulus	Stimuluskonzentration	Inhibition	Stimulationszeit
CRP	50 µg/ml	+10 µM TAPI-2	15 min
CRP	50 µg/ml	+10 µM TAPI-2	1h
CRP	50 µg/ml	+10 µM TAPI-2	4h
CRP	1 µg/ml	+10 µM TAPI-2	1h
CRP	10 µg/ml	+10 µM TAPI-2	1h
SAA	50 µg/ml	+10 µM TAPI-2	15 min
SAA	50 µg/ml	+10 µM TAPI-2	1h
SAA	50 µg/ml	+10 µM TAPI-2	4h
SAA	1 µg/ml	+10 µM TAPI-2	1h
SAA	10 µg/ml	+10 µM TAPI-2	1h
PTX3F	50 µg/ml	+10 µM TAPI-2	15 min
PTX3F	50 µg/ml	+10 µM TAPI-2	1h
PTX3F	50 µg/ml	+10 µM TAPI-2	4h
PTX3F	1 µg/ml	+10 µM TAPI-2	1h
PTX3F	10 µg/ml	+10 µM TAPI-2	1h
Kontrolle	0	+10 µM TAPI-2	15 min
Kontrolle	0	+10 µM TAPI-2	1h
Kontrolle	0	+10 µM TAPI-2	4h

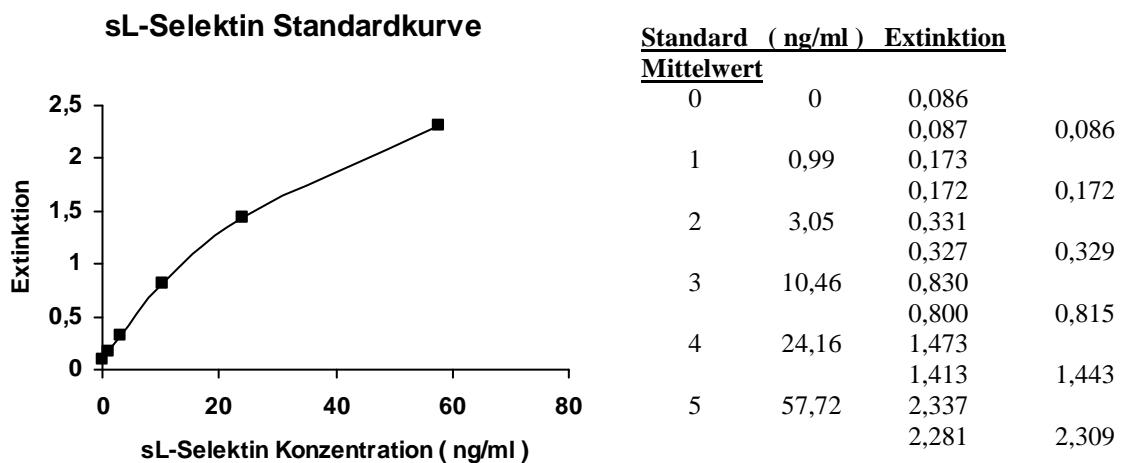
3. 2. 4. 4. Quantifizierung des Gehalts an löslichem Rezeptor

Die quantitative Detektion des Gehalts an sIL-6R, sgp130 und sL-Selektin in den Zellüberständen von unstimulierten bzw. mit APP stimulierten Monozyten und Makrophagen erfolgte nach dem ELISA-Prinzip unter Verwendung kommerzieller Assays der Firma R&DSystems: in den Proben vorhandenes sIL-6R, sgp130 oder sL-Selektin wurde durch entsprechende rekombinante monoklonale murine Antikörper in den wells der Mikrotiterplatte gebunden. Die übrigen Bestandteile und nicht gebundenes Antigen wurden mit einem Waschpuffer ausgewaschen. Durch Bindung eines zweiten Enzym-markierten Antikörpers (Konjugat) konnte anhand der Intensität des Farbumschlages nach Umsetzung der zugegebenen zunächst farblosen Substratlösung durch das Enzym (Merrettich-Peroxidase) die ursprüngliche Konzentration an löslichem Rezeptor in den Proben bestimmt werden.

Bei der endgültigen Quantifizierung mittels Photometer wurde die Konzentration von sIL-6R, sgp130 und sL-Selektin anhand des Vergleichs mit einer zuvor erstellten

Standardkurve mit definierten Antigenkonzentrationen ermittelt. Für den Nachweis von sIL-6R und sgp130 geschah dies bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem Korrekturfilter von 540 bzw. 570 nm., wohingegen die Bestimmung von sL-Selektin bei 450 nm eine Wellenlängenkorrektur von 620 oder 650 nm erforderte. Abbildung 9 zeigt diese Standardkurve und typische Auswertungsdaten für sL-Selektin.

Abbildung 9:



3. 3. Statistische Auswertung

3. 3. 1. Signifikanz

Zur statistischen Interpretation von Testergebnissen geht man von zwei Hypothesen H_0 und H_1 aus: H_0 besagt, daß zwischen zwei Stichproben kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des getesteten Merkmals besteht, wohingegen H_1 von einem signifikanten Unterschied zwischen den Stichproben ausgeht (2-seitiger Test). Zu diesen Hypothesen wird dann vor Durchführung des Tests willkürlich die Irrtumswahrscheinlichkeit α festgelegt. Ein Ergebnis wird dabei als signifikant zum Niveau α gewertet, wenn die berechnete tatsächliche Fehlerwahrscheinlichkeit p kleiner oder gleich α ist. Die Wahrscheinlichkeit, sich bei der Annahme von H_1 zu irren, ist somit $\leq \alpha$. Unterschreitet also p das Signifikanzniveau α , verwirft man H_0 und geht von H_1 aus. Ist p aber größer α wird H_0 beibehalten. Damit ist aber die Nullhypothese oder umgekehrt H_1 keineswegs

bewiesen, da das Datenmaterial evtl. nicht ausreicht, um die jeweilige Alternativhypothese zu bestätigen. Üblicherweise werden folgende Signifikanzniveaus definiert:

- $\alpha > 0,05$: nicht signifikant
- $\alpha \leq 0,05$: signifikant (*)
- $\alpha \leq 0,01$: sehr signifikant (**)
- $\alpha \leq 0,001$: hochsignifikant (***)

D. h. ein Ergebnis ist dann signifikant, wenn die Wahrscheinlichkeit des Zufalls kleiner/gleich 5 % ist. Dabei ist natürlich der Stichprobenumfang n von entscheidender Bedeutung, da nur bei sehr großem n auch kleine Merkmalsunterschiede signifikante Werte annehmen. Im experimentellen Format dieser Arbeit werden nur sehr kleine Stichproben untersucht. Deshalb müssen starke Unterschiede vorliegen, um das willkürlich festgelegte Signifikanzniveau von 0,05 zu erreichen. Es ist natürlich unzulässig, Versuche so lange zu wiederholen, bis ein signifikantes Ergebnis vorliegt.

3. 3. 2. Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben

Da die Ergebnisse nicht einer normalverteilt waren, wurde zur Berechnung des Signifikanzniveaus α der Wilcoxon-Test oder kurz U-Test für unverbundene Stichproben verwendet, der eine Normalverteilung der getesteten Merkmale nicht voraussetzt. Er gehört damit zu den Verteilungs-unabhängigen Test-Verfahren für stetige Merkmale. Es wird geprüft, ob zwei Stichproben vom Umfang n_1 und n_2 die gleiche mittlere Lage bezüglich des untersuchten Merkmals aufweisen. Diese mittlere Lage wird durch den Median M bestimmt. Beim zweiseitigen Test wird danach gefragt, ob die beiden Stichproben sich hinsichtlich des Merkmals signifikant unterscheiden (H_1) oder nicht unterscheiden (H_0). Es wird also nicht gefragt, in welche Richtung sie sich evtl. unterscheiden. Mit dem Wilcoxon-Test prüft man demnach folgende Hypothesen:

$$(1) \quad H_0: M_1 = M_2$$

$$(2) \quad H_1: M_1 \neq M_2$$

Zur Bestimmung des Signifikanzniveaus wird die Prüfgröße U mit der vorgegebenen kritischen Größe U_{krit} (lässt sich der Wilcoxon-Tafel entnehmen, siehe Tabelle 6)

verglichen. Ist $U \leq U_{\text{krit}}$, so verwirft man H_0 und geht von H_1 aus, d. h. die beiden Stichproben unterscheiden sich signifikant bezüglich des Merkmals. Im Fall von $U > U_{\text{krit}}$ muß man H_0 annehmen, nach der sich die beiden Stichproben nicht signifikant unterscheiden. Beim Wilcoxon-Test handelt es sich um einen Rangtest, d. h. zur Bestimmung der Prüfgröße werden zunächst die Absolutwerte der beiden Stichproben zusammengenommen und der Größe nach geordnet. Jeder Wert erhält entsprechend seiner Größe eine Rangzahl. Bei gleichen Absolutwerten wird als Rangzahl der Mittelwert der aufeinander folgenden Ränge gebildet. Die Summe der Rangzahlen der Stichprobe ergibt R_1 und die der Stichprobe 2 R_2 . Die Prüfgröße berechnet sich dann zu der Formel:

$$(3) \quad U_1 = (n_1 \bullet n_2) + n_1(n_1 + 1) / 2 - R_1$$

$$(4) \quad U_2 = (n_1 \bullet n_2) + n_2(n_2 + 1) / 2 - R_2$$

Der kleinere der beiden Werte U_1 oder U_2 wird mit der kritischen Größe U_{krit} aus der Wilcoxon-Tafel verglichen. Da $U_1 + U_2 = n_1 \times n_2$ lässt sich obige Formel durch mathematische Umformung vereinfachen zu:

$$(5) \quad U = R_1 - n_1(n_1 + 1) / 2 \quad (\text{mit } R_1 < R_2)$$

Als Beispiel sei die Berechnung des Signifikanzniveaus aus Abbildung 9 des Ergebnisteils angeführt:

Tabelle 3: Beispielhafte Berechnung des Wilcoxon-Tests

Gruppe 1: Makrophagen $n_1 = 11$		Gruppe 2: Monozyten $n_2 = 7$
Rang	sIL-6R (pg/ml)	Rang
1	41	
2	53	
3	69	
4	88	
5	89	
6	107	
7	117	
8	119	
9,5	163	
11	174	163 9,5
		182 192 218 232
16	265	318 400
		17 18
R₁ = 72,5		MW : 117
		MW : 243
		R₂ = 98,5

Nach Formel (5) ist dieses Ergebnis als signifikant ($p < 0,05$) zu werten, da

$$(U = 6,5) < (U_{\text{krit}} = 19) \quad (\text{vgl. Tabelle 4})$$

Tabelle 4: Wilcoxon-Tafel zum Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$

n₂ n₁	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-											
2	-	-										
3	-	-	0									
4	-	-	0	1								
5	-	0	1	2	4							
6	-	0	2	3	5	7						
7	-	0	2	4	6	8	11					
8	-	1	3	5	8	10	13	15				
9	-	1	4	6	9	12	15	18	21			
10	-	1	4	7	11	14	17	20	24	27		
11	-	1	5	8	12	16	19	23	27	31	34	
12	-	2	5	9	13	17	21	26	30	34	38	42

3. 3. 3. Korrelation

Vermutet man, daß zwischen zwei stetigen Merkmalen (z. B. Körpergröße und -gewicht) eine wechselseitige Abhängigkeit besteht, lässt sich dies mit einem Korrelationsdiagramm überprüfen. Hierzu trägt man für jeden Probanden der Stichprobe die Werte des einen Merkmals auf der y-Achse gegen die des anderen Merkmals auf der x-Achse auf. Man erhält so eine Punktwolke, deren Aussehen bereits Aufschluß über die vermutete Korrelation zwischen beiden Variablen geben kann: Sind die Punkte beliebig über die Diagrammfläche verteilt, besteht kein bzw. ein geringer Zusammenhang zwischen den getesteten Merkmalen. Gruppieren sie sich jedoch annähernd um eine Gerade bzw. Hyperbel oder Parabel, so ist dies eine Hinweis auf das Vorliegen einer Korrelation. Bei einem linearen Zusammenhang kann man diesen durch Konstruktion einer Regressionsgeraden veranschaulichen. Ein quantitatives Maß für den linearen Zusammenhang zweier stetiger Merkmale ist der Pearson'sche Korrelationskoeffizient r mit

$$(6) \quad r = \left[\sum_{i=1}^n (x_i - MW_x)(y_i - MW_y) \right] / \left[\sum_{i=1}^n (x_i - MW_x)^2 \sum_{i=1}^n (y_i - MW_y)^2 \right]^{-1/2}$$

Der Korrelationskoeffizient kann nur Werte zwischen -1 und $+1$ annehmen. Ist $r = 0$, besteht kein linearer Zusammenhang zwischen den Variablen. Ein Wert von $+1$ bzw. -1 besagt dagegen, daß eine vollständige positive bzw. negative lineare Korrelation vorliegt. Zu berücksichtigen ist allerdings, daß zwei Merkmale potenziell korreliert sein können, ohne dass ein kausaler oder funktioneller Zusammenhang besteht. Dies ist z. B. der Fall, wenn eine unbekannte dritte intervenierende Variable gleichzeitig auf beide Merkmale einwirkt.

4. ERGEBNISSE

4. 1. Konstitutive Freisetzung von sIL-6R, sgp130 und sL-Selektin

Unstimulierte Monozyten und Monozyten-abgeleitete Makrophagen setzten bereits nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten spontan sIL-6R, gp130 und sL-Selektin frei (Abb. 10). Diese kurze zeitliche Latenz deutet darauf hin, daß diese konstitutive Freisetzung auf Shedding beruhen könnte.

Abbildung 10:

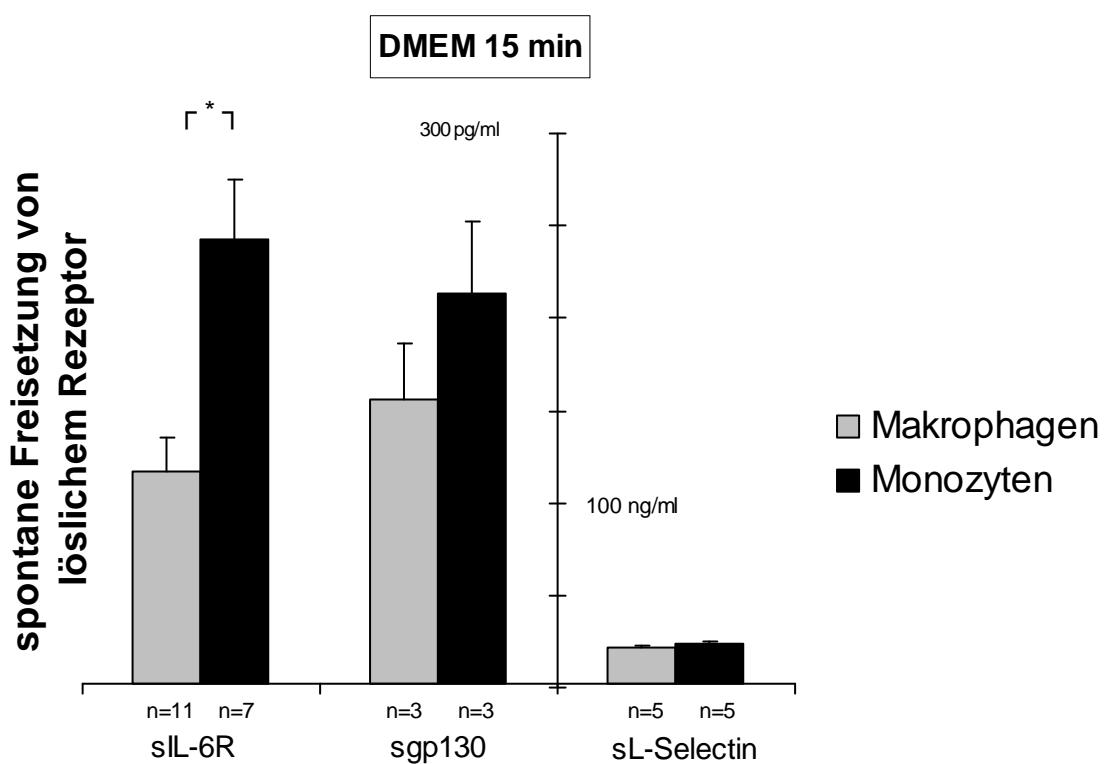


Abbildung 10: Spontanes Shedding von sIL-6R, sgp130 und sL-Selektin. 2×10^6 Monozyten (schwarz) und Monozyten-abgeleitete Makrophagen von individuellen Spendern wurden für 15 Minuten mit 2 ml DMEM bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Konzentrationen von sIL-6R, sgp130 sowie sL-Selektin in den Zellüberständen wurden mittels spezifischer ELISA's basierend auf monoklonalen murinen Antikörpern bestimmt. Die vertikalen Säulen repräsentieren jeweils die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (SEM \pm). Die statistische Analyse erfolgte mit dem Wilcoxon-Test. Liegt eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ vor, ist das Ergebnis als signifikant zu werten (*).

Es wurde in diesem Zusammenhang eine signifikant höhere spontane Freisetzung des sIL-6R durch Monozyten im Gegensatz zu Makrophagen nachgewiesen. Die Freisetzung von

sgp130 zeigte einen vergleichbaren, wenn auch nicht signifikanten Unterschied. Dagegen wurde bezüglich der spontanen sL-Selektin-Freisetzung kein quantitativer Unterschied zwischen Monozyten und differenzierten Makrophagen festgestellt. Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse anhand Abbildung 11 ist darauf zu achten, daß die Freisetzung von sL-Selektin mehrere ng/ml betrug, wohingegen die des sIL-6R und sgp130 um etwa den Faktor 100 geringer ausfiel.

Im Folgenden werden die Charakteristika der einzelnen Rezeptoren im Hinblick auf das konstitutive Shedding genauer betrachtet.

4. 1. 1. Spontane Freisetzung von sIL-6R

Humane Monozyten und Monozyten-abgeleitete Makrophagen setzten spontan den löslichen IL-6R frei. Zur Untersuchung des spontanen Shedding von IL-6R wurden Monozyten mittels Elutriation von 12 gesunden Blutspendern (5 Frauen, 7 Männer) gewonnen und nach Einstellung einer identischen Konzentration für 15 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Monozyten-abgeleitete Makrophagen wurden ebenfalls nach Waschen mit DMEM ohne Zusätze für 15 Minuten inkubiert. Der im Überstand enthaltene sIL-6R wurde im Enzymimmunoassay quantifiziert. Dabei war die spontane sIL-6R-Freisetzung von Monozyten signifikant höher als von Makrophagen (Abb. 10). Während im Überstand von unstimulierten Monozyten (2×10^6) durchschnittlich 243 pg/ml sIL-6R nachgewiesen wurden, setzten Makrophagen unter den gleichen Bedingungen nur 117 pg/ml frei. Dies entsprach einer 2,07fach höheren spontanen Freisetzung bei Monozyten. Nach dem Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben ist dieser Unterschied signifikant, da ($U = 6,5$) < ($U_{krit} = 19$) mit $n_1 = 11$ und $n_2 = 7$. Die spontane Freisetzung wies eine ausgeprägte interindividuelle Varianz sowohl bei Monozyten (min: 163, max: 399, MW: 243) als auch bei Makrophagen (min: 41, max: 265, MW: 117) bei den unterschiedlichen Spendern auf.

4. 1. 1. 1. Kinetik der spontanen sIL-6R -Freisetzung

Die spontane Freisetzung von sIL-6R verhält sich mit zunehmender Inkubationszeit bei Monozyten und Makrophagen unterschiedlich (Abb. 12). Es wurden Monozyten und von den Monozyten abgeleitete Makrophagen jeweils für 15 min, 1h und 4h mit DMEM ohne Zusätze bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und aus den Überständen die Konzentration an freigesetztem sIL-6R durch ELISA ermittelt. Dabei konnte bei Monozyten (Abb. 11A) keine weitere Steigerung der sIL-6R-Freisetzung durch eine Verlängerung der Inkubationszeit erreicht werden, wohingegen bei differenzierten Makrophagen (Abb.11B) eine signifikante kontinuierliche Freisetzung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit festgestellt werden konnte.

Abbildung 11:

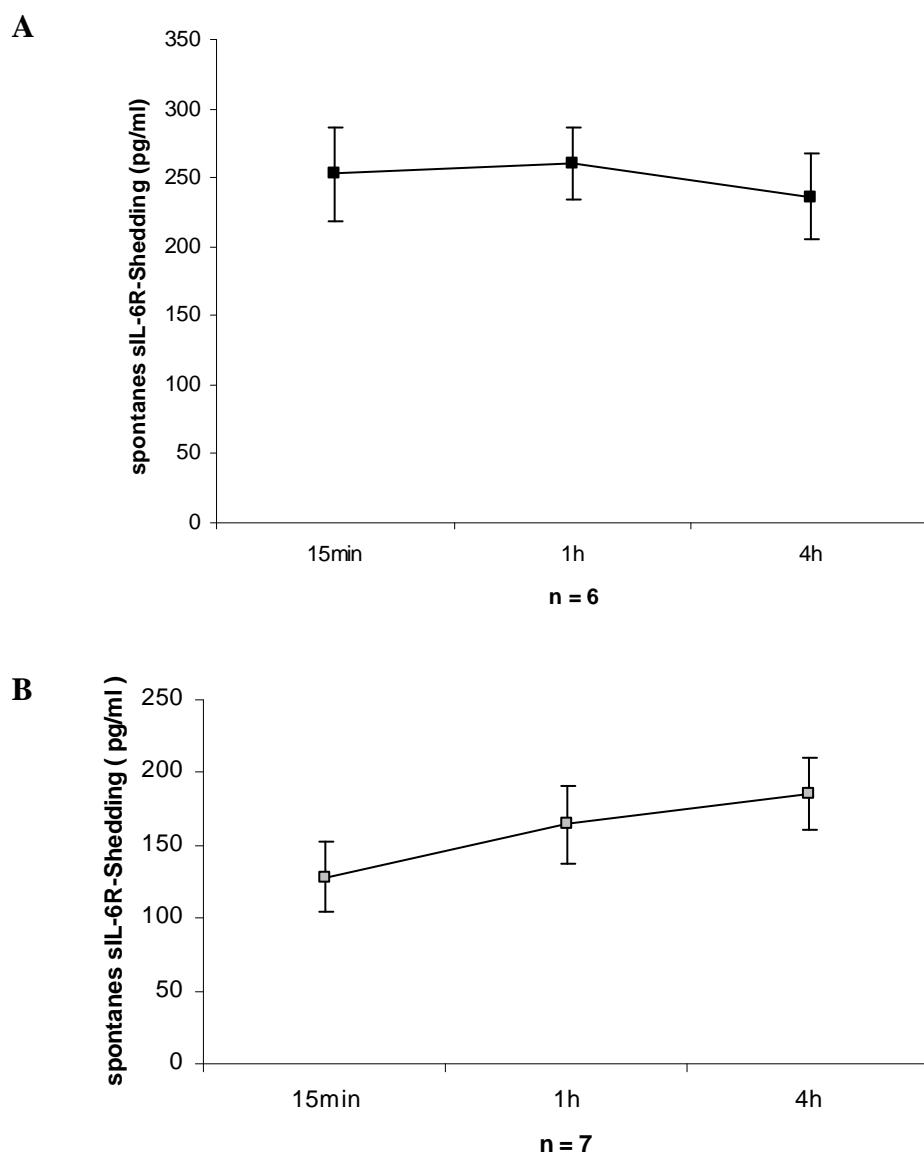


Abbildung 11: Kontinuierliche spontane sIL-6R-Freisetzung durch Makrophagen versus konstanter Freisetzung durch Monozyten. Monozyten (A) und Makrophagen (B) (je 2×10^6 Zellen) wurden für 15 min, 1h und 4h mit DMEM ohne Zusätze inkubiert und die sIL-6R-Freisetzung in den Überständen mit ELISA quantifiziert. Mittelwerte (Quadrate); Standardmeßfehler (\pm), $p < 0,05$ (*);

4. 1. 1. 2. Positive Korrelation von Leukozytenzahl und IL-6R-Shedding

Die spontane sIL-6R Freisetzung durch Shedding korrelierte mit der peripheren Leukozytenzahl der gesunden Blutspender (Abb. 12). Ein linearer Zusammenhang zwischen einer höheren aber noch physiologischen Leukozytenzahl mit der Spontanfreisetzung größerer Mengen an sIL-6R zeigte sich insbesondere für Monozyten (Abb. 12A). Der Korrelationskoeffizient von $r = 0,78$ und die Regressionsgerade mit positiver Steigung bestätigen diesen linearen Zusammenhang. Auch für Makrophagen konnte eine wenn auch schwächere positive Korrelation zwischen der Gesamtleukozytenzahl des Spenders mit einer höheren Gesamtfreisetzung von sIL-6R nachgewiesen werden ($r = 0,69$) (Abb. 12B).

Abbildung 12:

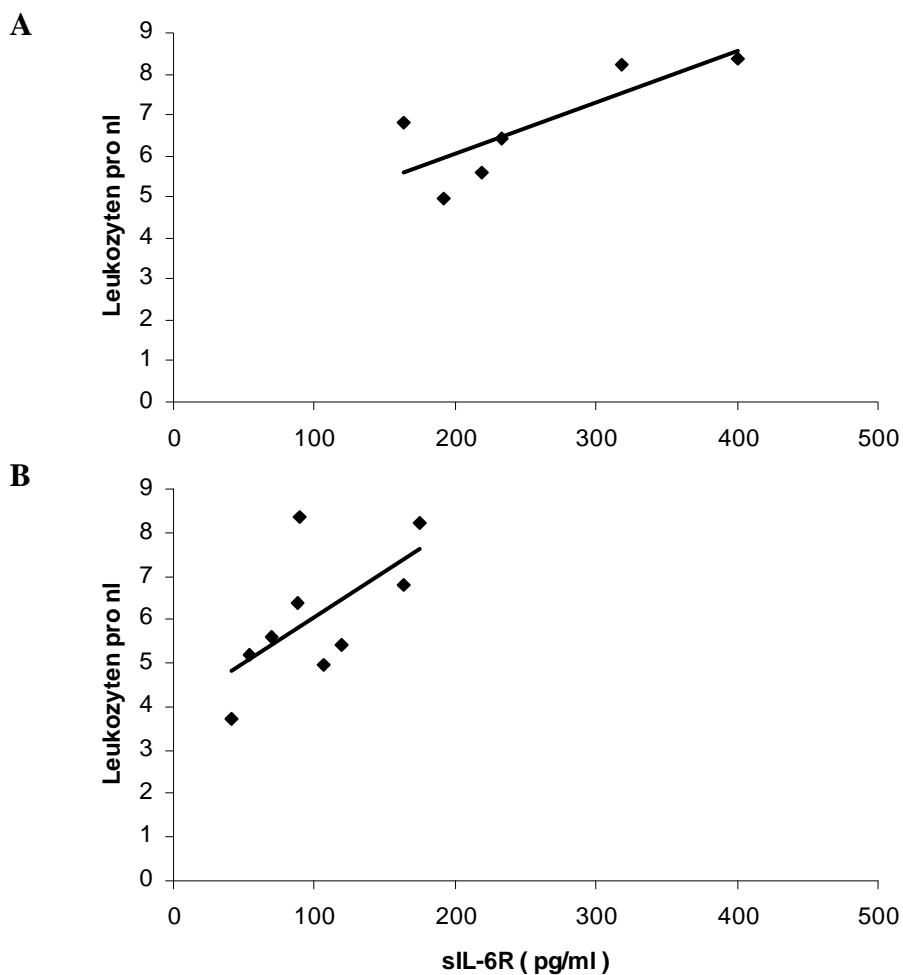


Abbildung 12: Positive Korrelation von Leukozytenzahl der gesunden Spender und sIL-6R-Freisetzung bei Monozyten (A) und Makrophagen (B). Es sind die Leukozytenzahl des peripheren Blutes der einzelnen Spender (y-Achse) und die sIL-6R-Konzentration (x-Achse) nach Inkubation von je 2×10^6 Monozyten (Abb. 12A) bzw. Makrophagen (Abb. 12B) mit DMEM für 15 min in Form einer Punktwolke gegeneinander aufgetragen. Die Regressionsgerade demonstriert den linearen Zusammenhang zwischen beiden Größen.

4. 1. 1. 3. Geschlechtsprädiktion des spontanen sIL-6R-Shedding

Neben der Korrelation mit der Leukozytenzahl wurde das Verhalten des spontanen IL-6R-Shedding auch dahingehend untersucht, ob ein Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Blutspendern besteht (Abb. 13). Interessanter Weise war dabei bei differenzierten Makrophagen die Menge an spontan freigesetztem sIL-6R in den unstimulierten Überständen bei Männern mit 66,9 % (MW: 182 pg/ml) signifikant höher, als bei Frauen (MW: 109 pg/ml). Dagegen konnte ein solcher signifikanter Unterschied bei den undifferenzierten Monozyten nicht nachgewiesen werden (MW \varnothing : 235 pg/ml, MW δ : 262 pg/ml). Beim Vergleich der Mittelwerte bestätigt sich allerdings sowohl in Bezug auf Männer als auch auf Frauen die deutlich höhere Freisetzung von sIL-6R durch Monozyten im Vergleich zu Makrophagen. Zur Randomisierung der Stichproben wurden jeweils vergleichbare Proben mit zur Bestimmung der spontanen sIL-6R-Freisetzung männlicher und weiblicher Spender einander zugeordnet. Dies erklärt, warum die Stichprobenumfänge mit $n = 9$ und $n = 11$ größer sind, als die ursprüngliche Anzahl weiblicher ($n = 5$) und männlicher ($n = 7$) Spender.

Abbildung 13:

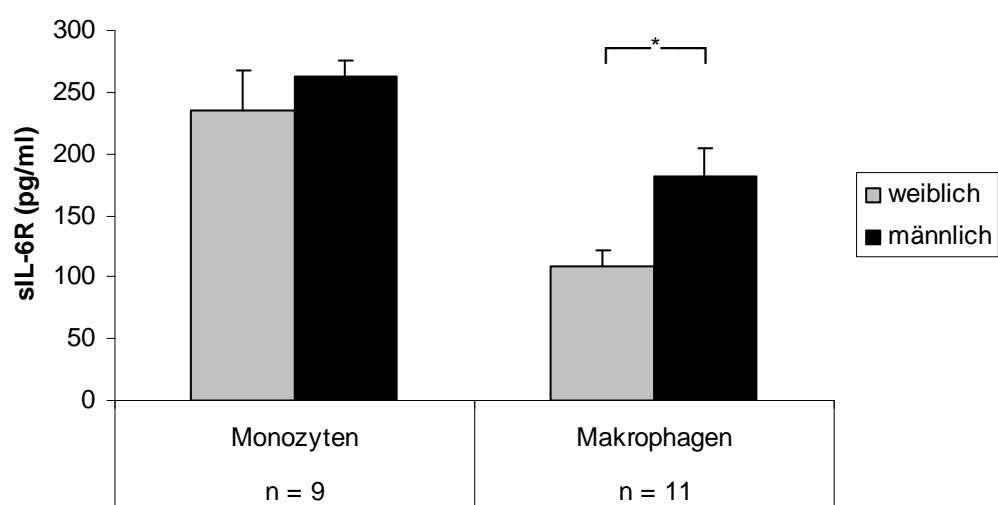


Abbildung 13 Signifikant höhere sIL-6R-Freisetzung durch Makrophagen männlicher im Vergleich zu weiblichen Spendern. Je 2×10^6 Monozyten bzw. Makrophagen weiblicher (grau) und männlicher (schwarz) Spender wurden für die gleiche Zeit mit DMEM ohne Zusätze inkubiert und die sIL-6R-Konzentration der Überstände durch ELISA quantifiziert. Es sind Mittelwerte (vertikale Säulen), Standardmessfehler des Mittelwerts (\pm) und Signifikanzniveau mit $p < 0,05$ (*) dargestellt.

4. 1. 1. 4. Funktionelle Analyse des konstitutiven sIL-6R-Shedding

Ein wichtiger regulatorischer Mechanismus des Shedding umfasst die Protease-vermittelte Abspaltung von Oberflächenrezeptoren. Dabei spielen vor allem Metalloproteasen pathophysiologisch insbesondere unter Entzündungsbedingungen eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund wurde TAPI-2 als Hydroxamat-basierter Inhibitor von TACE und Matrixmetalloproteasen untersucht, der das Protease-vermittelte Shedding von Oberflächenproteinen hemmen kann und somit zur Aufklärung des Mechanismus des Shedding von IL-6R beitragen könnte. Ist dieser Mechanismus abhängig von einer Aktivierung von Metallproteasen, so erwartet man eine deutliche Hemmung der sIL-6R-Freisetzung in Anwesenheit von TAPI-2. Dagegen sollte die spontane Freisetzung des sIL-6R quantitativ nicht beeinflusst werden, wenn der zugrunde liegende Mechanismus unabhängig von Metalloproteasen ist.

Zur Prüfung dieses Sachverhalts wurden 2×10^6 Monozyten und 2×10^6 Monozyten-abgeleitete Makrophagen nach einer 15minütigen Vorstimulation mit TAPI-2 $10 \mu\text{M}$ gleichzeitig mit DMEM und $10 \mu\text{M}$ TAPI-2 inkubiert. Mittels ELISA wurde die sIL-6R-Konzentration in den Überständen quantifiziert. Hierbei zeigt sich sowohl bei Monozyten als auch bei Makrophagen ein ausgeprägter inhibitorischer Effekt der spontanen Freisetzung von sIL-6R (Abb. 14) im Vergleich mit den unstimulierten Proben der gleichen Spender. Bei Monozyten kommt es zu einer 3,95fachen Verminderung der sIL-6R-Freisetzung (DMEM: 197,5 pg/ml, DMEM+TAPI: 50,4 pg/ml). Bei Makrophagen wird das IL-6R-Shedding um das 4,1fache inhibiert (DMEM: 177 pg/ml, DMEM+TAPI: 43 pg/ml). In beiden Fällen ist nach dem Wilcoxon-Test mit $p < 0,01$ die Hemmung statistisch als sehr signifikant zu werten (siehe Abb. 14)

Abbildung 14:

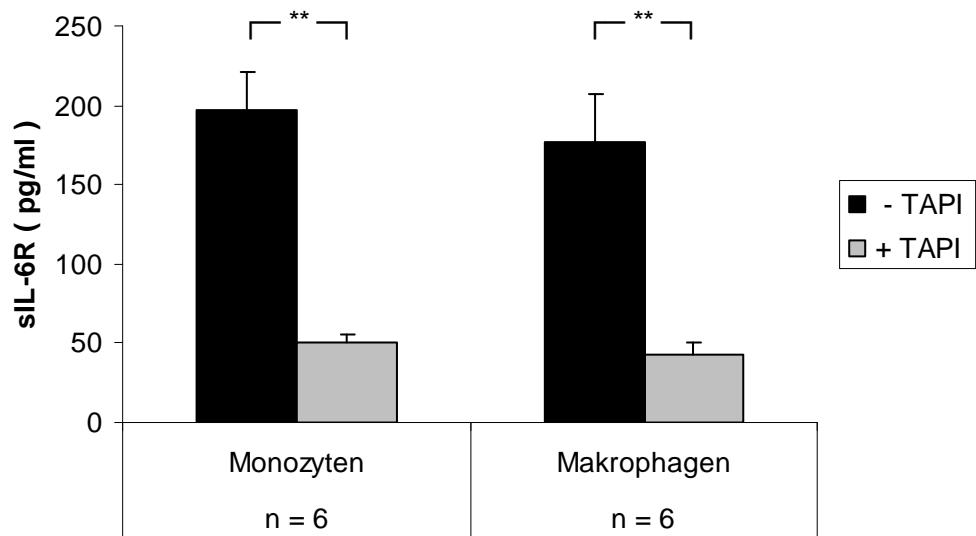


Abbildung 14: Die spontane sIL-6R-Freisetzung von Monozyten und Makrophagen ist abhängig von Metalloproteasen. Monozyten und Makrophagen der gleichen Spender (je 2×10^6 Zellen) wurden gleich lang mit DMEM ohne Zusätze (schwarz) oder DMEM + TAPI-2 der Konzentration $10 \mu\text{M}$ inkubiert. Die Quantifizierung der sIL-6R-Konzentration in den Zellüberständen erfolgt mittels spezifischem ELISA. Die Säulen markieren die Mittelwerte von n Spendern und die Standardmessfehler (\pm), $p < 0,01$ (**).

4. 1. 2. Spontane Generierung von sgp130

Im Gegensatz zu sIL-6R konnte eine quantitative Freisetzung des löslichen gp130 (sgp130) nur bei drei Spendern beobachtet werden (ELISA-Nachweisgrenze für sgp130: 80 pg/ml). Bei diesen Spendern erreichte die Konzentration von sgp130 in den Zellüberständen aber ein vergleichbares Ausmaß wie das spontane sIL-6R-Shedding. Die Monozyten der genannten Spender setzten durchschnittlich 213 pg/ml sgp130 spontan frei, während die Makrophagen derselben Spender 156 pg/ml sgp130 freisetzen (siehe Abb. 10). Dieser Unterschied von 33 % war allerdings im Gegensatz zum sIL-6R mit $p > 0,05$ statistisch als nicht signifikant zu werten. Es läßt sich aber dennoch festhalten, daß sich die quantitative spontane Freisetzung von sgp130 bei diesen drei Spendern bezüglich der verschiedenen mononukleären Zelltypen zumindest ähnlich der des sIL-6R verhält.

4. 1. 2. 1. Vergleich der konstitutiven Freisetzung von sgp130 und sIL-6R

Im direkten Vergleich der spontanen sgp130-Freisetzung mit der Generierung von sIL-6R konnte festgestellt werden, daß trotz des geringen Stichprobenumfangs von n = 3 die Makrophagen dieser Spender signifikant mehr sgp130 freisetzten, als sIL-6R. Dagegen konnte bei den Monozyten derselben Spender kein wesentlicher Unterschied in der Generierung von sIL-6R und sgp130 beobachtet werden. (Abb. 15)

Abbildung 15:

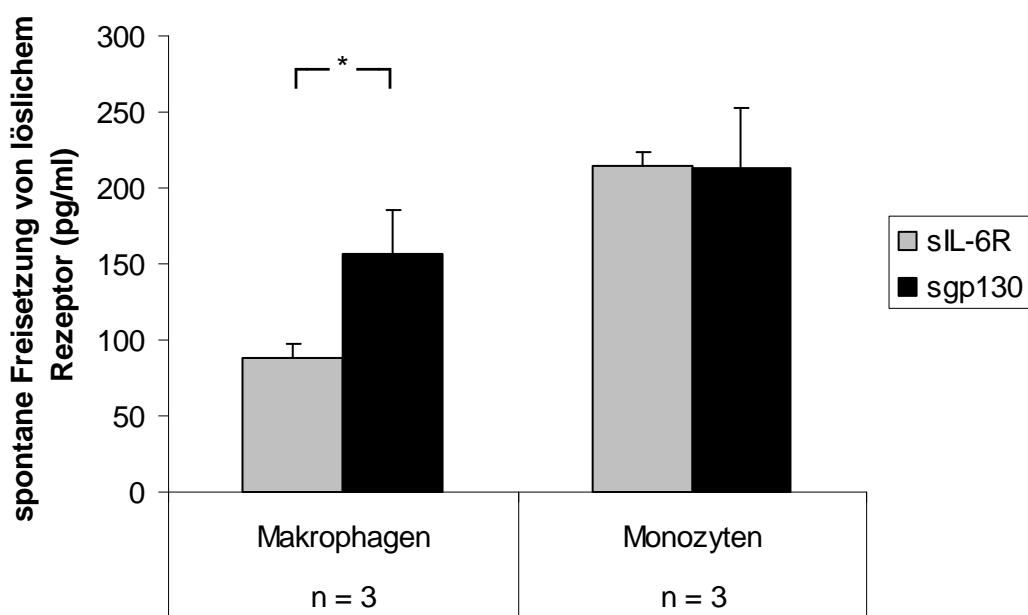


Abbildung 15: Makrophagen setzen im Gegensatz zu Monozyten spontan signifikant mehr sgp130 frei, als sIL-6R.
2 x 10⁶ Monozyten und Makrophagen derselben Spender wurden für 15 min bei 37 °C und 5 % CO₂ mit DMEM ohne weitere Zusätze inkubiert. Die Konzentrationen an sIL-6R (grau) und sgp130 (schwarz) wurden in den Zellüberständen durch spezifische ELISA's bestimmt. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte und ihre Standardmessfehler (T); p < 0,05 (*).

4. 1. 2. 2. Kinetik der spontanen sgp130-Freisetzung

Die spontane Freisetzung von sgp130 zeigte sowohl bei Monozyten als auch bei differenzierten Makrophagen ein im zeitlichen Verlauf von bis zu 4 Stunden konstantes quantitatives Niveau. Daraus ergibt sich neben der kurzen Latenzzeit von 15 Minuten in der die spontane Freisetzung von sgp130 bereits nachweisbar ist, ein zusätzlicher Hinweis darauf, daß diese spontane Freisetzung von sgp130 auf Shedding und nicht auf

Alternativem Spleißen beruht, da bei letzterem eine kontinuierliche ansteigende Kinetik zu erwarten wäre.

Abbildung 16:

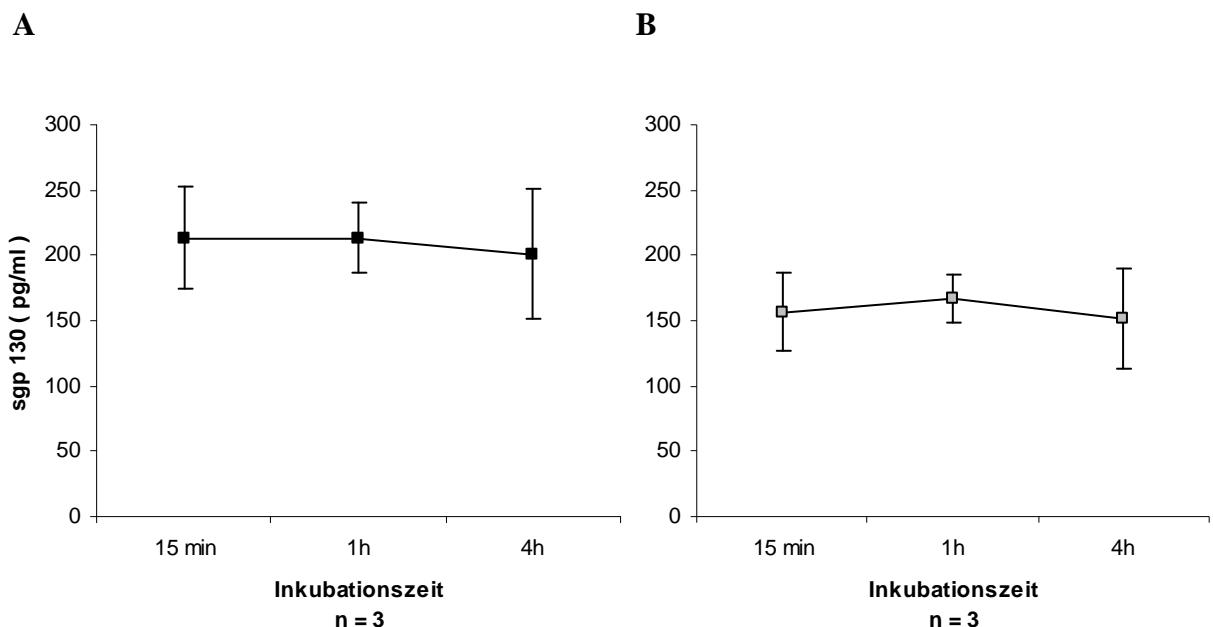


Abbildung 16: Konstante Freisetzung von sgp130 bei verlängerter Inkubationszeit. Monozyten (16A, schwarz) und von diesen abgeleitete Makrophagen (16B, grau) derselben Spender (je 2×10^6 Zellen) wurden für 15 min, 1h und 4h bei 37 °C, 5 % CO₂, mit DMEM ohne Zusätze inkubiert. Die Quantifizierung der sgp130-Konzentration in den Zellüberständen erfolgte mittels eines spezifischen ELISAs. Die Quadrate markieren jeweils die Mittelwerte der drei Spender mit dem Standardmessfehler (\pm).

Eine detaillierte funktionelle Analyse der spontanen sgp130-Freisetzung in Gegenwart von TAPI konnte durchgeführt werden, da die Ergebnisse der drei Spender sämtlich unter der Nachweisgrenze des ELISA von 80 pg/ml lagen. Dennoch kann dies aber als Indiz für eine mögliche Hemmung durch den Metalloprotease-Inhibitor gewertet werden, obwohl eine genaue quantitative Einschätzung nicht möglich war.

4. 1. 3. Charakteristika der spontanen Freisetzung von sL-Selektin

Um die Selektivität eines möglichen Akut-Phase Protein induzierten Shedding an mononukleären Phagozyten zu analysieren, wurde zusätzlich die Freisetzung des Adhäsionsmoleküls L-Selektin, für das eine Generierung löslicher Formen (sL-Selektin) durch Shedding gut belegt ist, im Vergleich zu den beiden Untereinheiten des IL-6-Rezeptorkomplexes untersucht. Dieses Shedding wird durch ein breites Spektrum strukturell und funktioneller unterschiedlicher Faktoren vermittelt. Da zur quantitativen Beurteilung einer möglichen zusätzlichen Induktion der Generierung von löslichem Rezeptor durch inflammatorische Stimuli der Vergleich mit der spontanen Freisetzung unbedingt erforderlich ist, wurden zunächst auch die Charakteristika der spontanen Freisetzung von sL-Selektin untersucht.

Hierbei zeigte sich, daß unstimulierte Monozyten und auch Monozyten-abgeleitete Makrophagen spontan sL-Selektin freisetzten. Die erreichten Konzentrationen lagen dabei im Bereich von mehreren Nanogramm pro ml. Im Gegensatz zu den beiden Untereinheiten des Interleukin 6-Rezeptors konnte kein signifikanter Unterschied in der Freisetzung von sL-Selektin zwischen Monozyten und differenzierten Makrophagen festgestellt werden (siehe Abb. 10). Es war sowohl bei Monozyten (Min: 20, Max: 27, MW: 23 ng/ml) als auch bei Makrophagen (Min: 18, Max: 24, MW: 22 ng/ml) eine starke interindividuelle Varianz zu beobachten. Diese Konzentrationsangaben beziehen sich wiederum jeweils auf die Zellüberstände von 2×10^6 Monozyten oder Makrophagen.

4. 1. 3. 1. Kinetik der konstitutiven sL-Selektin-Freisetzung

Die beschriebene spontane Freisetzung von sL-Selektin blieb im zeitlichen Verlauf sowohl bei Monozyten als auch bei von diesen abgeleiteten Makrophagen derselben Spender annähernd konstant (Abb. 17). Daraus läßt sich folgern, daß zumindest im untersuchten Zeitraum bis zu 4 Stunden neben dem Shedding kein weiterer Mechanismus wie etwa Alternatives Spleißen zum Tragen zu kommen scheint, der potenziell einen zusätzlichen Beitrag zur Generierung des sL-Selektin leisten könnte.

Abbildung 17:

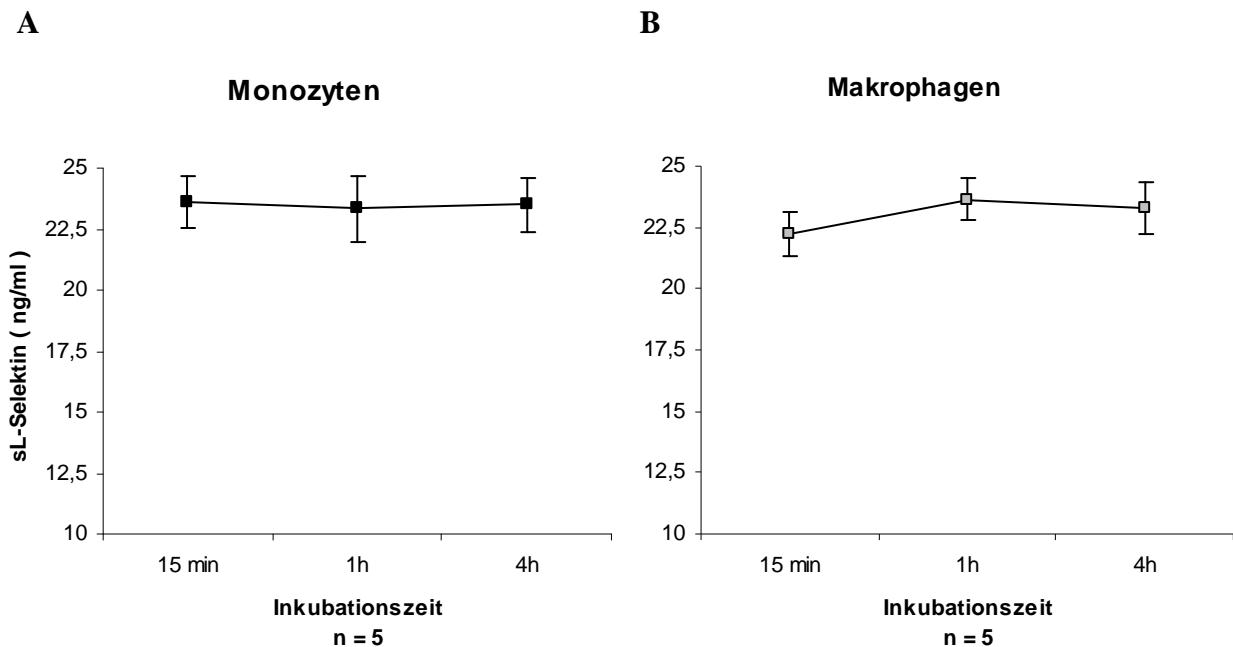


Abbildung 17: Die spontane sL-Selektin-Freisetzung durch unstimulierte Monozyten und Makrophagen bleibt mit zunehmender Inkubationszeit konstant. Je 2×10^6 Monozyten (17A, schwarz) und Makrophagen (17B, grau) derselben Spender ($n = 5$) wurden für 15 min, 1h und 4h bei 37°C und 5 % CO_2 mit 2 ml DMEM ohne weitere Zusätze inkubiert. Mittels der ELISA-Technik wurden dann in den Zellüberständen die Konzentrationen an sL-Selektin gemessen. Abb. 17 stellt graphisch die Mittelwerte (Quadrate) mit den Standardfehlern (\pm) in Bezug zur Inkubationszeit.

4. 1. 3. 2. Funktionelle Untersuchung der konstitutiven sL-Selektin-Freisetzung

Im Gegensatz zur gezeigten starken Hemmung der spontanen Freisetzung von sIL-6R durch den Metalloprotease-Inhibitor TAPI sowohl bei Monozyten als auch bei Makrophagen, wurde die des sL-Selektin nicht von TAPI beeinflusst (Abb. 18). Es waren hierzu analog dem sIL-6R jeweils 2×10^6 Monozyten und Makrophagen derselben Spender mit DMEM ohne weitere Zusätze und im Vergleich dazu mit DMEM und TAPI der Konzentration 10 μM inkubiert worden. Aus dem fehlenden Einfluss von TAPI auf die spontane sL-Selektin-Freisetzung lässt sich schließen, daß es sich hierbei möglicher Weise um zwei unterschiedliche Mechanismen der Generierung von löslichem Rezeptor handelt.

Abbildung 18:

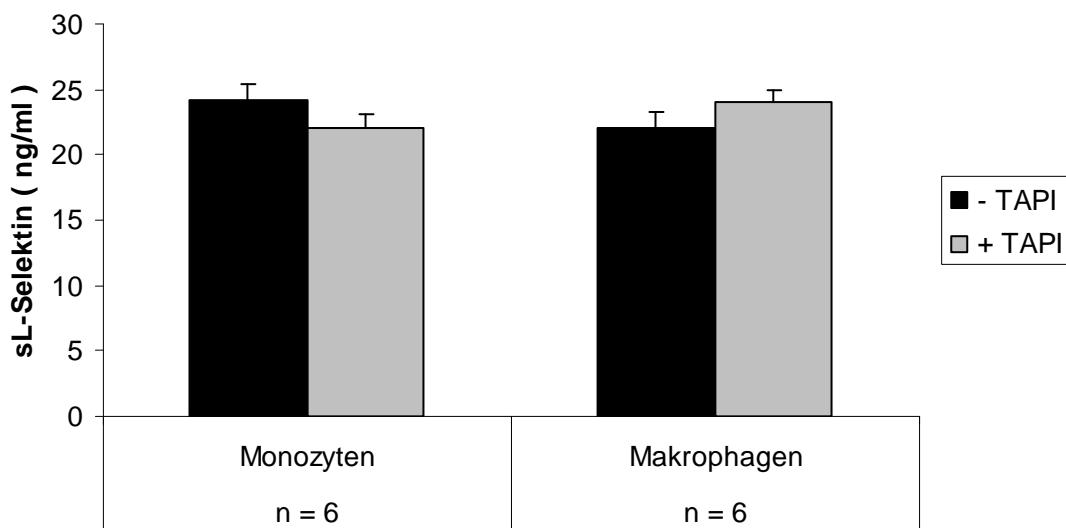


Abbildung 18: Die spontane sL-Selektin-Freisetzung ist unabhängig von Metalloproteasen. Monozyten und Makrophagen (je 2×10^6 Zellen pro Spender) wurden gleichlang mit DMEM ohne Zusätze (schwarz) der DMEM mit TAPI 10 μM (grau) inkubiert. In den Zellüberständen wurde sie sL-Selektin-Konzentration mittels spezifischem ELISA bestimmt. Mittelwerte (vertikale Säulen), Standardmessfehler (\pm).

Neben der fehlenden Wirkung von TAPI auf die Freisetzung von sL-Selektin konnte auch keine Geschlechtspräferenz analog der Freisetzung des sIL-6R beobachtet werden. Dies gilt sowohl für Monozyten (MW ♀ : 22 ng/ml, MW ♂ : 23 ng/ml) als auch für Monozyten-abgeleitete Makrophagen derselben Spender (MW ♀ : 20 ng/ml, MW ♂ : 23 ng/ml). In ähnlicher Weise, wie für das Shedding von sIL-6R gezeigt, konnte eine positive Korrelation der sL-Selektin-Konzentration und Leukozytenzahl der Spender mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,85$ für Makrophagen nachgewiesen werden. Dies war aber bei Monozyten im Gegensatz zum sIL-6R nicht der Fall.

4. 2. Differentielle Induktion der sIL-6R-Freisetzung durch APP

Vor dem Hintergrund der spontanen Freisetzung von löslichem IL-6R, gp130 sowie L-Selektin und deren spezifischer Charakteristika geht die vorliegende Arbeit der Frage nach, ob es unter Entzündungsbedingungen, die hierfür im *in vitro*-Experiment durch pathologisch erhöhte Konzentrationen von Akut-Phase Proteinen (APP) simuliert wurden, zu einer zusätzlichen Induktion dieser Freisetzung kommt. Zu diesem Zweck wurden

Monozyten und Makrophagen, die insbesondere bei chronisch-inflammatorischen Prozessen eine zentrale immunologische Rolle übernehmen mit den Pentraxinen bzw. Peptidfragmenten CRP und PTX3F sowie dem inflammatorischen Apolipoprotein SAA stimuliert. Als Kontrolle wurde jeweils die gleiche Zellzahl mit Inkubationsmedium (DMEM) ohne APP-Stimulus mitgeführt. Mit den in den Zellüberständen zur Stimulation eingestellten repräsentativen APP-Konzentrationen von 1, 10 und 50 µg/ml wurden physiologische sowie moderat- bis akut-inflammatorische Bedingungen simuliert.

Unter Stimulation von Monozyten und Monozyten-abgeleiteten Makrophagen mit Akut-Phase Proteinen zeigte die Freisetzung von sIL-6R sowohl bezüglich der Stimulusart als auch der APP-Konzentration sowie des Zelltyps ein differenziertes Verhalten (Abb. 20). Zudem konnte auch wieder eine starke interindividuelle Varianz der einzelnen Spender beobachtet werden. Es wurden jeweils 2×10^6 Monozyten und Makrophagen derselben Spender (Abb. 20 A, B, C) für 1 Stunde bei 37 °C und 5 %iger-CO₂-Atmosphäre mit DMEM ohne Zusätze, CRP, PTX3 oder SAA der Konzentration 1 (A), 10 (B) und 50 (C) µg/ml inkubiert bzw. stimuliert.

Abbildung 19:

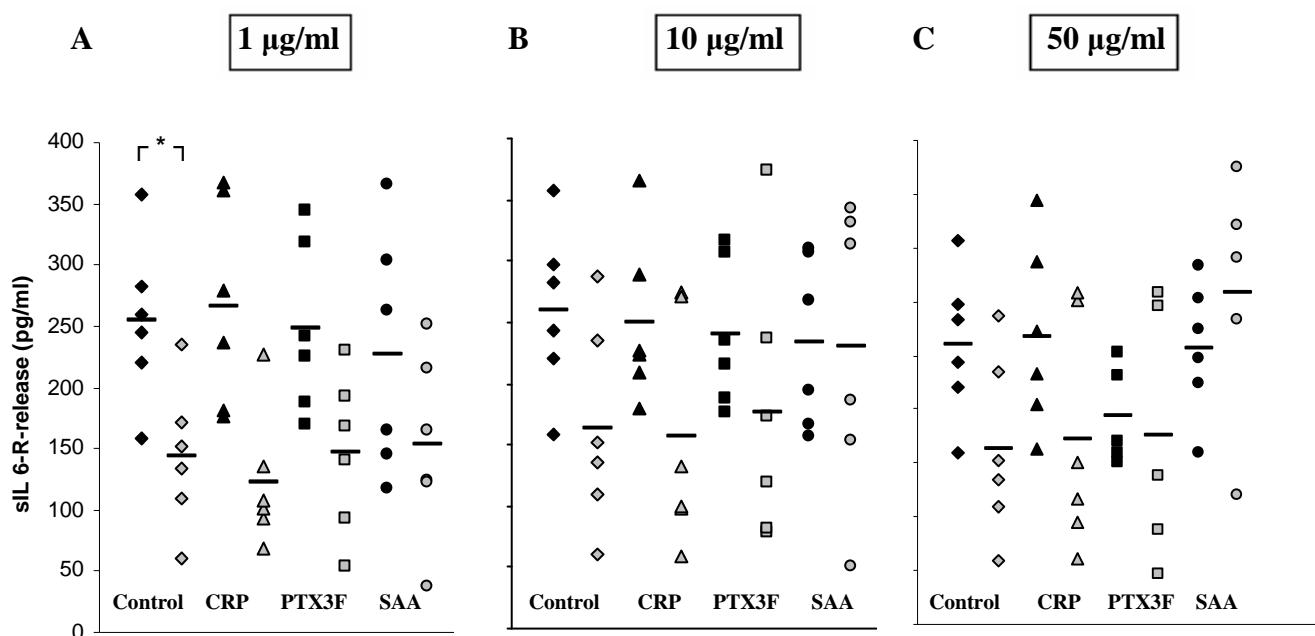


Abbildung 19: Differentielle Induktion der sIL-6R-Freisetzung durch Akut-Phase Proteine. Monozyten (schwarz) und differenzierte Makrophagen (schwarz) (2×10^6 Zellen pro Spender) wurden mit DMEM, CRP, PTX3F oder SAA der Konzentration 1 µg/ml (20A), 10 µg/ml (20B) und 50 µg/ml (20C) stimuliert. Die stimulierten und unstimulierten Zellen wurden anschließend für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Quantifizierung von sIL-6R in den Zellüberständen

erfolgte mittels spezifischem ELISA. Die Markierungen repräsentieren die individuellen sIL-6R-Konzentrationen der einzelnen Spender, wohingegen die horizontalen Balken die Mittelwerte darstellen.

4. 2. 1. sIL-6R-Freisetzung unter physiologischen APP-Konzentrationen

Sowohl die Pentraxine CRP und PTX3F als auch das SAA konnten im Bereich der physiologischen APP-Konzentration von 1 μ g/ml im Mittel keine zusätzliche Induktion der sIL-6R-Freisetzung bewirken (Abb. 19A). In den stimulierten Proben spiegelte sich beim Vergleich der Mittelwerte lediglich das Bild der unstimulierten DMEM-Kontrollen wider: Monozyten setzten unter Stimulation mit CRP (MW: 267 pg/ml), PTX3F (MW 248 pg/ml) oder SAA (MW: 227 pg/ml) der DMEM-Kontrolle (254 pg/ml) vergleichbare Mengen an löslichem Rezeptor frei. Analog konnte bei Makrophagen derselben Spender zwischen Kontrollen (MW: 144 pg/ml und stimulierten Proben (MW CRP: 121, MW PTX3F: 146 pg/ml, MW SAA: 153 pg/ml) kein quantitativer Unterschied in der sIL-6R-Konzentration der Zellüberstände festgestellt werden. Allerdings zeigte sich bei letzteren analog zu Abb. 10 wieder ein signifikanter Unterschied in der sIL-6R-Freisetzung von Monozyten und Makrophagen derselben Spender.

Trotz dieses fehlenden statistischen Effekts zeigt im Hinblick auf die ausgeprägte interindividuelle Varianz die Aufschlüsselung nach einzelnen Spendern, daß im Einzelfall auch physiologische Konzentrationen ausreichen können, um eine zusätzliche Steigerung der sIL-6R-Freisetzung zu induzieren. Dies illustriert Abbildung 20 am Beispiel eines individuellen Spenders:

Abbildung 20:

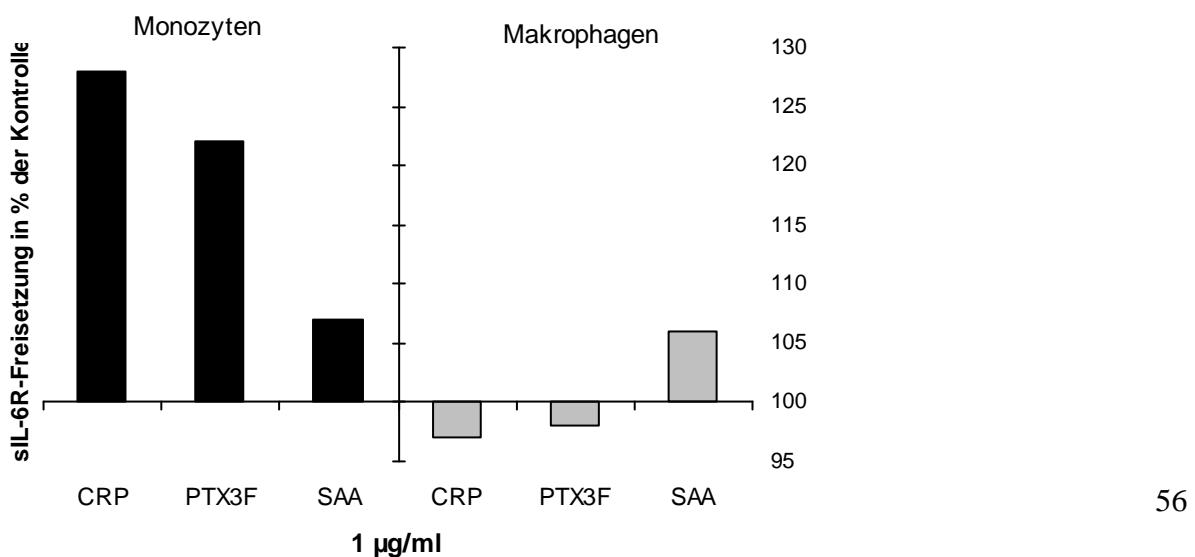


Abbildung 20: Individuelle Induktion der sIL-6R-Freisetzung durch die Pentaxine CRP und PTX3F im Bereich physiologischer Konzentration. 2×10^6 Monozyten (schwarz) bzw. Monozyten-abgeleitete Makrophagen (grau) eines männlichen Spenders wurden mit CRP, PTX3F und SAA der Konzentration 1 µg/ml stimuliert. Anschließend erfolgte zusammen mit der DMEM-Kontrolle eine 1-stündige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂. Die sIL-6R-Konzentration in den Zellüberständen wurden durch ELISA bestimmt. Die Ergebnisse der APP-stimulierten Proben wurden in Relation zum Wert der DMEM-Kontrolle (= 100%) gesetzt.

Bei diesem männlichen Spender setzten die mit CRP (1 µg/ml) stimulierten Monozyten 27 % mehr sIL-6R frei, als unstimulierte Zellen (DMEM: 283 pg/ml, CRP: 361 pg/ml). Eine analoge Induktion zeigte das PTX3F mit 21 % (DMEM: 283 pg/ml, PTX3F: 343 pg/ml). Besonders auffällig bei diesem Spender war außerdem, daß bei den Makrophagen eine Stimulation mit CRP und PTX3F keinen zusätzlichen Effekt bezüglich der sIL-6R-Freisetzung bewirken konnte, wohingegen SAA mit einer Steigerung von 6 % (DMEM: 235 pg/ml, SAA: 250 pg/ml) im Vergleich zu 7 % bei den Monozyten (DMEM 283 pg/ml, SAA: 304 pg/ml) einen wenn auch kleinen aber zumindest vergleichbaren Effekt erzielen konnte. Dagegen konnte bei den Makrophagen eines weiteren Spenders das SAA (1 µg/ml) eine auffällige Induktion von 41 % bewirken (DMEM 152 pg/ml, SAA 215 pg/ml).

4. 2. 2. Signifikante Induktion der Freisetzung von sIL-6R durch SAA

Im Rahmen von Entzündungsreaktionen steigen die Konzentrationen der Akut-Phase Proteine auf Werte deutlich über 1 mg/dl im Blutplasma an. Zur Analyse des IL-6R-Shedding unter Entzündungsbedingungen wurden deshalb 2×10^6 Monozyten und 2×10^6 von den Monozyten derselben Spender abgeleitete Makrophagen für jeweils eine Stunde mit SAA, CRP und PTX3F der Konzentration 50 µg/ml bei 37 °C und 5 % CO₂ stimuliert. Zur Kontrolle wurden gleiche Mengen an Monozyten und differenzierten Makrophagen für eine Stunde mit DMEM ohne Zusätze inkubiert. Es zeigte sich bei Makrophagen eine ausgeprägte Steigerung des IL-6R-Shedding auf das 1,75fache des Kontrollwerts durch SAA (MW SAA: 264 pg/ml, MW DMEM: 151 pg/ml). Dieser Unterschied ist gemäß Wilcoxon-Test als signifikant zu werten, da ($U = 26$) < ($U_{krit} = 27$) mit den Stichprobenumfängen $n_1, n_2 = 10$ ($p < 0,05$). Dagegen waren die undifferenzierten Monozyten derselben Spender nicht dieser Induktion betroffen (MW SAA: 237 pg/ml, MW DMEM 239 pg/ml) (Abb. 21).

Abbildung 21:

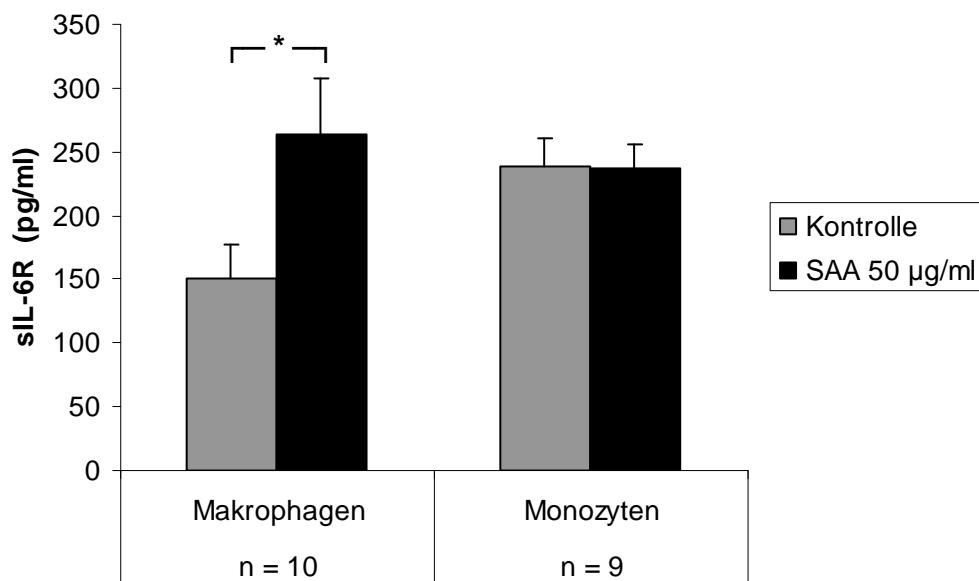


Abbildung 21: Signifikante Induktion der sIL-6R-Freisetzung durch SAA bei Makrophagen. 2×10^6 Makrophagen und Monozyten wurden für 1h bei 37°C und 5 % CO_2 mit SAA der Konzentration $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ (schwarze Säulen) stimuliert. Zur Kontrolle wurden äquivalente Zellmengen für 1h mit DMEM ohne weitere Zusätze inkubiert (graue Säulen). Anschließend wurde die Konzentration von sIL-6R in den Zellüberständen durch einen spezifischen ELISA quantifiziert. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte der sIL-6R-Konzentration in den Überständen von jeweils n Spendern. Zusätzlich sind die Standardmessfehler der Mittelwerte (\pm) angegeben. Die Mittelwertdifferenz von stimulierten und unstimulierten Proben ist nach dem Wilcoxon-Test mit $p < 0,05$ statistisch signifikant (*).

4. 2. 2. 1. APP-spezifische und Rezeptor-selektive Induktion des Shedding

Im Gegensatz zum inflammatorischen Apolipoprotein SAA konnten die Pentraxine CRP (MW CRP: 153 pg/ml, MW DMEM 157 pg/ml) und PTX3F (MW PTX3F: 185 pg/ml, MW DMEM: 170 pg/ml) keine zusätzliche Induktion der sIL-6R-Freisetzung bei Makrophagen bewirken (Abb. 22). Analog dem SAA konnte kein induktiver Effekt der Pentraxine auf die konstitutive Freisetzung von sIL-6R bei undifferenzierten Monozyten derselben Spender beobachtet werden (keine Abb.).

Abbildung 22:

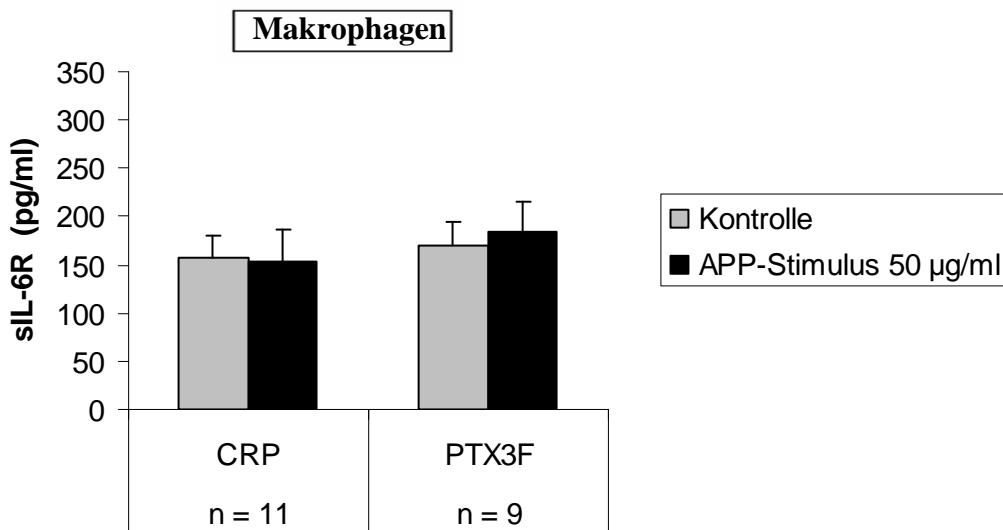


Abbildung 22: Pentraaxine haben keinen induktiven Effekt auf die sIL-6R-Freisetzung. Makrophagen (2×10^6 Zellen) wurden für 1h unter 37 °C und 5 % CO₂ mit CRP oder PTX3F der Konzentration 50 µg/ml stimuliert. Für die Kontrolle wurde die gleiche Mengen Makrophagen derselben Spender mit DMEM ohne Zusätze ebenfalls für 1h inkubiert. Die Säulen stellen die Mittelwerte (n Spender) der sIL-6R-Konzentrationen in stimulierten (schwarz) und unstimulierten (grau) Proben dar. Zusätzlich ist der Standardmessfehler angegeben (T).

Darüber hinaus beschränkte sich die SAA-vermittelte Induktion der Freisetzung von löslichem Rezeptor selektiv auf den IL-6R, wohingegen sowohl gp130 als auch L-Selektin nicht von dieser Regulation betroffen waren. Dies galt gleichermaßen für Monozyten wie auch für Monozyten-abgeleitete Makrophagen derselben Spender (Abb. 23). Die Mittelwerte der Konzentrationen an löslichem IL-6R, gp130 und L-Selektin sind in Abb. 23 als prozentuales Verhältnis im Vergleich zu den Mittelwerten der unstimulierten Kontrollen angegeben. Tabelle 5 können dagegen die Absolutwerte entnommen werden.

Abbildung 23:

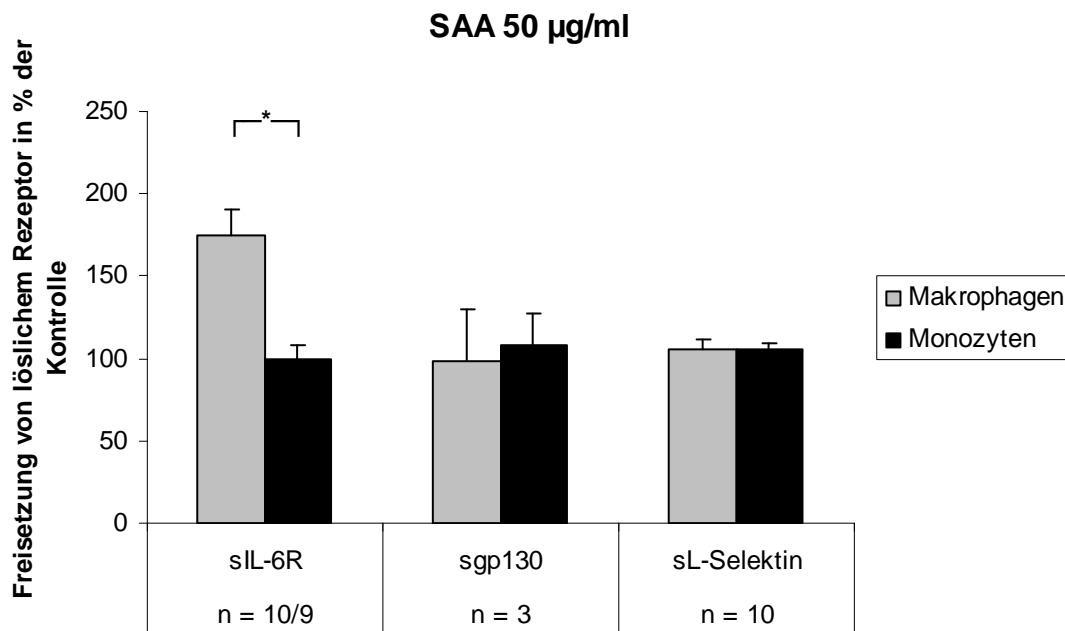


Abbildung 23: Selektive SAA-vermittelte Induktion der Freisetzung von löslichem Rezeptor. Jeweils 2×10^6 Makrophagen (grau) und Monozyten (schwarz) derselben Spender (Stichprobenumfang n) wurden gleichlang mit SAA der Konzentration 50 µg/ml bei 37 °C und 5 % CO₂ stimuliert. Eine äquivalente Menge an Zellen wurde zur Kontrolle für die gleiche Zeit mit DMEM ohne weitere Zusätze inkubiert. Die Konzentrationen an löslichem Rezeptor wurden mittels spezifischer ELISA's bestimmt. Es sind die prozentualen Anteile der Mittelwerte der Konzentration an löslichem Rezeptor in den Zellüberständen im Vergleich zu dem Mittelwerten der Kontrollen (= 100 %) dargestellt (vertikale Säulen). Zur Orientierung über die Streuung der Werte sind zusätzlich die Standardmessfehler angegeben (±). Für die Freisetzung des sIL-6R ergab sich mit p < 0,05 (*) nach dem Wilcoxon-Test ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Makrophagen und Monozyten.

Tabelle 6: Mittelwerte (MW) der Konzentrationen an löslichem Rezeptor in den Zellüberständen von Monozyten und Makrophagen von n Spendern nach Stimulation mit SAA (50 µg/ml) im Vergleich zu den DMEM-Kontrollen

		<u>MW Konzentration des löslichen Rezeptors</u>
<u>Rezeptorart</u>	Kontrolle	SAA 50 µg/ml
sIL-6R (pg/ml) n = 10		
Monozyten	239	237
Makrophagen	151	264

sgp130 (pg/ml)	n = 3		
Monozyten	213	232	
Makrophagen	166	162	
sL-Selektin (ng/ml)	n = 10		
Monozyten	23,4	24,5	
Makrophagen	21,6	22,8	

4. 2. 2. 2. Dosis-Abhängigkeit der SAA-induzierten sIL-6R-Freisetzung

Die SAA-vermittelte Induktion der sIL-6R-Freisetzung bei der deutlich inflammatorischen Konzentration von 50 µg/ml im Gegensatz zu physiologischen Konzentrationen deutet auf einen möglichen Dosis-Wirkungszusammenhang hin. In Abbildung 24 wird dies genauer aufgeschlüsselt und bestigt einen direkten Zusammenhang von Dosis (= Konzentration) des SAA-Stimulus und Wirkung (= quantitatives Ausmaß der sIL-6R-Freisetzung) im Vergleich zu den mitgefrten Kontrollen. Unter einstündiger Stimulation mit SAA der Konzentration von 1, 10 und 50 µg/ml ergab sich bei 6 Spendern ein kontinuierlicher Anstieg der sIL-6R-Konzentration in den Zelluberstanden von 2×10^6 Makrophagen im Mittel ein kontinuierlicher Anstieg der sIL-6R-Konzentration von ursprünglich 181 über 229 bis 269 pg/ml. Im Vergleich hierzu lag der Mittelwert der unstimulierten Kontrollen derselben Spender nach einstündiger Inkubation bei 163 pg/ml. In Abbildung 24 schneidet deshalb die x-Achse bei diesem Wert die y-Achse, um den mit Dosissteigerung zunehmenden Unterschied zwischen stimulierten Proben und Kontrollen graphisch übersichtlich zu veranschaulichen. Im Gegensatz zu den differenzierten Makrophagen zeigten die Monozyten derselben Spender unter Steigerung der SAA-Dosis nahezu konstante Mittelwerte (SAA 1 µg/ml: 232 pg/ml, SAA 10µg/ml: 233 pg/ml, SAA 50 µg/ml: 236 pg/ml). Somit bestigt sich, daß bei Monozyten SAA generell keine Induktion der sIL-6R-Freisetzung bewirkt.

Abbildung 24:

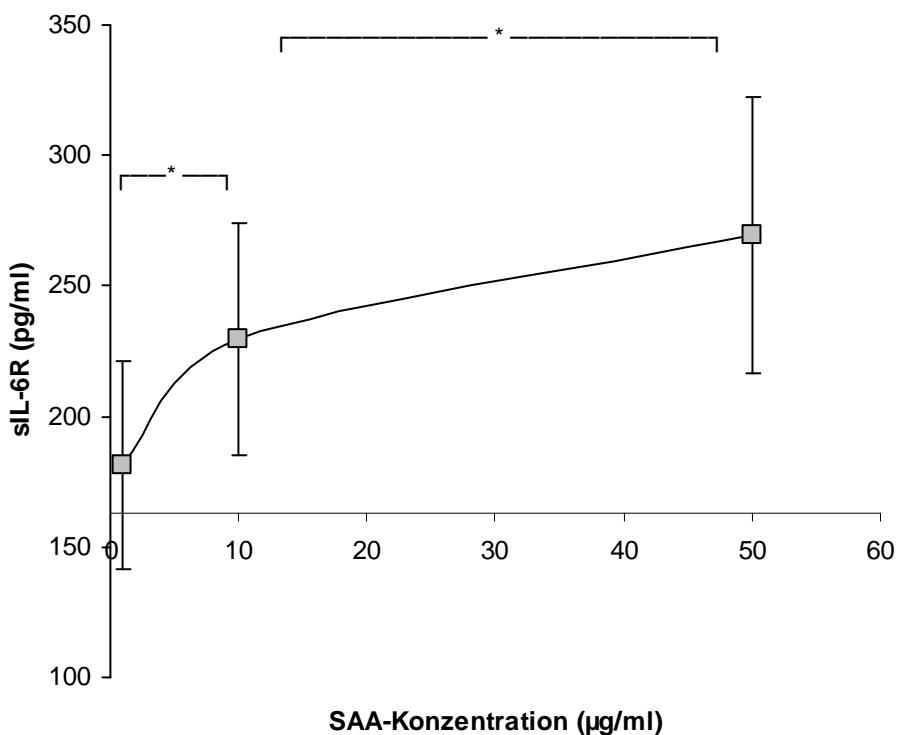


Abbildung 24: Dosisabhängigkeit der SAA-induzierten Freisetzung von sIL-6R. Makrophagen von $n = 6$ Spendern wurden für 1h mit SAA der Konzentration 1, 10 und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ stimuliert. Zur Kontrolle erfolgte gleichzeitig eine Inkubation von Makrophagen derselben Spender mit DMEM ohne weitere Zusätze. Mittels ELISA wurde die Konzentration von sIL-6R in den Überständen von jeweils 2×10^6 Makrophagen quantifiziert. Es sind jeweils die Mittelwerte aller Spender (graue Quadrate) und die zugehörigen Standardmessfehler (\pm) angegeben. Die x-Achse schneidet die y-Achse bei 163 pg/ml. Dies entspricht dem Mittelwert der mitgeführten Kontrollen. Damit wird eine übersichtliche optische Darstellung der Differenz von stimulierten Proben und Kontrollen ermöglicht.

4. 2. 2. 3. Kinetik der SAA-vermittelten sIL-6R-Freisetzung

Die SAA-vermittelte Induktion der Freisetzung von sIL-6R war bereits nach 15 Minuten signifikant (MW SAA 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 147, Kontrolle 101 pg/ml; $n = 5$, $p < 0,05$) und nahm mit zunehmender Stimulationszeit kontinuierlich zu. In Abbildung 25 ist das prozentuale Verhältnis der Mittelwerte unter SAA-Stimulation im Vergleich zu den Mittelwerten der DMEM-Kontrollen (= 100 %) gegen die Stimulationszeit aufgetragen. Hierbei zeigt sich eine Zeit-abhängige Steigerung der sIL-6R-Freisetzung von 45 (15 min, $n = 5$), 65 (1h, $n = 6$) und 98 % (4h, $n = 2$). Aufgrund der geringen Zahl von verwertbaren Daten für die 4-stündige Stimulation war eine statistische Analyse nicht möglich. Da aber gerade dieser

geringe Stichprobenumfang mit einer bereits so ausgeprägten Zunahme von 98 % im Vergleich zur Kontrolle assoziiert ist, ist eine direkte Abhängigkeit der SAA-vermittelten Induktion von der Stimulationszeit zumindest sehr wahrscheinlich.

Abbildung 25:

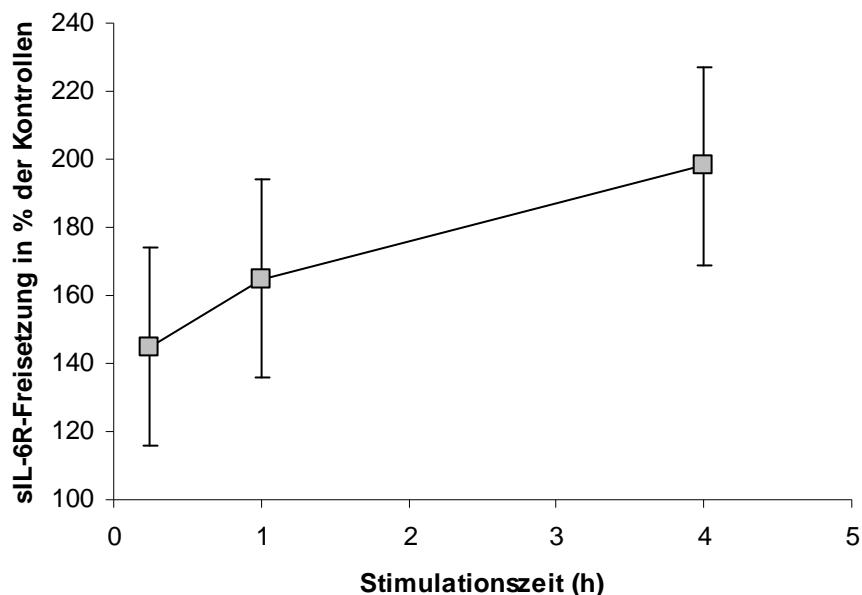


Abbildung 25: Kinetik der SAA-induzierten sIL-6R-Freisetzung. Je 2×10^6 Makrophagen wurden für 15 min ($n = 5$), 1h ($n = 6$) und 4h ($n = 2$) mit SAA der Konzentration 50 µg/ml stimuliert. Zur Kontrolle wurden jeweils Makrophagen derselben Spender für 15 min, 1h und 4h mit DMEM ohne weitere Zusätze unter gleichen Bedingungen (37°C , 5 % CO₂ inkubiert. In den Zellüberständen wurden durch ELISA die Konzentrationen bestimmt und die Mittelwerte berechnet. Die Mittelwerte der stimulierten Proben wurden als prozentuale Induktion im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen (= 100 %, entspricht Niveau der Zeitachse) angegeben. Zur Beurteilung der Streuung der Messwerte sind zusätzlich die Standardmessfehler eingetragen (\pm).

4. 2. 2. 4. Funktionelle Analyse der SAA-vermittelten Freisetzung von sIL-6R

Nach dem Nachweis der SAA-vermittelten Induktion der sIL-6R-Freisetzung stellt sich die Frage nach dem zugrunde liegenden Mechanismus. Um diesen zu analysieren wurde die Stimulation von Makrophagen mit SAA (50 µg/ml) zusätzlich in Gegenwart des Metalloproteaseinhibitors TAPI in der Konzentration von 10 µM durchgeführt (Abb. 26). Hierbei wurde neben der konstitutiven auch eine sehr signifikante Hemmung ($p < 0,01$) der durch SAA zusätzlich freigesetzten Menge an sIL-6R beobachtet. Der induktive Effekt des SAA ist in diesem Zusammenhang als Differenz zwischen dem Mittelwert der stimulierten

Proben (265 pg/ml sIL-6R) und dem Mittelwert der unstimulierten Kontrollen (176 pg/ml sIL-6R) definiert (**a**). Dieser induktive Effekt wurde in Abbildung 26 gleich 100 % gesetzt. Zum Vergleich wurde analog die Differenz der Mittelwerte von stimulierten Proben (63 pg/ml sIL-6R) und unstimulierten Proben (43 pg/ml sIL-6R) in Gegenwart von TAPI gebildet (**b**). Anschließend wurde der prozentuale Anteil des induktiven Effekts des SAA mit TAPI am ursprünglich vorhandenen induktiven Effekt berechnet (**c**):

$$\mathbf{a)} \quad 265 - 176 \text{ pg/ml} = 89 \text{ pg/ml} (= 100 \%)$$

$$\mathbf{b)} \quad 63 - 40 \text{ pg/ml} = 20 \text{ pg/ml}$$

$$\mathbf{c)} \quad 20 : 0,89 = 22,5 \%$$

Würde folglich TAPI keinen ausgeprägten inhibitorischen Effekt auf die zusätzliche Induktion durch SAA ausüben, so wäre zu erwarten, daß sich (**c**) in etwa auf dem quantitativen Niveau von (**a**) befinden würde.

Abbildung 26:

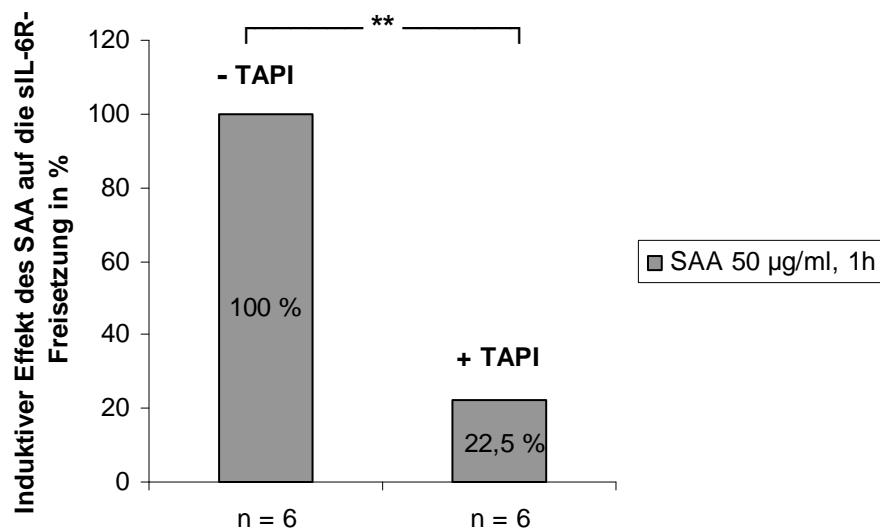


Abbildung 26: Signifikante Hemmung der SAA-induzierten sIL-6R-Freisetzung in Gegenwart von TAPI. 2×10^6 Makrophagen wurden für eine 1h bei 37 °C, 5 % CO₂ mit SAA der Konzentration 50 µg/ml in An- (+ TAPI) und Abwesenheit (- TAPI) des Metalloproteaseinhibitors TAPI stimuliert. Die eingestellte Konzentration von TAPI betrug 10 µM. Zur Kontrolle wurde äquivalente Mengen an Makrophagen für 1h mit DMEM in An- und Abwesenheit von TAPI unter gleichen Bedingungen inkubiert. Mittels spezifischem ELISA wurde die sIL-6R-Konzentration in den Zellüberständen bestimmt und die Mittelwerte (n = 6) berechnet. Die Differenz des Mittelwerts der stimulierten und unstimulierten Proben ohne TAPI entspricht dem induktiven Effekt des SAA (= 100%). Die analoge Differenz mit TAPI ist als prozentualer Anteil des ursprünglichen induktiven Effekts dargestellt (22,5 %). Es zeigte sich nach dem Wilcoxon-Test statistisch eine sehr signifikante (p < 0,01, **) Hemmung der sIL-6R-Freisetzung in Gegenwart von TAPI.

5. DISKUSSION

5. 1. Differentielle Induktion des sIL-6R-Shedding durch SAA

Die Zytokine der IL-6-Familie sind die Hauptinduktoren der hepatischen und extrahepatischen Expression von Akut-Phase Proteinen. Jedoch wurde eine mögliche reziproke Interaktion der APP mit dem IL-6-Rezeptorkomplex bisher nicht untersucht. Vor diesem Hintergrund konnten wir erstmals eine selektive, in typischen inflammatorischen Konzentrationen Dosis-abhängige Induktion des Shedding von sIL-6R durch das lipidartige SAA nachweisen und bezüglich zentraler Eigenschaften genauer charakterisieren.

5. 1. 1. Selektivität des APP-vermittelten sIL-6R-Shedding

Gegenwärtig ist nicht bekannt, ob Akut-Phase Proteine aktiv mit IL-6R interagieren können. Wir haben daher zwei Klassen von APP's im Hinblick auf die Fähigkeit zur Induktion eines Shedding von sIL-6R untersucht: die Pentraxine und das inflammatorische Apolipoprotein SAA. Wir konnten in diesem Zusammenhang eine signifikante Induktion des sIL-6R-Shedding durch SAA zeigen, während wir bei den Pentraxinen CRP und PTX3 keinen derartigen induktiven Effekt beobachten konnten. Dieses selektive SAA-vermittelte Shedding von sIL-6R könnte auf eine neue zentrale Funktion im Sinne einer regulatorischen Interaktion mit dem IL-6-Rezeptor hindeuten. Bisher erbrachte lediglich eine *in vitro*-Untersuchung den Hinweis, daß ein APP-vermitteltes Shedding von sIL-6R überhaupt möglich ist [77]. Diese Arbeit untersuchte jedoch ausschließlich humane neutrophile Granulozyten, wohingegen wir humane Monozyten und Monozyten-differenzierte Makrophagen analysierten. Die eingesetzte Zellzahl war aber mit 2×10^6 identisch. Die neutrophilen Granulozyten waren in [77] für 30 Minuten mit CRP der Konzentration 50 µg/ml stimuliert worden und hatten hierunter im Mittel 129 pg/ml sIL-6R ($n = 10$) freigesetzt. Wir konnten dagegen schon nach einer Stimulationszeit von 15 min mit 264 pg/ml ($n = 10$) ein deutlich stärkeres quantitatives Shedding nach Stimulation mit SAA der Konzentration 50 µg/ml bei Makrophagen nachweisen. Neben dem vollständigen CRP-Molekül erzielten bei den neutrophilen Granulozyten kleine Peptide aus der C1q-Bindungsregion von CRP eine dem kompletten CRP-Molekül vergleichbare induktive Wirkung auf die sIL-6R-Freisetzung [77]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den

Daten von Zouki et. al. [78], die unter Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit 200 µg/ml CRP und den o. g. Peptiden für 30 Minuten eine signifikante Induktion der Freisetzung von sL-Selektin beobachten konnten. Dagegen konnten in unserer Arbeit weder CRP noch analoge Peptide von PTX3 eine Induktion der Freisetzung von sIL-6R bewirken. Möglicherweise ist diese differentielle Induktion des sIL-6R-Shedding in den unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen von Monozyten/Makrophagen gegenüber Granulozyten begründet.

5. 1. 2. Dosis-Wirkungs-Beziehung und Kinetik des SAA-vermittelten Shedding

Wir konnten zeigen, daß SAA in der bei Entzündungen typischen Konzentration von 50 µg/ml eine signifikante Induktion des sIL-6R-Shedding induziert. Darüber hinaus konnten wir eine signifikante Dosis-Abhängigkeit des SAA-induzierten sIL-6R-Shedding beobachten. D. h. mit zunehmender SAA-Konzentration steigerte sich auch die Freisetzung von sIL-6R als Resultat eines quantitativen Shedding. Konnten wir noch unter Stimulation mit der physiologischen SAA-Konzentration von 1µg/ml nur eine geringe, jedoch nicht-signifikante Steigerung der sIL-6R-Freisetzung beobachten, so zeigte sich mit 10 und 50 µg/ml im inflammatorischen Dosisbereich eine deutliche Korrelation zur SAA-Konzentration. Diese Resultate stehen im Einklang mit den durch Jones et al. [77] publizierten Daten, die ebenfalls eine signifikante Dosis-Wirkungsbeziehung für das CRP-vermittelte sIL-6R-Shedding bei neutrophilen Granulozyten demonstriert haben. Auch hier wird nach kontinuierlichem Anstieg der sIL-6R-Freisetzung ein maximaler Effekt unter Stimulation mit 50 µg/ml CRP beschrieben, eine weitere Steigerung der CRP-Konzentration auf 100 µg/ml führte jedoch wieder zu einem Abfall der sIL-6R-Freisetzung. Neben der positiven Korrelation der SAA-Dosis mit der quantitativen Induktion des sIL-6R-Shedding konnten wir auch eine Zeitabhängigkeit des Induktionseffektes beobachten. So konnten wir bereits nach einer 15minütigen Stimulation mit 50 µg/ml SAA eine signifikante Induktion der SAA-Freisetzung feststellen, die sich dann im zeitlichen Verlauf bis max. 4 h weiter steigerte. Eine analoge Kinetik wurde beim CRP-vermittelten sIL-6R-Shedding von Neutrophilen beobachtet [77]. Die durch uns nachgewiesene Dosis-Abhängigkeit des SAA-vermittelten sIL-6R-Shedding deutet ebenso wie die rasche Kinetik darauf hin, daß es sich hier möglicherweise um eine regulatorische Interaktion von SAA mit dem IL-6R handeln könnte

5. 1. 3. Rezeptor-Spezifität des SAA-vermittelten Shedding

Das SAA-induzierte Shedding war selektiv für IL-6R, wohingegen wir für gp130 und L-Selektin sowohl bei Monozyten als auch bei Makrophagen keine Induktion des Shedding durch Stimulation mit SAA beobachten konnten. Dies galt auch für die Stimulation mit den Pentraxinen CRP und PTX3. Diese Rezeptor-Spezifität stellt einen wesentlichen Unterschied zum CRP-induzierten Shedding auf Granulozyten dar, das sowohl für IL-6R [77] als auch für L-Selektin [78] nachgewiesen werden konnte. Insbesondere die Resistenz des eigentlich „Shedding-sensiblen“ L-Selektin gegenüber dem SAA-induzierten Shedding deutet darauf hin, daß dieses möglicherweise eine aktive regulatorische Interaktion mit dem IL-6R darstellt.

Im Hinblick auf das Shedding von gp130 ist zu bemerken, daß wir zwar keine Induktion durch Akut-Phase Proteine, jedoch bei Monozyten einzelner Spender ($n = 3$) ein ausgesprochen hohes spontanes Shedding von sp130 nachweisen konnten. Damit konnte im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen [53] mit transfizierten Zellen ein sgp130-Shedding für Zellen nachgewiesen werden, die gp130 auch *in vivo* exprimieren. Dieses spontane sgp130-Shedding war bei Makrophagen mit 156 pg/ml signifikant höher, als das Shedding von sIL-6R. Analog zum konstitutiven Shedding von sIL-6R setzten zudem Monozyten deutlich mehr sgp130 frei, als die Makrophagen derselben Spender. Bisher ging man allerdings davon aus, daß das Shedding im Vergleich zum alternativen Spleißen einen vernachlässigbar geringen Beitrag zur physiologischen Konzentration von sgp130 im humanen Plasma leistet. Diese Ansicht beruht in erster Linie auf den Daten von Immunopräzipitationsexperimenten mit gp130-transfizierten MDCK-Zellen [53] und COS-Zellen [61], die jedoch keine exakte, sondern lediglich anhand der Bandenstärke eine relative Quantifizierung der sgp130-Freisetzung zulassen. Zudem konnte eine andere Arbeitgruppe demonstrieren, daß die erhöhten sgp130-Spiegel im Serum von Patienten mit HTLV-Infektion primär das Resultat von Shedding und nicht von alternativem Spleißen ist [117]. In Zusammenschau dieser und unserer Resultate erscheint zumindest in Einzelfällen ein quantitativ relevantes Shedding von gp130 *in vivo* möglich.

5. 1. 4. Mechanismus des SAA-induzierten sIL-6R-Shedding

Angesichts der durch uns erstmals nachgewiesenen Induktion des sIL-6R-Shedding durch das inflammatorische Apolipoprotein SAA stellt sich die Frage, über welchen Mechanismus diese Induktion vermittelt wird und worin der funktionelle Unterschied zu den Pentraxinen besteht. Einen möglichen Ansatzpunkt bieten hierbei die mit der APP-Funktion assoziierten unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen. Während beim CRP die Clearance von Immunkomplexen durch unspezifische Bindung von Phosphorylcholin initiiert wird, jedoch ein spezifischer Rezeptor bisher nicht nachgewiesen werden konnte, interagiert SAA auf der Zelloberfläche von Makrophagen mit FPRL-1 [115]. Über diesen Rezeptor vermittelt auch FMLP die Chemotaxis von mononukleären Phagozyten. Die Interaktion des entsprechenden Liganden mit FPRL-1 führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase C. Die zentrale Funktion der Proteinkinase C im Hinblick auf das Shedding von sIL-6R wurde bereits nachgewiesen [58]. In einer früheren Arbeit konnte bereits demonstriert werden, daß FMLP zur Induktion des sIL-6R-Shedding befähigt ist [116]. Interessanterweise wird dieses FMLP-vermittelte Shedding durch Metalloproteaseinhibitoren wie z. B. TAPI gehemmt [116]

Das durch uns gezeigte SAA-vermittelte sIL-6R-Shedding unterlag in Gegenwart von TAPI ebenfalls einer quantitativen Inhibition. Diese quantitative Hemmung läßt darauf schließen, daß es sich um ein Resultat

1. von Ektodomänen-Shedding und
2. eines funktionell Protease-abhängigen Mechanismus handelt.

Im Hinblick auf den Mechanismus des sIL-6R-Shedding ist der Einfluß von Metalloproteasen bereits mehrfach demonstriert worden: So konnten P. Vollmer et. al. [56] eine deutliche Induktion der sIL-6R-Freisetzung durch humane Monozyten in Gegenwart von bakteriellen Metalloproteasen demonstrieren. Die Zelldichte war dabei mit $1,5 \times 10^6$ Zellen der in unserer Arbeit gewählten vergleichbar. Allerdings wurden in den Zellüberständen mit max. 1200 pg/ml signifikant höhere Mengen von sIL-6R detektiert. In Gegenwart von TAPI wurde dieses exogen induzierte Shedding komplett gehemmt, was darauf schließen läßt, daß die bakteriellen Proteasen die Aktivität der endogenen Sheddase imitieren können. Jedoch war TAPI dieser Untersuchung mit 300 μM deutlich höher

konzentriert, als in unserer Arbeit mit 10 µM. Um den Einfluss von Metalloproteasen unter physiologischen Bedingungen zu simulieren, untersuchten Müllberg et. al. [54] neben mit humanisiertem IL-6R transfizierten COS-7- und THP-1-Zellen auch humane Monozyten. Sie konnten ebenfalls eine signifikante Hemmung der PMA-induzierten sIL-6R-Freisetzung durch TAPI zeigen, wohingegen andere Metalloproteaseinhibitoren keinen Effekt hatten. TAPI scheint somit ein spezifischer Inhibitor einer endogenen Metalloprotease zu sein. Eine Identifizierung des physiologischen Aktivators dieser endogenen Sheddase steht jedoch noch aus. Im Gegensatz zu unseren Resultaten mit einer signifikanten Hemmung der SAA-induzierten sIL-6R-Freisetzung in Gegenwart von TAPI konnte bei neutrophilen Granulozyten unter Stimulation mit CRP nur eine partielle Inhibition durch TAPI beobachtet werden [77]. Interessanterweise ist SAA im Vergleich zum CRP zur Induktion der Expression von Matrixmetalloproteasen befähigt [118] [119]. Diese Fähigkeit zur Induktion von Matrixmetalloproteasen scheint dabei mit dem spezifischen Rezeptor FRPL-1 assoziiert zu sein.

Im Konspekt dieser Ergebnisse scheint daher die Interaktion von SAA mit dem spezifischen Rezeptor FRPL-1 eine wesentliche Voraussetzung des SAA-induzierten IL-6R-Shedding darzustellen. Um den spekulativen Charakter dieser Feststellung wissenschaftlich zu untermauern, sind allerdings weiterführende Untersuchungen erforderlich.

5. 1. 5. Abhängigkeit des sIL-6R-Shedding vom Zelltyp

Im Hinblick auf ein mögliches APP-vermitteltes Shedding waren bisher lediglich neutrophile Granulozyten [77] [78], jedoch nicht Monozyten bzw. Makrophagen untersucht worden. Wir konnten erstmals eine SAA-vermittelte Induktion des sIL-6R-Shedding bei humanen Makrophagen zeigen, wohingegen wir bei undifferenzierten Monozyten keine derartige Induktion beobachten konnten. Neben der Induktion des sIL-6R-Shedding unter SAA-Stimulation setzten aber sowohl Monozyten, als auch Makrophagen spontan geringe Mengen von sIL-6R frei. Diese spontane Freisetzung wurde bei beiden Zelltypen in Gegenwart von TAPI nahezu komplett gehemmt, was auf einen Protease-abhängiges Shedding hinweist. Im Gegensatz zur bekannten Datenlage [70] [71] wurde jedoch das bei uns ebenfalls nachweisbare spontane Shedding von sL-Selektin nicht durch TAPI gehemmt.

Dies galt gleichermaßen für Monozyten, wie auch für Makrophagen. Interessanterweise setzten Monozyten zudem spontan signifikant mehr sIL-6R (MW 243 +/- 32 pg/ml) frei, als Makrophagen (MW 117 +/- 18 pg/ml) derselben Spender. Eine solche Zell-Typ-Abhängigkeit konnten wir jedoch für das Shedding von sL-Selektin nicht beobachten (MW Monozyten: 23 +/- 1,06 ng/ml, MW Makrophagen: 22 +/- 0,87 ng/ml). Vor dem Hintergrund, daß es im Rahmen der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen zu einer deutlichen Zunahme der Expression von IL-6R kommt [120], geben unsere Ergebnisse einen ersten Hinweis darauf, daß das SAA-vermittelte Shedding eine Makrophagen-spezifische regulatorische Interaktion mit dem IL-6-Rezeptor darstellen könnte.

5. 2. Mögliche pathophysiologische Implikationen

Differenzierte Makrophagen spielen insbesondere bei der chronischen Inflammation eine zentrale Rolle. Wir konnten mit dem erstmaligen Nachweis einer differentiellen Induktion des sIL-6R-Shedding durch das lipid-artige Akut-Phase Protein SAA bei humanen Monozyten-abgeleiteten Makrophagen einen Hinweis für die Existenz einer reziproken Regulation von APP mit dem IL-6-System erbringen. Im Folgenden soll daher am Beispiel typisch chronisch-inflammatorischer Krankheitsbilder, wie sie die Rheumatoide Arthritis (RA) und die Atherosklerose repräsentieren, die potenzielle pathogenetische Bedeutung der SAA-vermittelten reziproken Aktivierung des IL-6-Systems erläutert werden.

5. 2. 1. Lokale SAA-Überexpression in der Rheumatoiden Arthritis

Mehrere Untersuchungen haben bereits nachgewiesen, daß Synoviozyten von RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant mehr SAA exprimieren [121] [122]. Immunhistochemisch zeigte sich dabei eine räumliche Assoziation der SAA-Überexpression zur lokalen Makrophagen-Akkumulation im synovialen Gewebe. Diese nachbarschaftliche Beziehung läßt sich möglicherweise auf die chemotaktischen Eigenschaften von SAA zurückführen [114] [115]. Gleichzeitig korreliert die sIL-6R-Konzentration im arthritisch-entzündlich veränderten Gewebe mit dem Maß an leukozytärem Influx [123], ohne daß bisher die eigentliche zelluläre Quelle für sIL-6R

identifiziert werden konnte. Hier stellt die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene SAA-vermittelte Induktion des sIL-6R-Shedding bei Makrophagen ein spekulatives funktionelles Bindeglied dar. Durch Transsignalling ermöglicht sIL-6R die Aktivierung und Proliferation von synovialen Fibroblasten [34] als ersten Schritt der Zerstörung von Gelenkstrukturen. Diese zentrale pathogenetische Rolle von Transsignalling wird zumindest im experimentellen Modell durch die Hemmung der Krankheitsaktivität in Gegenwart von sgp130 bestätigt [33]. Interessanter Weise finden sich in Korrelation mit der Krankheitsaktivität im Serum von an RA erkrankter Patienten vermehrt Autoantikörper gegen sgp130, das bei diesen Patienten in der C-terminalen Aminosäuresequenz verändert ist und somit als spezifisches Autoantigen fungiert [124]. Dieses veränderte aber funktionale sgp130 wird verstärkt durch RA-Synoviozyten nach Stimulation mit IL-6/sIL-6R exprimiert. Die zirkulierenden Autoantikörper neutralisieren jedoch die inhibitorische Aktivität im Hinblick auf Transsignalling [124], was einen Verlust der Autoregulation des Entzündungsgeschehens bedeuten könnte. Aus diesem spekulativen Pathomechanismus ergibt sich die demnach mit der Substitution von funktionellem sgp130 ein neuer, bisher noch nicht untersuchter therapeutischer Ansatz.

5. 2. 2. Atherosklerose als chronische Entzündung

Im Rahmen der mittlerweile anerkannten Modellvorstellung der Atherosklerose als chronischer Entzündung stellen bereits mäßig erhöhte Serumkonzentrationen von CRP und SAA neben den klassischen Risikofaktoren eigenständige prognostisch ungünstige Faktoren für die koronare Herzerkrankung als Hauptmanifestation der Atherosklerose dar [125]. SAA unterscheidet sich in einem wesentlichen Punkt von anderen Akut-Phase-Proteinen, wie etwa den Pentraxinen: Als entzündliches Apolipoprotein ersetzt es während der Akut-Phase Reaktion Apo AI im HDL-Partikel und verbindet damit Inflammation und Lipidmetabolismus. Regelmäßiges HDL ist ein protektiver Faktor bei der Atherogenese. Durch den Verlust dieses protektiven Effekts ist SAA mit der Atherosklerose kausal assoziiert [126]. Der initiale Schritt zur Entstehung eines atherosklerotischen Plaques ist die Ablagerung von oxidiertem LDL bzw. enzymatisch degradiertem LDL (E-LDL) in der Gefäßintima mit konsekutiver endothelialer Dysfunktion. Das dysfunktionale Endothel exprimiert ein verändertes Muster von Adhäsionsmolekülen sowie Chemokinen, was zu einer verstärkten Migration von Monozyten und T-Lymphozyten in das betroffene Areal

führt [127]. Unter dem Einfluss von inkorporiertem E-LDL erfahren die Makrophagen eine aberrante Differenzierung zu Schaumzellen [128]. Zudem sezernieren sie verstärkt chemotaktische Faktoren, die eine weitere unkontrollierte Invasion von Monozyten fördern [129]. Gleichzeitig kommt es auch zu einer Aktivierung und Proliferation der benachbarten glatten Muskelzellen [128]. Diese exprimieren in Gegenwart von E-LDL verstärkt gp130 sowie IL-6 und werden damit für Transsignalling durch den IL-6/sIL-6R-Komplex responsiv [47] [129]. Immunhistochemisch konnte sowohl im Mausmodell [130] als auch in humanen Biopsaten [131] eine SAA-Akkumulation in atherosklerotischen Läsionen gezeigt werden. Möglicher Weise stellt somit die lokale Generierung von sIL-6R durch SAA-induziertes Shedding einen pathogenetischen Faktor im Wandel der atherosklerotischen Läsion von der reinen Lipidakkumulation hin zur chronischen Inflammation dar.

Abschließend läßt sich festhalten, daß das SAA als neu identifizierter endogener Aktivator des IL-6R-Shedding einen möglichen klinisch relevanten Teilaspekt in der Pathogenese chronisch entzündlich-proliferativer Krankheitsbilder darstellt, und es deshalb einer weiteren Aufklärung seiner Funktion und Einbindung in inflammatorische Signalkaskaden wie das IL-6-System bedarf, um in Zukunft spezifische therapeutische Instrumente entwickeln zu können.

6. ZUSAMMENFASSUNG

IL-6 ist der Hauptinduktor sowohl der hepatischen als auch der extrahepatischen Akut-Phase Proteine (APP). Im Hinblick auf die IL-6-vermittelte Regulation der Akut-Phase Reaktion ist allerdings die mögliche reziproke Interaktion von Akut-Phase Proteinen mit der IL-6-Signalkaskade als zentraler Aspekt bisher nicht untersucht worden. Ein entscheidender Unterschied des IL-6 im Vergleich zu anderen Zytokinen ist die agonistische Aktivität löslicher IL-6-Rezeptoren (sIL-6R), wodurch dem IL-6-Signal eine potenziell systemische Responsivität eröffnet wird. Ein Mechanismus der Generierung von sIL-6R ist das Shedding, d. h. die proteolytische Abspaltung der Rezeptor-Ektodomäne von der Zelloberfläche. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals eine systematische *in vitro*-Analyse an humanen Monozyten und Makrophagen zum Nachweis eines APP-induzierten Shedding des sIL-6R durchgeführt.

Hierbei zeigte sich erstaunlicher Weise eine signifikante Induktion des sIL-6R-Shedding durch das inflammatorische Apolipoprotein SAA, wohingegen die Pentraxine CRP und PTX3 keinen derartigen Effekt hatten. Die SAA-vermittelte Induktion erfolgte in der für die akute Inflammation repräsentativen Konzentration von 50 µg/ml. Im Gegensatz zu differenzierten Makrophagen waren Monozyten nicht von der Induktion betroffen. Neben dieser Zellspezifität wurde außerdem der Nachweis einer Rezeptorspezifität erbracht, da durch SAA selektiv das Shedding des sIL-6R induziert wurde. Weder das ubiquitär exprimierte gp130, noch das Leukozytenadhäsionsmolekül L-Selektin zeigten sich diesbezüglich SAA-responsiv. Zudem deutet die signifikante Hemmung des SAA-induzierten Shedding von sIL-6R in Gegenwart des Metalloprotease-Inhibitors TAPI auf einen funktionell Protease-abhängigen Mechanismus hin.

Angesichts dieser Resultate stellt das SAA als neu identifizierter endogener Aktivator des IL-6R-Shedding einen möglichen klinisch relevanten Aspekt in der Pathogenese entzündlicher Prozesse dar. Es bedarf daher einer weiteren Aufklärung seiner Funktion und Einbindung in inflammatorische Signalkaskaden wie des IL-6-Systems, um zukünftig spezifische therapeutische Instrumente entwickeln zu können.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

in alphabetischer Reihenfolge

a:	Irrtumswahrscheinlichkeit
ACE:	Angiotensin Converting Enzyme
ADAM:	Proteasen aus der Familie "A Disintegrin and Metalloprotease Domain"
Apo AI:	Apolipoprotein AI
APP:	Akut-Phase Protein(e)
APRF:	Acute Phase Response Factor (syn. STAT3)
AS:	Aminosäuren
BOX1/2:	Sequenzelemente der zytoplasmatischen gp130-Domäne
BSA:	Bovine Serum Albumin
BSG:	Blut-Senkungs-Geschwindigkeit
Ca²⁺:	2-fach positiv geladenes Kalzium-Ion
Cal:	Calmodulin
CD126:	Cluster of Differentiation 126
CLC:	Cardiotrophin-like Cytokine (syn. NNT1, BSF3)
CNTF:	Ciliaric Neurotrophic Factor
C1q:	Komplementkomponente 1q
CRP:	C-reaktives Protein (syn. PTX1)
CT-1:	Cardiotrophin 1
DMEM:	Dulbecco`s modified eagles medium
DMSO:	Dimehylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DS-sIL-6R:	Diffential Splicing soluble Interleukin 6 Receptor
ELISA:	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
ER:	Endoplasmatisches Retikulum
ERM:	Ezrin, Radixin, Moesin
FMLP:	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin

FPRL-1: Formyl peptide receptor-like 1 (syn. Lipoxin A4-Rezeptor)

Gp80: Glykoprotein 80 (syn. IL-6R)

Gp130 : Glykoprotein 130

HDL: High Density Lipoprotein

Ig: Immunglobulin

IL-1: Interleukin 1

IL-1 β : Interleukin 1 β

IL-2: Interleukin 2

IL-4: Interleukin 4

IL-6: Interleukin-6

IL-6R: membranständiger Interleukin-6 Rezeptor (syn. gp80, CD126)

IL-6RE: Interleukin-6 Response Element

IL-8: Interleukin 8

IL-11: Interleukin 11

IL-27: Interleukin 27

ITF γ : Interferon γ

JAK: Janus Kinase

K_{dis}: Dissoziationskonstante

LIF: Leukemia Inhibitory Factor

LIF-R: Leukemia Inhibitory Factor Receptor

LPS: Lipopolysaccharid

M: Konzentrationsangabe für “Molar” (entspricht 1 mol/l)

M-CSF: Macrophage-Colony Stimulating Factor

mRNA: Boten (messenger)-Ribonukleinsäure

MW: Mittelwert

µg:	Mikrogramm (= 10^{-6} Gramm)
n:	Stichprobenumfang
ng:	Nanogramm (= 10^{-9} Gramm)
NNT1:	Novel Neurotrophin 1
OSM:	Oncostatin M
P:	Phosphatrest
PBS:	Phosphat buffered saline
PC:	Phosphorylcholin
PC-sIL-6R:	Proteolytic Cleavage soluble Interleukin 6 Receptor
PDGF:	Platelet-derived Growth Factor
pg:	Pikogramm (= 10^{-12} Gramm)
PMA:	Phorbol-Myristat-Azetat
PTX1:	Pentraxin-1 (syn. CRP)
PTX3:	Pentraxin-3
P-Tyr:	phosphorylierter Tyrosylrest
r:	Pearson`scher Korrelationskoeffizient
RA:	Rheumatoide Arthritis
SAA:	Serum-Amyloid A
SAP:	Serum Ayloid-P Component
sIL-6R:	löslicher (soluble) Interleukin-6 Rezeptor
sL-Selektin:	lösliches L-Selektin
STAT:	Signal Transducers and Activators of Transcription
TACE:	TNF α Converting Enzyme (syn. ADAM-17)
TGFβ:	Transforming Growth Factor β
TMD:	Transmembrandomäne
TNFα:	Tumor Necrosis Factor α
UE:	Untereinheiten

8. LITERATURVERZEICHNIS

[01]: **Gabay C., Kushner I.:**

Acute-phase proteins and other systemic response to inflammation.

N. Engl. J. Med. 1999, 340: 448-454

[02]: **Morley J. J., Kushner I.:**

Serum C-reactive protein levels in disease.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 1982, 389: 406-418

[03]: **Jones S. A.:**

Directing Transition from innate to acquired immunity: Defining a role for IL-6.

J. Immunol. 2005, 175: 3463-3468

[04]: **Gauldie J., Richard C., Harnish D., Landsorp P., Baumann H.:**

Interferon β 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987, 84: 7251-7255

[05]: **Hurst S. M., Wilkinson T. S., McLoughlin R. M., Jones S., Horiuchi S., Yamamoto S., Rose-John S., Fuller M., Topley N., Jones S. A.:**

Control of leukocyte infiltration during inflammation: IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment.

Immunity 2001, 14: 705-714

[06]: **McLoughlin R. M., Witowski J., Robson R. L., Wilkinson T. S., Hurst S. M., Williams A. S., Williams J. D., Rose-John S., Jones S. A., Topley N.:**

Interplay between IFN- γ and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and Apoptosis during acute inflammation.

J. Clin. Invest. 2003, 112: 598-607

- [07]: **Muraguchi A., Kishimoto T., Miki Y., Kuritani T., Kaieda T., Yoshizaki K., Yamamura Y.:**
T-cell replacing factor (TRF)-induced IgG secretion in human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF.
J. Immunol. 1981, 127: 412-416
- [08]: **Hirano T., Naajima K., Hibi M.:**
Signalling mechanism through gp 130: a model of the cytokine system.
Cytokine and Growth Factor Review 1997, 8: 241-252
- [09]: **Murakami M., Kamimura D., Hirano T.:**
New IL-6 (gp130) family cytokine members, CLC/NNT1/BSF3 and IL-27.
Growth Factors 2004; 22: 75-77
- [10]: **Kushner I.:**
Regulation of the acute phase response by cytokines.
Perspect. Biol. Med. 1993, 36: 611-622
- [11]: **Jiang S.-L., Samols C., Rzwenicki D.:**
Kinetic modeling and mathematical analysis indicate that acute phase gene expression in Hep3B-cells is regulated by both transcriptional and posttranscriptional mechanisms.
J. Clin. Invest. 1995, 95: 1253-1261
- [12]: **Van Dijk W., Mackiewicz A.:**
Interleukin 6-type cytokine-induced changes in acute-phase protein glycosylation.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 1995; 762: 319-330
- [13]: **Fattoni E., Cappelletti M., Costa P.:**
Defective inflammatory response in interleukin-6 deficient mice.
J. Exp. Med. 1994, 180: 1243-1250
- [14]: **Zheng H., Fletcher D., Kozak W.:**
Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in Interleukin 1 β -deficient mice;

Immunity 1995, 3: 9-19

- [15]: **Chomarat P., Banchereau J., Davoust J., Palucka A. K.** :
IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages.
Nat. Immunol. 2000, 1: 510-514
- [16]: **Taga T., Kishimoto T.:**
Gp 130 and the interleukin-6 family of cytokines.
Ann. Rev. Immunol. 1997, 15: 797-819
- [17]: **Yamasaki K., Taga T., Hirata Y., Yawata H., Kawanishi Y., Seed B., Tamiguchi T., Hirano T., Kishimoto T.:**
Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN-beta-2) receptor.
Science 1988, 241: 825-828
- [18]: **Saito M., Yoshida K., Hibi M., Taga T., Kishimoto T.:**
Molecular cloning of a murine IL-6 receptor associated signal transducer gp130,
and its regulated expression in vivo.
J. Immunol. 1992, 148: 4066-4071
- [19]: **Rose-John S.:**
Interleukin-6 biology is coordinated by membrane bound and soluble receptors.
Acta Biochimica Polonica 2003, 50: 603-611
- [20]: **Kluck P. M. C., Wiegant J., Jansen R. P. M., Bolk M. W. J., Raap A. K., Willemze R., Landegent J. E.:**
The human interleukin-6 receptor alpha-chain gene is localized on chromosome 1 band q21.
Hum. Genet. 1993, 90: 542-544
- [21]: **Gearing D P., Comeau M. R., Friend D. J., Gimpel C. D., Thut C. J., Mc Gourty J., Brasher K. K., King J. A., Gillis S., Mosley B.:**
The IL-6 signal transducer gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for

the LIF receptor.

Science 1992, 255: 1434-1437

- [22]: **Moritz R. L., Ward L. D., Tu G. F., Fabri L. J., Ji H., Yasukawa K., Simpson R. J.:**

The N-Terminus of gp130 is critical for the formation of the high-affinity interleukin-6 receptor complex.

Growth Factors 1999, 16: 265-278

- [23]: **Narazaki M., Witthuhn B. A., Yoshida K.:**

Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp 130.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91: 2285-2289

- [24]: **Löffler G.:**

Basiswissen Biochemie.

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, N. Y. 1998

- [25]: **Rose-John S.:**

Interleukin-6 biology is coordinated by membrane bound and soluble receptors.

Acta Biochimica Polonica 2003, 50: 603-611

- [26]: **Rose-John S., Heinrich P. C.:**

Soluble receptors for cytokines and growth factors: their generation and biological function.

Biochem. J. 1994, 300: 281-290

- [27]: **Müllberg J., Schooltink H., Stoyan T., Gunther M., Greave L., Buse G., Mackiewicz A., Heinrich P. C., Rose-John S.:**

The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding.

Eur. J. Immunol. 1993, 23: 473-480

- [29]: **Narazaki M., Yasukawa K., Saito T., Oshugi Y., Fukui H., Koishikara Y., Yancopoulos G., Taga T., Kishimoto T.:**

Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing component gp 130 in human

serum posessing a potential to inhibit signals through membran-anchored gp 130.
Blood 1993, 82: 1120-1126

[30]: **Jostock T., Müllberg J., Özbeck S., Atreya R., Blinn G., Voltz N., Fischer M., Neurath M., Rose-John S.:**

Soluble gp 130 is the natural inhibitor of soluble IL-6R transsignalling responses.
Eur. J. Biochem. 2001, 268: 160-167

[31]: **Atreya R., Mudter J., Finotto S., Müllberg J., Jostock T.:**

Blockade of IL-6- transsignalling abrogates established experimental colitis in mice by suppression of the antiapoptotic resistance of lamina propria T-cells.

Nature Med. 2000, 6: 583-588

[32]: **Murakami-Mori K.-T., Taga T., Kishimoto T., Nakamura S.:**

The soluble form of the IL 6-receptor (sIL 6-R α) is a potent growth factor for AIDS-associated Kaposi's sarcoma cells; the soluble form of gp 130 is antagonistic for sIL 6R induced AIDS-KS cell growth.

Int. Immunol. 1996, 8: 595-600

[33]: **Nowell M. A., Richards P. J., Horiuchi S., Yamamoto N., Rose-John S., Topley N., Williams A. S., Jones S. A.:**

Soluble IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130.

J. Immunol. 2003, 171: 3202-3209

[34]: **Romano M., Sironi M., Toniatti C., Polentarutti N., Fruscella P., Ghezzi P., Faggioni R., Luini W., Van Hinsbergh V., Sozzani S., Bussolino F., Poli V., Ciliberto G., Mantovani A.:**

Role of IL 6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment.

Immunity 1997, 6: 315-325

[35]: **Mihara M., Moriya Y., Kishimoto T., Olsugi Y.:**

Interleukin 6 induces the proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of

soluble IL 6-receptor.

Br. J. Rheumatol. 1995, 34: 321-325

- [36]: **Peters H., Schirmacher P., Goldschmitt J., Odenthal M., Peschel C., Dienes H. P., Fattori E., Ciliberto E., Meyer Z., Buschenfelde K. H., Rose-John S.:**
Extramedullary expansion of Haematopoietic progenitor cells in sIL-6R/IL-6 double transgenic mice.
J. Exp. Med. 1997, 185: 755-766

- [37]: **Schirmacher P., Peters M., Ciliberto G., Blessing M., Lotz J., Meyer zum Buschenfelde K.-H., Rose-John S.:**
Hepatocellular hyperplasia, plasmacytoma formation and extramedullary hematopoiesis in interleukin (IL)-6/soluble IL-6 receptor double transgenic mice.
Am. J. Path. 1998, 153: 639-648

- [38]: **Hirota H., Yoshida K., Kishimoto T., Taga T.:**
Continous activation of gp 130, a signal transducing receptor component for IL 6-related cytokines causes myocardial hypertrophy in mice.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92: 4863-4866

- [39]: **Klouche M., Bhakdi S., Hemmes M., Rose-John S.:**
Novel path of activation of primary smooth muscle cells: upregulation of gp 130 creates an autocrine activation loop by IL-6 and its soluble receptor.
J. Immunol. 1999, 163: 4583-4589

- [40]: **Maione D., Di Carlo E., Li W., Musiani P., Modesti P., Peters M., Rose-John S., Della Rocca C., Tripodi M., Lazzaro D., Taub R., Savino R., Ciliberto G.:**
Coexpression of Il-6 and soluble IL-6R causes nodular regenerative hyperplasia and adenoma of the liver;
EMBO J. 1998, 17:5588-5597

- [41]: **Rose-John S.:**
Gp 130 stimulation and the maintenance of stem cells.
Trends Bio techn. 2002, 20: 417-419

- [42]: **März P., Otten U., Rose-John S.:**
Neuronal activities of IL 6-type cytokines often depend on soluble cytokine receptors.
Eur. J. Neursci. 1999, 11: 2995-3004
- [43]: **Mackiewicz A., Shooltink H., Heinrich P. C., Rose-John S.:**
Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins.
J. Immunol. 1992, 149: 2021-2027
- [44]: **Peters H., Odenthal M., Schirmacher P., Blessing M., Fattori E. Ciliberto G., Meyer zum Buschenfelde K.-H., Rose-John S.:**
Soluble IL-6 receptor leads to a paracrine modulation of IL-6-induced hepatic acute phase response in double transgenic mice.
J. Immunol. 1997, 159: 1474-1481
- [45]: **Xing Z., Gauldie J., Cox G., Baumann H., Jordana M., Lei X.-F., Achong M. K.:**
IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses.
J. Clin. Invest. 1989, 101: 311-320
- [46]: **Modur V., Li Y., Zimmerman G. A., Prescott S. M., McIntyre T. M.:**
Retrograde inflammatory signalling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor α .
J. Clinic. Invest. 1997, 100: 2752-2756
- [47]: **Jones S. A., Horiuchi S., Topley N., Yamamoto N., Fuller G. M.:**
The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease.
The FASEB J. 2001, 15: 43-58
- [48]: **Horiuchi S., Koyanagi Y., Zhao Y., Miyaoto H., Tanaka Y., Waki M., Matsumoto A., Yammamoto M., Yammamoto N.:**
Soluble interleukin-6 receptors released from T- cells or granulocyte/macrophage cell

lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism.

Eur. J. Immunol. 1994, 24: 1945-1948

[49]: **Lust J. A. K., Donovan K. A., Kline M. P., Griepp P. R., Kyle R. A., Maihle N. J.:**
Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor.

Cytokine 1992, 4: 96-100

[50]: **Cichy J., Rose-John S., Potempa J., Pryjma J., Travis J.:**
Oncostatin-M stimulates the expression and release of the IL-6 receptor in human hepatoma Hep2G-cells.

J. Immunol. 1997, 159: 5648-5653

[51]: **Jones S. A., Horiuchi S., Novick D., Yamamoto N., Fuller G. M.:**
Shedding of the soluble IL-6 receptor is triggered by Ca²⁺ mobilization, while basal release is predominantly the product of differential mRNA splicing by TPH-1 cells.

Europ. J. Immunol. 1998, 11: 3514-3522

[52]: **Geisterfer M., Richards C. D., Gauldie J.:**
Cytokines oncostatin M and interleukin-1 regulate expression of the IL-6-receptor (gp80) (gp130).
Cytokine 1995, 7: 503-509

[53]: **Müllberg J., Dittrich E., Graeve L., Gerhartz C., Yasukawa K., Taga T., Kishimoto T., Heinrich P. C., Rose-John S.:**
Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor.
FEBS 1993, 332: 174-178

[54]: **Müllberg J., Durie F. H., Otten-Evans C., Alderson M. R., Rose-John S., Cosman D., Black R. A., Mohler K. M.:**
A metalloprotease-inhibitor blocks shedding of the interleukin-6 receptor and the p60 TNF receptor.
J. Immunol. 1995, 155: 5198-5205

- [55]: **Hargreaves P. G., Wang F., Antcliff J., Murphy G. Lawry J, Russell R. G. G., Croucher P. I.,**:
Human myeloma cells shed the interleukin-6 receptor: inhibition by tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and hydroxamate-based metalloproteinase-inhibitor.
Haematol. 1998, 101: 694-702
- [56]: **Vollmer P., Walev I., Rose-John S., Bhakdi S..**
Novel pathogenic mechanism of microbial metalloproteinases: liberation of membrane-anchored molecules in biologically active form exemplified by studies with the human interleukin-6 receptor.
Infect. Immun. 1996, 64: 3646-3651
- [57]: **Walev I., Vollmer P., Palmer M., Bhakdi S., Rose-John S.:**
Pore-forming toxins trigger shedding of receptors for interleukin-6 and Lipopolysaccharide.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93: 7882-7887
- [58]: **Müllberg J., Schooltink H., Stoyan T., Heinrich P. C., Rose-John S.:**
Protein kinase C is rate limiting for the shedding of the interleukin-6 receptor.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992, 189: 794-800
- [59]: **Müllberg J., Oberthur W., Lottspeich F., Mehl E., Dittrich E., Graeve L., Heinrich P. C., Rose-John S.:**
The soluble human IL 6-receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site.
J. Immunol. 1994, 152: 4958-4968
- [60]: **Matthews V., Schuster B., Schütze S., Bussmeyer I., Lugwig A., Hundhausen C., Sadowski T., Saftig P., Hartmann D., Kallen K.-J., Rose-John S.:**
Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE).
J. Biol. Chem. 2003, 278: 38829-38839

- [61]: **Althoff K., Müllberg J., Aasland D., Voltz N., Kallen K.-J., Grötzing J., Rose-John S.:**
Recognition elements and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins.
Biochem. J. 2001, 353: 636-672
- [62]: **Schleiffenbaum B., Spertini O., Tedder T. F.:**
Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity.
J. Cell Biol. 1992, 119: 229-238
- [63]: **Kahn J., Ingraham R. H., Shirley F., Migaki G. I., Kishimoto T.:**
Membrane proximal cleavage of L-selectin: identification of the cleavage site and a 6-kDa transmembrane peptide fragment of L-selectin.
J. Cell Biol. 1994, 125: 461-470
- [64]: **Kaba N. K., Knauf P. A.:**
Hypotonicity induces L-selectin shedding in human neutrophils.
Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2001, 281: C1403-C1407
- [65]: **Rizoli S. B., Rotstein O. D., Kapus A.:**
Cell volume-dependent regulation of L-Selectin-shedding in neutrophils: a role for p38 mitogen-activated protein kinase.
J. Biol. Chem. 1999, 274: 22072-22080
- [66]: **Frey M., Appenheimer M. M., Evans S. S.:**
Tyrosine kinase-dependent regulation of L-Selectin expression through the Leu-13 signal transduction molecule: evidence for a protein kinase C-independent mechanism of L-selectin shedding.
J. Immunol. 1997, 158: 5424-5434
- [67]: **Kaba N. K., Knauf P. A.:**
Hypotonicity induces L-selectin shedding in human neutrophils.
Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2001, 281: C1403-C1407

[68]: **Rizoli S. B., Rotstein O. D., Kapus A.:**

Cell volume-dependent regulation of L-Selectin-shedding in neutrophils: a role for p38 mitogen-activated protein kinase.

J. Biol. Chem. 1999, 274: 22072-22080

[69]: **Frey M., Appenheimer M. M., Evans S. S.:**

Tyrosine kinase-dependent regulation of L-Selectin expression through the Leu-13 signal transduction molecule: evidence for a protein kinase C-independent mechanism of L-selectin shedding.

J. Immunol. 1997, 158: 5424-5434

[70]: **Arribas J., Coodly P., Vollmer P., Kishimoto T. K., Rose-John S., Massague J.:**

Diverse cell surface ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease Inhibitors.

J. Biol. Chem. 1996, 271: 11376-11382

[71]: **Bennett T. A., Lynam E. B., Sklar L. A., Rogelji S.:**

Hydroxamate-based metallo-protease inhibitor blocks shedding of L-selectin adhesion molecule from leukocytes: functional consequences for neutrophil aggregation.

J. Immunol. 1996, 156: 3093-3097

[72]: **Ivetic A., Ridley A. J.:**

The telling tail of L-Selectin.

Biochem. Soc. Trans. 2004, 32: 1118-1121

[73]: **Kotake S., Sato K., Kim K. J., Takahashi N., Udagawa N., Nakamura I.,**

Yamaguchi A., Kishimoto T., Suda T., Kashiwazaki S.:

Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation.

J. Bone Miner. Res. 1996, 11: 88-95

[74]: **Hosokawa T., Kusagami K., Ina K., Ando T., Shinoda M., Imada A., Oshuga M., Sakai T., Matsuura T., Ho K., Kaneshiro K.:**

Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in the colonic mucosa of inflammatory bowel disease.

J. Gastrenterol. Hepatol. 1999, 14: 987-996

[75]: **Kyrtsonis M. C., Dedoussis G., Zervas C., Perifanis V., Baxevanis C., Stamatelou M., Maniatis A.:**

Soluble interleukin-6 receptor, a prognostic factor in Multiple Myeloma.

Br. J. Haematol. 1996, 93: 398-400

[76]: **Honda M., Yamamoto S., Cheng M., Yasukawa K., Suzuki H., Saito T., Osugi Y., Tokunaga T., Kishimoto T.:** Human soluble interleukin-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection.

J. Immunol. 1992, 148: 2145-2180

[77]: **Jones S. A., Novick D., Horiuchi S., Yammamoto N., Szalai A. J., Fuller G. M.:** C-reactive protein: A physiological activator of Interleukin 6 receptor shedding.

J. Exp. Med. 1999, 189: 599-604

[78]: **Zouki C., Beauchamp M., Baron C., Filep J. G.:**

Prevention of in vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-Selectin by CRP and peptides derived from CRP.

J. Clinic. Invest. 1997, 100: 522-529

[79]: **Tillet F. S., Francis T. Jr.:**

Serological reactions in pneumonia with non-protein somatic fraction of Pneumococcus.

J. Exp. Med. 1930, 52: 561-571

[80]: **Pepys M. B.:**

The acute-phase response and C-reactive Protein.

The Oxford Text- book of Medicine 1996, 2: 1527-1533

[81]: **Thompson D., Pepys M. B., Wood S. P.:**

“Human C-reactive Protein complexed with phosphocholine”

The Protein Data Bank 1B09

- [82]: **Agrawal A., Yuanayuan X., Ansardi D., Macon K., Volanais J. E.:**
Probing the phosphocholine-binding site of human C-reactive Protein by site directed Mutagenesis.
J. Biol. Chem. 1992, 267: 25352-25358
- [83]: **Thompson D., Pepys M. B., Wood S. P.:**
The physiological structure of human C-reactive Protein and its complex with Phosphocholin.
Structure Fold Des. 1999, 7: 169-177
- [84]: **Ballou S. P., Lozanski G.:**
Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein.
Cytokine 1992, 4: 361-268
- [85]: **Du Clos T. W.:**
Function of C-reactive Protein.
Ann. Med. 2000, 32: 274
- [86]: **Filep J., Foldes-Filep E.:**
Effects of C-reactive protein on human neutrophil granulocytes challenged with N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine and platelet activating factor.
Life Sci. 1989, 44: 517-524
- [87]: **Breviario F., d' Aniello E. M., Golay J., Peri G., Bottazi B., Bairoch A., Saccone S., Marzella R., Predazzi V., Rocchi M. et al.:**
Interleukin 1-inducible genes in endothelial cells: cloning of a new gene related to C-reactive Protein and serum amyloid P component.
J. Biol. Chem. 1992, 267 : 22190-22197
- [88]: **Lee G. W., Lee T. H., Vilcek J.:**
TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein is a novel member of the

pentraxin family of acute phase proteins.

J. Immunol. 1993, 150: 1804-18812

[89]: **Lee G. W., Goodman A. R., Lee T. H., Vilcek J.:**

Relationship of TSG-14 protein to the pentraxin family pf major acute phase proteins.

J. Immunol. 1994, 153: 3700-3707

[90]: **Peri G., Introna M., Corradi D., Iacuiti G., Signorini S., Avazini F., Pizzetti F.:**

PTX 3, a prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans.

Circulation 2000, 102 : 636-647

[91]: **Shrive A. K., Metcalfe A. M., Cartwright J. R., Greenhough J. T.:**

C-reactive Protein and SAP-like Protein are both present in *Limulus polyphemus* haemolymph: crystal structure of Limulus SAP.

J. Mol. Biol. 1999, 290: 997-1008

[92]: **Alles V. V., Bottazzi B., Peri G., Golay J., Introna M., Mantovani A.:**

Inducible expression of PTX 3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes.

Blood 1994, 84: 3483-3493

[93]: **Bottazzi B., Vouret-Craviari V., Bastone A., De Gioia L., Matteucci C., Peri G.,**

Spreafico F., Pausa M., D'Ettorre C., Gianazza E., Tagliabue A., Salmona M.,

Tedesco F., Introna M., Mantovani A.:

Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX 3.

J. Bio. Chem. 1997, 272: 32817

[94]: **Klouche M., Peri G., Knabbe C., Eckstein H. H., Schmid F.-X., Schmitz G.,**

Mantovani A.:

Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells.

Atherosclerosis 2004, 175: 221-228

- [95] **Klouche M., Brockmeyer N., Knabbe C., Rose-John S.:**
Human Herpesvirus 8-derived IL-6 induces PTX3 expression in Kaposi´s sarcoma cells.
AIDS 2002, 16: 1-10
- [96]: **Loyer P., Ilyin G., Abdel Razzak Z.:**
Interleukin-4 inhibits the production of some acute phase proteins by human hepatocytes in primary culture.
FEBS Lett. 1993, 336: 215-220
- [97]: **Polentarutti N., Picardi G., Basile A., Cenzualles S., Rivolta A., Motteucci C., Peri G., Mantovani A., Introna M.:**
Interferon γ inhibits the expression of the long pentraxin PTX 3 in human monocytes.
Eur. J. Immunol. 1998, 28: 496-501
- [98]: **Rovere P., Peri G., Bottazzi B., Doni A., Bondanza A., Zimmermann V. S., Garland C., Fascio U., Sabbadini M. G., Rugarli C., Mantovani A., Manfredi A.:**
The long pentraxin PTX 3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells.
Blood 2000, 96: 4300-4306
- [99]: **Jensen L. E., Hiney M. P., Shields D. C., Uhlar C. M., Lindsay A. J., Whitehead A. S.:**
Acute phase proteins in salmonids: evolutionary analysis and acute phase response.
J. Immunol. 1997, 158: 384-392
- [100]: **Cabana V. G., Feng N., Reardon C. A., Lukkens J., Webb N. R., DeBeer F. C., Getz G. S.:**
Influence of ApoA I and ApoE on the formation of serum amyloid A-containing lipoproteins in vivo and in vitro.
J. Lipid Res. 2004, 45: 317-325
- [101]: **Husebekk A., Skogen B., Husby G.:**
Characterization of amyloid proteins AA and SAA as apolipoproteins of HDL.
Displacement of SAA from the HDL-SAA by ApoAI and ApoAII.

Scand. J. Immunol. 1987, 25: 375-381

[102]: **Kisilevsky R., Subrahmanyam L.:**

Serum amyloid A changes high density lipoproteins cellular affinity:
a clue to serum amyloid A's principal function.

Lab. Invest. 1992, 66: 778-785

[103]: **Meek R. L., Eriksen N., Benditt E. P.:**

Murine serum amyloid A3 is a high density apolipoprotein and is secreted by
Macrophages.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1992, 89: 7949-7952

[104]: **Patel H., Bramall J., Waters H., DeBeer M. C., Woo P.:**

Expression of recombinant human SAA in mammalian cells and demonstration of
the region necessary for HDL binding and Amyloid fibril formation by site-directed
mutagenesis.

Biochem. J. 1996, 318: 1041-1049

[105]: **Sipe J. D. and Committee:**

Revised nomenclature for serum-amyloid-A (SAA).

Int. J. Exp. Clinic. Invest. 1999, 6: 67-69

[106]: **Cellar G. C., Jordan S. A., Bickmore W. A., Van Fantes J. A., Heyning V.,
Whitehead A. S.:**

The human serum amyloid A protein (SAA) superfamily gene cluster: mapping to
chromosome 11p15.1 by physical and genetic linkage analysis.

Genomics 1994, 19: 221-227

[107]: **Urieli-Shoval S., Meek R. L., Hanson R. H., Eriksen N., Benditt E. P.:**

Human serum amyloid A genes are expressed in monocytic/macrophage cell lines.
Am. J. Pathol. 1994, 145, 650-660

[108]: **Ganapathi M. K., Rzewnicki D., Samol D., Jiang S. L., Kushner I.:**

Effect of combinations of cytokines and hormones on synthesis of serum amyloid A

and C-reactive Protein in Hep3B cells.

J. Immunol 1991, 147: 1261-1265

[109]: **Steel D. M., Whitehead A. S.:**

Heterogenous modulation of acut phase reactant mRNA levels by IL 1 β and IL 6 in human hepatoma cell lines PLC/ PRF/5.

Biochem. J. 1991, 277: 477-482

[110]: **Wang L., Lashuel H. A., Walz T., Colon W.:**

Murine apolipoprotein serum amyloid A in solution forms a hexamer containing a central channel.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002, 99: 15947-15952

[111]: **Furlaneto C. J., Campa A.:**

A novel function of serum amyloid A: a potent stimulus for the release of TNF α , IL-1 β and IL-8 by human blood neutrophils.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000, 268: 405-408

[112]: **He R., Song H., Ye R. D.:**

Serum amyloid A induces IL 8 secretion through a G protein-coupled receptor FPRL- 1/ LXA 4R.

Blood 2003, 101: 1572-1581

[113]: **Fiore S., Maddox J. F., Perez H. D., Serhan C. N.:**

Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor.

J. Exp. Med. 1994, 180: 253-260

[114]: **Badolato R., Johnston J. A., Wang J. M., McVicar D., Xu L. L. Oppenheim J. J., Kelvin D. J.:**

Serum amyloid A induces calcium mobilisation and chemotaxis of human monocytes by activating a pertussis toxin sensitive signaling pathway;

J. Immunol. 1995, 155: 4004-4010

[115]: **Su S. B., Gong W. H., Gao J. L., Shen W., Murphy P. M., Oppenheim J. J., Wang J. M.:**

A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL 1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells.

J. Exp. Med. 1999, 189: 395-402

[116]: **Marin V., Montero-Julian F., Gres S., Bongrand P., Farnarier C., Kaplanski G.:**

Chemotactic agents induce IL-6R α shedding from polymorphonuclear cells: involvement of a metalloproteinase of the TNF α -converting enzyme (TACE)type.

Europ. J. Immunol. 2002, 32: 2965-2970

[117]: **Zhou J., Horiuchi S., Yamamoto M., Yamamoto N.:**

Elevated serum levels of the soluble form of gp130, the IL-6 signal transducer, in HTLV-1 infection and no involvement of alternative splicing for its generation.

Microbiol Immunol. 1998, 42: 109-116

[118]: **Migita K., Kawabe Y., Tominaga M., Origuchi T., Aoyagi T., Eguchi K.:**

Serum amyloid A protein induces production of matrix metalloproteinases by human synovial fibroblasts.

Lab. Invest. 1998, 78: 535-539

[119]: **Vallon R., Freuler F., Desta-Tsedu N., Robeva A., Dawson J., Wenner P.,**

Engelhardt P., Boes L., Schnyder J., Tschopp C., Urfer R., Baumann G.:

Serum Amyloid A (apoSAA) expression is upregulated in Rheumatoid Arthritis and induces transcription of matrix metalloproteinases.

J. Immunol. 2001, 166: 2801-2807

[120]: **Bauer J., Bauer T. M., Kalb T., Taga T., Lengyel G., Hirano T., Kishimoto T.,**

Acs G., Mayer L., Gerok W.:

Regulation of interleukin 6 receptor expression in human monocytes and monocyte-derived macrophages. Comparison with the expression in human hepatocytes.

J. Exp. Med. 1989, 170: 1537-1549

[121]: **O'Hara R., Murphy E. P., Whitehead A. S., Bresnihan O. B.:**

Acute-phase serum amyloid A production by rheumatoid synovial tissue.
Arthritis Res. 2000, 2: 142-1444

- [122]: **Kumon Y., Suehiro T., Hashimoto K., Nahatami K., Sipe J. D.:**
Local expression of acute phase serum amyloid A mRNA in rheumatoid arthritis synovial tissue and cells.
Rheumatol. 1999, 26: 785-790
- [123]: **DesGeorges A., Gabay C., Silacci P., Novick D., Roux-Lombard P., Grau G., Dayer J. M., Vischer T., Guerne P. A.:**
Concentrations and origins of soluble interleukin-6 receptor- α in serum and synovial fluid.
J. Rheumatol. 1997, 24: 1510-1516
- [124]: **Tanaka M., Kishimura M., Ozaki S., Osakada F., Hashimoto H., Okubo M., Murakami M., Nakao K.:**
Cloning of novel soluble gp130 and detection of its neutralizing autoantibodies in rheumatoid arthritis.
J. Clin. Inv. 2000, 1: 137-144
- [125]: **Ridker P. M., Cannon C. P., Morrow D., Rifai N., Rose L. M., McCabe C. H., Pfeffer M. A., Braunwald E.:**
C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy.
N. Engl. J. Med. 2005, 352(1): 20-28
- [126]: **Van Lenten B. J., Hama S. Y., DeBeer F. C., Stafforini D. M., McIntyre T. M., Prescott S. M., La Du B. N., Fogelman A. M., Navab M.:**
Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response.
Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cultures.
J. Clin. Invest. 1995, 96: 2758-2767
- [127]: **Klouche M., May A., Hemmes M., Meßner M., Sandip K., Preissner K. T., Bhakdi S.:**
Enzymatically modified, non oxidized LDL induces selective adhesion and

transmigration of monocytes and T-lymphocytes through human endothelial cell monolayers.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1999, 19: 784-793

[128]: **Klouche M., Rose-John S., Schmiedt W., Bhakdi S.:**

Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation and proliferation.

Circulation 2000, 101:1799-1816

[129]: **Klouche M., Gottschling S., Gerl V., Hell W., Husmann M., Dorweiler B.,**

Messner M., Bhakdi S.:

Atherogenic properties of enzymatically degraded LDL: selective induction of MCP-1 and cytotoxic effects on human macrophages.

Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol. 1998, 18: 1376-1385

[130]: **O'Brien K., McDonald T.O., Kunjathoor V., Eng K., Knopp E. A., Lewis K.,**

Lopez R., Kirk E. A., Chait A., Wight T. N., DeBeer F., LeBoeuf R. C.:

Serum amyloid A and lipoprotein retention in murine models of atherosclerosis.

Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol. 2005, 25: 785

[131]: **Glurich I., Grossi S., Albini B., Ho A., Shah R., Zeid M., Baumann H.,**

Genco R. J., De Nardin E.:

Systemic inflammation in cardiovascular and periodontal disease: Comparative study.

Clinic. Dignost. Laborrat. Immunol. 2002, 9: 425-432

9. DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. M. Klouche für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation sowie die hervorragende Betreuung und Begleitung der Arbeit. Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. G. Schmitz für die großzügige Schaffung der Rahmenbedingungen zur Durchführung der wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Danken möchte ich an dieser Stelle auch Frau BTA Franziska Walter und Frau Dr. Berta Schulz für die Einführung in die Labortätigkeit und die praktische Hilfestellung.

10. LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Name, Vorname: Maier, Judith Elisabeth
Geburtsdatum/ - ort: 10.08.1980, Weiden in der Oberpfalz
Familienstand: ledig
Eltern: Johann B. Maier – Dipl. Ing. Werkstofftechnik
Rosemarie Maier – Technische Zeichnerin, Industriekauffrau
Geschwister: Klaus Maier, Magdalena Maier, Hans-Ulrich Maier

Schulische Ausbildung:

1987-1990: Grundschule Tännesberg
1990-1995: Ortenburg-Gymnasium Oberviechtach
1995-1998: Leininger-Gymnasium Grünstadt, Rheinland-Pfalz
1998-2000: Kollegstufe Ortenburg-Gymnasium Oberviechtach

Mai 2000: Allgemeinabitur Ortenburg-Gymnasium Oberviechtach
Juni 2000: Erhalt des Stipendiums der bayerischen Begabtenförderung,

Berufliche Ausbildung:

13.09.2000: Immatrikulation im Fach Humanmedizin

WS 2000 - SS 2002: Vorklinisches Studium an der Universität Regensburg
WS 2002 - SS 2006: Klinisches Studium an der Universität Regensburg

Abschlüsse: 17. 09. 2000 Ärztliche Vorprüfung
28. 08. 2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
07. 10. 2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
19. 10. 2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

seit Januar 2007: ärztliche Weiterbildung an der
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I
des Universitätsklinikums Regensburg
Leitung: Prof. Dr. med. Jürgen Schölmerich

