

**Untersuchungen zur limitierten Proteolyse transmembraner
Chemokine durch Disintegrin-ähnliche Metalloproteinasen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

vorgelegt von

Christian Hundhausen

Kiel

Mai 2005

Referent/in:

Koreferent/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	5
1.1. DIE FAMILIE DER CHEMOKINE	8
1.1.1. Klassifizierung	8
1.1.2. Rezeptoren und Signaltransduktion	10
1.1.3. Pathologische Funktionen löslicher Chemokine bei vaskulären Erkrankungen.....	11
1.2. DIE TRANSMEMBRANEN CHEMOKINE CX3CL1 UND CXCL16	12
1.2.1. Struktur, Expression und Induzierbarkeit	12
1.2.2. Die Rezeptoren CX3CR1 und CXCR6.....	14
1.2.3. Biologische Funktionen	14
1.3. DIE PROTEOLYTISCHE EKTODOMÄN-SPALTUNG: <i>SHEDDING</i>	16
1.3.1. Die Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen.....	17
2. FRAGESTELLUNGEN	21
3. ERGEBNISSE	22
3.1. Die Disintegrin-ähnliche Metalloproteinase ADAM10 vermittelt die konstitutive Spaltung von CX3CL1 und reguliert die durch CX3CL1 verursachte Zell-Zell-Adhäsion (Veröffentlichung 1)	22
3.1.1. Konstitutive und induzierbare Freisetzung von löslichem CX3CL1	23
3.1.2. Unterschiedliche Regulation von konstitutivem und induziertem CX3CL1- <i>Shedding</i>	25
3.1.3. Verstärkung des konstitutiven CX3CL1- <i>Sheddings</i> durch ADAM10-Überexpression	27
3.1.4. Reduktion des konstitutiven CX3CL1- <i>Sheddings</i> in ADAM10-defizienten embryonalen Maus-Fibroblasten	28
3.1.5. Verminderte Adhäsionseigenschaften CX3CL1-exprimierender Zellen durch <i>Shedding</i>	31

3.2. Der transmembrane CXC-Chemokinligand 16 wird durch IFN-gamma und TNF-alpha induziert und durch die Disintegrin-ähnliche Metalloprotease ADAM10 gespalten (Veröffentlichung 2)	33
3.2.1. Entstehung von löslichem CXCL16	33
3.2.2. Regulation von CXCL16 auf der Zelloberfläche	35
3.2.3. Beteiligung von ADAM10 am konstitutiven CXCL16- <i>Shedding</i>	35
3.2.4. PMA-induziertes CXCL16- <i>Shedding</i>	37
3.2.5. CXCL16-Induktion und - <i>Shedding</i> in vaskulären Zellen	38
3.3. Gesteigerte Expression und <i>Shedding</i> des transmembranen Chemokins CXCL16 durch reaktive Astrozyten und Gliomazellen (Veröffentlichung 3)	41
3.3.1. CXCL16-Expression in reaktiven Astrozyten und Glioma-Zellen	41
3.3.2. Heraufregulation der CXCL16-mRNA-Expression in Gliomen, Glioma-Zelllinien und isolierten murinen Astrozyten	41
3.3.3. Erhöhte CXCL16-Expression nach IFN- γ - und TNF- α -Stimulation	42
3.3.4. Freisetzung von löslichem CXCL16 in Gliazellen	43
3.3.5. CXCL16- <i>Shedding</i> in Gliazellen durch unterschiedliche Metalloproteinasen	44
3.3.6. Verstärkte Expression des CXCL16-Rezeptors CXCR6 in Gliomen und sein Nachweis in Astrozyten und Mikrogliazellen	45
4. DISKUSSION	47
4.1. Differentielle Regulation des <i>Sheddings</i> von CX3CL1 und CXCL16	47
4.2. Bedeutung von CX3CL1 und CXCL16 für die Zelladhäsion und die Leukozytenrekrutierung .	51
4.3. Funktion der transmembranen Chemokine <i>in vivo</i>	53
5. ZUSAMMENFASSUNG	56
6. SUMMARY	59
7. LITERATURVERZEICHNIS	61
8. VERÖFFENTLICHUNGEN	71
9. LEBENSLAUF	
10. DANKSAGUNG	

Verwendete Abkürzungen

ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
AP-β	Amyloidprotein-β
ApoE	Apolipoprotein E
APP	β-Amyloidvorläuferprotein
AS	Aminosäure
CAM	<i>Cellular Adhesion Molecule</i>
CNTF	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
CTF	C-terminales Fragment
DAG	Diacylglycerol
DC	<i>Dendritic Cell</i>
EAE	<i>Experimental Autoimmune Encephalomyelitis</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Faktor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
gp130	glycoprotein 130
GTP	Guanosintriphosphat
H-IL-6	Hyper-IL-6
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration für halbmaximalen Hemmeffekt
IFN-γ	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-6R	IL-6 Rezeptor
IP3	Phosphatidylinositol 1,4,5-Triphosphat
kD	Kilodalton
LDL	<i>Low-Density-Lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>Mitogen-Activated-Protein-Kinase</i>
MIF	Mittlere Fluoreszenz-Intensität
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Boten RNA
NK	Natürliche Killerzellen
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	Phycocerythrin
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-Biphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POD	Peroxidase
PrP	Prion-Protein
P-Selektin	<i>Platelet (Blutplättchen)-Selektin</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
STRL33	<i>Seven Transmembrane Receptor-Like from clone 33</i>
SVMP	<i>Snake Venom Metalloproteinase</i>
TACE	<i>Tumor necrosis factor Alpha-Converting Enzyme</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
TH	<i>T-Helper</i>

TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-azetat
TYMSTR	<i>T-Lymphocyte-Expressed Seven-Transmembrane Domain Receptor</i>
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abkürzungen für Aminosäuren

A Alanin (Ala)	G Glycin (Gly)	M Methionin (Met)	S Serin (Ser)
C Cystein (Cys)	H Histidin (His)	N Asparagin (Asn)	T Threonin (Thr)
D Asparaginsäure (Asp)	I Isoleucin (Ile)	P Prolin (Pro)	V Valin (Val)
E Glutaminsäure (Glu)	K Lysin (Lys)	Q Glutamin (Gln)	W Tryptophan (Trp)
F Phenylalanin (Phe)	L Leucin (Leu)	R Arginin (Arg)	Y Tyrosin (Tyr)

1. Einleitung

Die Fähigkeit des menschlichen Organismus, Krankheitserreger und Fremdstoffe abzuwehren, verdanken wir unserem Immunsystem, einem Netzwerk von Zellen, löslichen Proteinen und Organen. Häufig ist die Entzündung, welche bereits vor über 2000 Jahren von dem römischen Arzt Celsus mit den Worten „rubor et tumor cum calor et dolor“- Rötung und Schwellung verbunden mit Wärme und Schmerz- beschrieben wurde, ein äußerlich sichtbares Kennzeichen einer solchen Abwehrreaktion.

Wie man heute weiß, können die Ursachen für die Entstehung von Entzündungen sehr vielfältig sein. Sie umfassen Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Pilze, Parasiten oder Fremdpartikel, aber auch entartete körpereigene Zellen. Die Beseitigung der Erreger erfordert ein genau abgestimmtes Zusammenspiel von löslichen und zellulären Komponenten. Die zelluläre Abwehr wird von den weißen Blutzellen (Leukozyten) vermittelt, welche sich in verschiedene Subtypen (Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen) einteilen lassen. Dabei sind die Monozyten und Makrophagen die Hauptproduzenten der löslichen Zytokine, zu denen man unter anderem die Interleukine (IL), die Interferone (IFN), verschiedene Wachstumsfaktoren sowie die chemotaktischen Zytokine oder Chemokine zählt. Generell wirken diese Proteine, indem sie über spezifische Rezeptoren das Verhalten der Zellen am Entzündungsort modellieren. Im Zusammenhang mit akuten und chronischen Entzündungen unterscheidet man häufig zwischen entzündungsfördernden (proinflammatorischen) und entzündungshemmenden (antiinflammatorischen) Zytokinen. Zu ersteren gehören vor allem der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Interferon-gamma (IFN- γ) und IL-1, zu letzteren zählen zum Beispiel der Transformierende Wachstumsfaktor-beta (TGF- β), IL-10 und IL-4¹⁻³.

Die Bedeutung der Chemokine liegt insbesondere darin, dass sie die gezielte Wanderung von Leukozyten induzieren, ein Prozess, der als Chemotaxis bezeichnet wird. Gerade bei Entzündungen spielt dieser Vorgang eine große Rolle, da auf diese Weise vermehrt Leukozyten an den Herd der Infektion geleitet werden. Die Frage, wie dies im Detail geschieht, haben Butcher *et al.*^{4,5} sowie Springer *et al.*⁶ in einem mehrstufigen Modell zur Leukozytenrekrutierung beschrieben (Abb.1): Der erste Kontakt der Leukozyten mit dem Endothel wird durch Bindung von

Adhäsionsmolekülen, den Selektinen, an die Kohlenhydratreste (Sialyl-Lewis^X) von Glykoproteinen hergestellt. Bei den Selektinen unterscheidet man die L-Selektine der Leukozyten von den E- und P-Selektinen des Endothels. Letztere werden im entzündeten Gewebe durch TNF α und IFN γ heraufreguliert⁷. Da die Wechselwirkungen der Selektine mit ihren Liganden nur relativ schwach und reversibel sind, kommt es zunächst nicht zu einer festen Bindung der Leukozyten an das Endothel, sondern vielmehr zu einer ständigen Abfolge von Adhäsion und Ablösen und einer daraus resultierenden rollenden Bewegung (*Rolling*) der Zellen entlang der Gefäßinnenwand. Stärkere Wechselwirkungen, die eine feste Adhäsion bewirken, werden in einem nächsten Schritt durch die Interaktion zwischen Integrinen und Adhäsionsmolekülen der Immunoglobulin-Superfamilie, den *Cellular Adhesion Molecules* (CAMs), vermittelt. Hierzu ist eine Aktivierung der Integrine erforderlich, welche durch Interaktion zwischen chemotaktischen Mediatoren und spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Leukozyten erfolgt⁸. Zu den Mediatoren gehören die Anaphylatoxine C3a und C5a des Komplementsystems, das Esterphospholipid PAF, das Arachidosäurederivat LTB₄ und vor allem die Chemokine⁹. Letztere binden sehr wahrscheinlich an Glukosaminoglykane des Endothels¹⁰. Neben ihrer Funktion der Integrinaktivierung induzieren die chemotaktischen Faktoren gleichzeitig die Abspaltung schwächer bindender Selektine¹¹. Auf die feste Adhäsion der Leukozyten folgt die Transmigration durch das Endothel, ein Vorgang, der als Diapedese bezeichnet wird. Hierbei belegen Studien zwei Möglichkeiten, zum einen die Wanderung der Zellen zwischen den Endothelzellen hindurch oder das direkte Durchdringen der Endothelzellen. Welcher Mechanismus bevorzugt wird, bleibt weitgehend unklar, obwohl man annimmt, dass hierfür der Leukozyt-Subtyp, die Art des Stimulus sowie Gewebetyp und Spezies des Organismus entscheidend sind¹⁰.

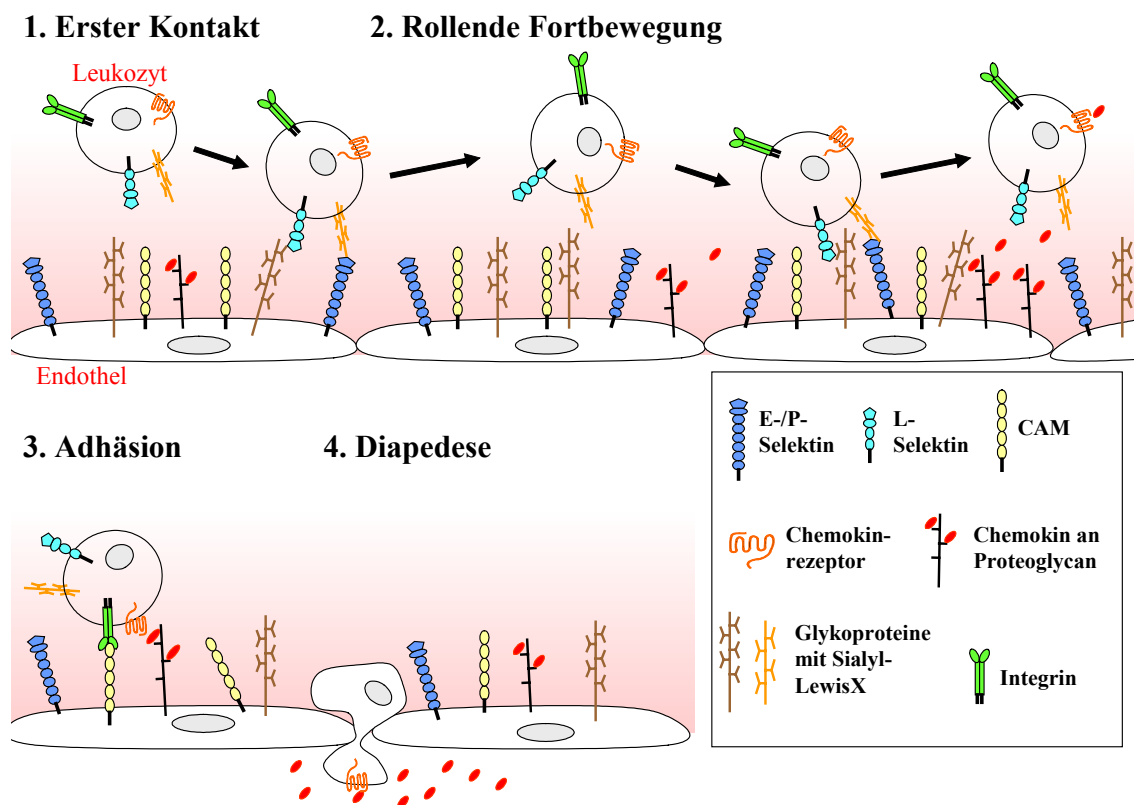


Abb.1 Modell zur Leukozytenrekrutierung. Der erste Kontakt zwischen Leukozyt und Endothel wird durch Bindung von Selektinen an Sialyl-Lewis^X-Glycoproteine hergestellt (L-Selektin: Leukozyt-Selektin; E-Selektin: Endothel-Selektin; P-Selektin: *Platelet* (Blutplättchen)-Selektin). E- und P-Selektin werden bei Entzündungsreaktionen durch die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IFN γ heraufreguliert. Die durch Selektine vermittelte Bindung ist reversibel und wird fortlaufend gelöst und wieder hergestellt, mit der Folge einer rollenden, sich verlangsamenen Bewegung der weißen Blutzelle entlang der Gefäßinnenwand, auch *Rolling* genannt. Die feste Adhäsion des Leukozyten an das Endothel geschieht durch Bindung von Integrinen an Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie, die *Cellular Adhesion Molecules* (CAMs). Die Voraussetzung für diese Interaktion ist eine Aktivierung der Integrine, welche über chemotaktische Mediatoren erfolgt. Chemotaxine wie die Komplementfaktoren C3a und C5a sowie Chemokine, die auf Glukosaminoglykanen des Endothels präsentiert werden, aktivieren über spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die Integrine und induzieren gleichzeitig die Abspaltung schwächer bindender Selektine. Im letzten Schritt kommt es zur Transmigration der Leukozyten durch das Endothel (*Diapedese*).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Regulation einer kleinen Untergruppe der Chemokine, der transmembranen Chemokine. Ihre Besonderheit ist, dass sie membranständig exprimiert werden, aber durch die Aktivität von bestimmten Proteasen, den Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen, auch in eine lösliche Form überführt werden können. Sehr wahrscheinlich haben beide Formen wichtige biologische Funktionen und tragen möglicherweise zur Pathogenese bestimmter entzündlicher Krankheiten wie zum Beispiel der Arteriosklerose bei. Allerdings sind die an der

Regulation dieser Chemokine beteiligten Metalloproteinasen nur zum Teil identifiziert und auch der Mechanismus dieses Vorgangs ist weitgehend unverstanden.

Im Folgenden sollen nach einer Einführung in die Familie der Chemokine und einer kurzen Übersicht über Chemokin-assoziierte Krankheiten die Vertreter der transmembranen Chemokine sowie die Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen näher vorgestellt werden. Im Mittelpunkt stehen dann die im Laufe der Arbeit angefertigten Veröffentlichungen zur Regulation und der biologischen Funktion der transmembranen Chemokine.

1.1. Die Familie der Chemokine

1.1.1. Klassifizierung

Die meisten der über 50 bekannten humanen Chemokine sind kleine, lösliche Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 8 und 12 kD^{12,13}. Die Ausnahme bilden zwei membrangebundene Vertreter, das CX3CL1 oder Fraktalkin sowie das CXCL16 (siehe 1.3.)¹⁴. Die Einteilung der Chemokine in Unterfamilien kann aufgrund struktureller oder funktionaler Kriterien vorgenommen werden. Strukturell lassen sich Gruppen bilden anhand der charakteristischen Anordnung des ersten bzw. der ersten beiden N-terminalen Cystein (C)-Aminosäurereste innerhalb des stark konservierten Abschnitts der Chemokin-Domäne. Die Cystein-Reste liegen entweder einzeln (C), nebeneinander (CC) oder von einer bzw. drei Aminosäuren getrennt vor (CXC bzw. CX3C)⁹. Die löslichen Chemokine haben eine konservierte Sekundärstruktur beginnend mit einem flexiblen N-terminalen Segment, gefolgt von drei antiparallelen β -Faltblättern und einer C-terminalen α -Helix¹⁵.

Eine neuere Klassifizierung orientiert sich an den physiologischen Eigenschaften der Chemokine und bezieht Ort und Bedingungen ihrer Produktion genauso ein wie die zelluläre Verteilung ihrer Rezeptoren. Man unterscheidet demnach zwischen inflammatorischen (oder induzierbaren) und homeostatischen (oder konstitutiven, lymphoiden) Chemokinen^{12,14,16}. Als Chemokine mit „dualen Funktionen“ werden solche bezeichnet, die Kennzeichen beider Gruppen aufweisen¹⁴ (Abb.2). Während die

inflammatorischen Chemokine im wesentlichen die Rekrutierung von Immunzellen an den Ort der Infektion, der Entzündung oder auch des Tumors kontrollieren, sind die homeostatischen Chemokine für die Steuerung des entzündungsunabhängigen, kontinuierlichen Verkehrs von Leukozyten durch gesundes peripheres Gewebe verantwortlich - eine Aufgabe, die auch als Immunüberwachung bezeichnet wird. Sie sind aber auch von Bedeutung für die Hämatopoese und die Einleitung der adaptiven Immunantwort in der Milz, den Lymphknoten und den Peyers Patches¹⁴. Chemokine mit dualen Funktionen sind einerseits an der Immunabwehr beteiligt, indem sie zum Beispiel bei Entzündungen verstärkt exprimiert werden, andererseits sind ihre Zielzellen reifende Leukozyten und Zellen der Immunüberwachung¹⁴.

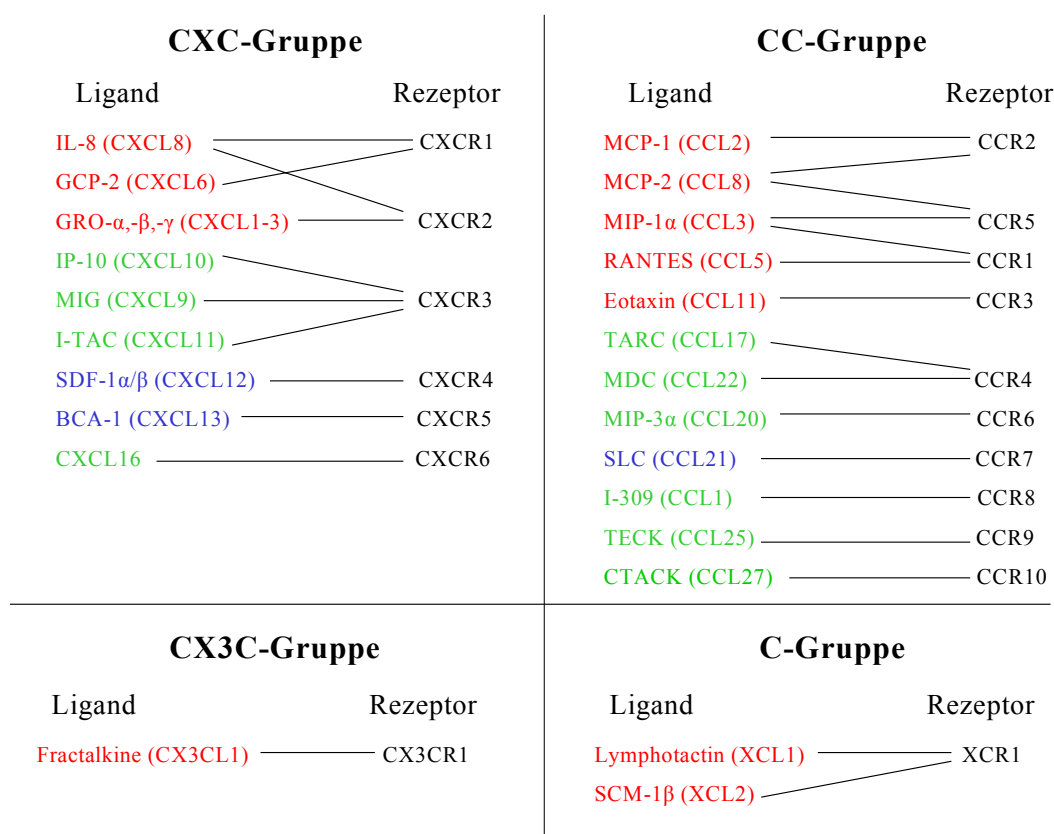


Abb.2: Klassifizierung der Chemokine und ihrer Rezeptoren. Basierend auf der relativen Anordnung des ersten bzw. der ersten beiden Cystein (C)- Aminosäurereste in der Chemokindomäne werden klassischerweise vier Gruppen von Chemokinen unterschieden (CXC, CC, CX3C und C). Die Nomenklatur der Rezeptoren (R) richtet sich nach der Gruppenzugehörigkeit ihrer Liganden (L). Innerhalb jeder Gruppe werden die Rezeptoren fortlaufend nummeriert. Eine neuere Einteilung der Chemokine berücksichtigt ihre physiologischen Eigenschaften: Man unterscheidet zwischen inflammatorischen (rot) und homeostatischen (blau) Chemokinen sowie solchen mit dualen Funktionen (grün). Fraktalkine und Lymphotactin bzw. SCM-1 β sind die einzig bekannten Mitglieder ihrer Gruppen. Für die CXC- und die CC-Chemokine sind einige bekannte Vertreter aufgeführt.

1.1.2. Rezeptoren und Signaltransduktion

Die bisher 19 bekannten Chemokinrezeptoren gehören alle zu den heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Basierend auf ihrer Chemokin-Spezifität werden sie in vier Gruppen eingeteilt (CXC, CC, CX3C und C, siehe Abb.2). Das gemeinsame strukturelle Merkmal der ca. 40 kD großen Proteine sind sieben α -helikale transmembrane Domänen, die durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Sequenzen (*Loops*) miteinander verbunden sind. Der intrazelluläre C-Terminus enthält Serin- und Threoninreste, die als Phosphorylierungsstellen für die Rezeptorregulation von Bedeutung sind (siehe unten)¹⁷.

Die Signaltransduktion wird durch Bindung des Chemokins an seinen Rezeptor ausgelöst. Das mit dem C-Terminus des Rezeptors interagierende heterotrimere G-Protein zerfällt nach Austausch von GDP mit GTP in seine Untereinheiten $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$. $G\beta$ aktiviert die membranassoziierte Phospholipase C (PLC), die ihrerseits durch Spaltung von Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP_2) zur Formation von Phosphatidylinositol 1,4,5-Trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) führt. IP_3 mobilisiert intrazelluläres Kalzium, das zusammen mit DAG die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) bewirkt¹⁷. Aktivierte PKC katalysiert die Phosphorylierung von Proteinen, wodurch eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird, die schließlich eine zelluläre Antwort zur Folge hat. Neben $G\beta$ - und $G\gamma$ -vermittelter Signaltransduktion leiten Chemokinrezeptoren auch über die $G\alpha$ -Untereinheit Signale weiter. Wird dieser Signalweg inhibiert, zum Beispiel durch *Bordatella pertussis*-Toxin, verlieren die Zellen ihre Fähigkeit zur Chemotaxis¹⁸. Die Entdeckung, dass $G\alpha$ Kinasen der Src-Familie aktivieren kann¹⁹, wird als mögliche Erklärung für die Aktivierung der mit dem Zytoskelett assoziierten Kinasen FAK und Pyk-2 sowie die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade während der Chemotaxis angeführt²⁰.

Nach ihrer Aktivierung werden Chemokinrezeptoren teilweise oder vollständig desensitiviert, das heißt, sie können vorübergehend nicht mehr auf den gleichen Stimulus reagieren^{14,17,20}. Dieser Effekt wird durch Phosphorylierung C-terminaler Serin- und Threoninreste des Rezeptors mit anschließender Rezeptor-Internalisierung hervorgerufen. Internalisierte Rezeptoren werden entweder degradiert oder nach

Dephosphorylierung wieder an die Zelloberfläche transportiert und dort neu verteilt. Zusammen mit der *de novo*-Synthese der Chemokinrezeptoren ist dieser Prozess entscheidend für die Aufrechterhaltung der chemotaktischen Sensibilität der Zelle^{14,17}.

1.1.3. Pathologische Funktionen löslicher Chemokine bei vaskulären Erkrankungen

Obwohl Chemokine, wie eingangs beschrieben, wichtige Funktionen im Rahmen einer Entzündungsreaktion ausüben und damit unerlässlich für ein funktionierendes Immunsystem sind, gibt es auch Anzeichen dafür, dass sie in die Pathogenese diverser Krankheiten involviert sein können. Dazu gehören unter anderem Gefäßerkrankungen (Arteriosklerose^{1,21,22}), Allergien (Asthma^{23,24}), Autoimmunkrankheiten (Multiple Sklerose^{25,26}, Rheumatoide Arthritis^{27,28}) und Krebs^{29,30}. Das Beispiel der Arteriosklerose soll die mögliche Beteiligung von Chemokinen in entzündlichen Krankheiten verdeutlichen:

Die Arteriosklerose ist nach heutigem Kenntnisstand eine chronische entzündliche Erkrankung der Gefäße, die mit einer starken Verengung des Gefäßlumens aufgrund so genannter Plaquebildung einhergeht. Die Plaques entstehen durch verstärktes Ansammeln von Leukozyten (Monozyten und T-Zellen) in der subendothelialen Zellschicht (Intima) des Gefäßes. Verschiedene Chemokine, insbesondere MCP-1^{31,32}, aber auch MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES³³, sind in arteriosklerotischen Plaques gefunden worden, wobei MCP-1 hauptsächlich von Makrophagen, aber auch von glatten Muskelzellen und dem Endothel der Gefäße exprimiert wird. Die überzeugendsten Studien zur Bedeutung von Chemokinen für die Arteriosklerose basieren auf transgenen Mausmodellen, in denen Arteriosklerose-ähnliche Läsionen durch Ausschaltung der Gene für den *Low-Density-Lipoprotein* (LDL)-Rezeptor oder das Apolipoprotein E (ApoE) induziert wurden: Sowohl in Tieren, die zusätzlich zum Fehlen des LDL-Rezeptors auch MCP-1-defizient waren³⁴, als auch in solchen, die weder ApoE noch den MCP-1-Rezeptor (CCR2) besaßen³⁵, konnte die Entstehung von arteriosklerotischen Läsionen supprimiert werden.

1.2. Die transmembranen Chemokine CX3CL1 und CXCL16

1.2.1. Struktur, Expression und Induzierbarkeit

Die Chemokine CX3CL1 (Fraktalkin, Neurotactin) und CXCL16 sind außergewöhnliche Vertreter ihrer Familie, da sie die einzig bekannten Chemokine sind, die nicht als lösliche Moleküle sezerniert, sondern membranständig exprimiert werden, das heißt, in der Zellmembran verankert sind. Dennoch existieren in beiden Fällen auch lösliche Varianten, deren Entstehung und Regulation in dieser Arbeit behandelt wird. CX3CL1 und CXCL16 gehören zum Typ I der transmembranen Proteine und sind mit 373 (CX3CL1) bzw. 254 Aminosäuren (CXCL16) deutlich größer als ihre löslichen Verwandten. Strukturell sehr ähnlich lassen sich vier Domänen voneinander unterscheiden (Abb.3): An eine N-terminale, extrazelluläre Chemokin-Domäne schließt sich ein hoch glykolysierter, Mucin-reicher Abschnitt an, gefolgt von einer transmembranen und schließlich einer zytoplasmatischen Domäne³⁶.

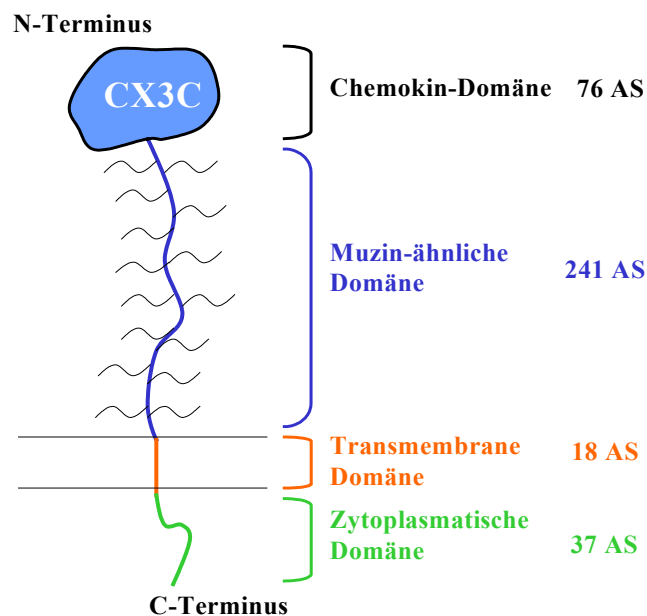


Abb.3: Schematische Darstellung der Struktur transmembraner Chemokine am Beispiel des CX3CL1. Es lassen sich vier Domänen voneinander unterscheiden: Die extrazelluläre, N-terminale Chemokin-Domäne, die stark glykolysierte Mucin-ähnliche Domäne, die transmembrane Domäne sowie die C-terminale cytoplasmatische Domäne.

Auf der Suche nach neuen Chemokinen führte das Überprüfen einer murinen GehirncDNA-Bibliothek mit Hilfe des „High Throughput Screenings“ 1997 zur Entdeckung des auf Chromosom 16 lokalisierten CX3CL1 oder Neurotactin, wie es zunächst genannt wurde^{36,37}. Northern Blot - Analysen verschiedener Gewebe ergaben eine besonders starke Genexpression im Gehirn und eine etwas geringere im Herz, der Lunge, den Nieren, dem Pankreas und dem Darm³⁶. Während primäre humane Endothelzellen der Lunge und der Nabelschnur (HPAEC bzw. HUVEC) konstitutiv nur sehr wenig oder gar kein CX3CL1 exprimierten, beobachtete man nach Stimulation der Zellen mit TNF- α oder IL-1 einen deutlichen Anstieg der CX3CL1-mRNA³⁶. Konstitutiv exprimierte CX3CL1-mRNA fand man außerdem in den murinen Endothel- bzw. Fibroblasten-Zelllinien EOMA und STO, welche nach Stimulation mit dem Phorbol-ester TPA oder dem bakteriellen Antigen LPS vermehrt produziert wurde³⁷. Mittels Immunhistochemie wurde die CX3CL1-Proteinexpression sowohl im gesunden als auch, dann deutlich heraufreguliert, im Gehirn von LPS-behandelten oder von EAE-Mäusen nachgewiesen³⁷. Auf mRNA- und Proteinebene wurde CX3CL1-Expression weiterhin in glatten Muskelzellen der Vaskulatur³⁸ sowie dendritischen Zellen (DC) der Epidermis und der lymphoiden Organe detektiert³⁹. Von Leukozyten des peripheren Bluts (T- und B-Zellen sowie NK-Zellen) wird CX3CL1 nur sehr schwach bis gar nicht exprimiert^{36,37}.

Obwohl als membrangebundenes Protein identifiziert, ergaben Western-Blot-Analysen transfizierter HEK293-Zellen zusätzlich die Existenz einer ca. 95 kD löslichen Variante des CX3CL1³⁶. Die unterschiedlichen Funktionen beider Formen des Chemokins werden, soweit bekannt, an späterer Stelle diskutiert (siehe 1.2.3.).

Das zweite transmembrane Chemokin, CXCL16, wurde im Jahr 2000 aus einer cDNA-Bibliothek PMA-stimulierter THP-1-Zellen kloniert und als Scavenger-Rezeptor zur Aufnahme oxidierten LDLs identifiziert⁴⁰. Die Expression des 30 kD-Moleküls auf der Zelloberfläche wurde bisher nur für Antigen-präsentierende Zellen wie B-Zellen und Monocyten bzw. Macrophagen^{40,41} gezeigt. Auf mRNA-Ebene ergaben Gewebesanalysen eine deutliche CXCL16-mRNA-Expression in der Lunge, der Leber und der Milz sowie eine geringere Expression in der Niere, dem Pankreas, den Lymphknoten und der Plazenta⁴¹.

1.2.2. Die Rezeptoren CX3CR1 und CXCR6

CX3CR1 ist der spezifische Rezeptor für CX3CL1. 1995 als Rezeptor ohne bekannte Funktion identifiziert, wurde er zunächst V28 genannt^{42,43}, bevor weitere Studien seine hohe Bindungsaffinität zu CX3CL1 nachwiesen⁴⁴⁻⁴⁶. Die Aminosäuresequenz des auf Chromosom 3p21 lokalisierten Rezeptors zeigt deutliche Homologien zu Chemokinrezeptoren der CC-Gruppe (30-42%)⁴³. CX3CR1-mRNA ist sowohl beim Menschen als auch der Maus am stärksten im Gehirn exprimiert, aber auch in anderen Organen wie der Lunge, der Leber oder der Niere⁴⁷. Monozyten, T-Lymphozyten NK-Zellen und Mastzellen sind ebenfalls positiv für CX3CR1-mRNA^{36,44-46}.

Der spezifische Rezeptor für CXCL16, CXCR6, wurde 1997 von drei unabhängigen Gruppen kloniert und zunächst als STRL33 (*Seven Transmembrane Receptor-Like from clone 33*), BONZO oder TYMSTR (*T-Lymphocyte-Expressed Seven-Transmembrane Domain Receptor*) bezeichnet⁴⁸⁻⁵¹. Er wird hauptsächlich von Gedächtnis-T-Zellen und aktivierten Th1- und Tc1-Effektor-T-Zellen exprimiert^{52,53}.

1.2.3. Biologische Funktionen

Die biologischen Funktionen der Chemokine CX3CL1 und CXCL16 sind nur sehr unvollständig bekannt und daher auch Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit. Insbesondere die Tatsache, dass für beide Chemokine sowohl membrangebundene als auch lösliche Formen vorliegen, kompliziert und erweitert deren potentiell Wirkungsspektrum. Da dieses von der Existenz responsiver Zellen abhängig ist, muss in diesem Zusammenhang auch die Rolle der Rezeptoren CX3CR1 (für CX3CL1) und CXCR6 (für CXCL16) berücksichtigt werden.

Erste Funktionsanalysen des CX3CL1-Chemokins ergaben, dass die membrangebundene Form die Adhäsion von Monozyten und T-Zellen fördert und dass dieser Vorgang über die Chemokin-Domäne des Moleküls vermittelt wird³⁶. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die lösliche CX3CL1-Variante bei Monozyten

und T-Zellen Chemotaxis induziert³⁶. Die adhäsiven Eigenschaften der membranassoziierten Form erfordern keine Signalübertragung durch den Rezeptor, sind stabil gegenüber physiologischen Scherkräften und unabhängig von extrazellulärem Kalzium^{36,54,55}. *In vivo*-Befunde ergaben eine verstärkte CX3CL1-Expression in arteriosklerotischen Blutgefäßen^{56,57}, in Transplantaten nach Abstoßungsreaktionen⁵⁸, in entzündeten rheumatoiden Gelenken^{59,60}, in der Haut von Psoriasis-Patienten^{61,62}, in verletztem Lebergewebe⁶³, bei Nierenentzündungen⁶⁴ und bei Ischämie-Reperfusion im Gehirn⁶⁵. In Tiermodellen konnte mit Hilfe neutralisierender anti-CX3CL1-Antikörper die Bedeutung des Chemokins für die Abstoßung transplantierte Organe⁵⁸ und die Nierenerkrankung Glomerulonephritis⁶⁶ gezeigt werden. Obwohl Mäuse mit zerstörtem CX3CL1- oder CX3CR1-Gen keinen offensichtlichen Phänotyp aufweisen^{67,68}, wurde eine deutlich geringere Anfälligkeit CX3CR1-defizienter Tiere für die Abstoßung von Herztransplantaten und cerebrale Ischämie-Reperfusion festgestellt^{69,70}. In Tiermodellen für die Arteriosklerose wird die wahrscheinlich wichtige Funktion von CX3CL1 und seinem Rezeptor für entzündliche Gefäßerkrankungen ersichtlich: Die arteriosklerotischen Läsionen ApoE-defizienter Mäuse waren in Tieren, die zusätzlich CX3CR1-defizient waren, um bis zu 36 % reduziert⁷¹. Eine deutliche Reduktion der Plaques konnte auch in ApoE- oder LDLR-defizienten Mäusen festgestellt werden, in denen außerdem das CX3CL1-Gen ausgeschaltet war. Hierbei wurde insbesondere im Bereich der großen Kopfarterie (*Truncus brachiocephalicus*) ein erheblicher Rückgang der Läsionen um 50 - 80 % beobachtet⁷². Zudem ergab eine Studie, dass Menschen mit einem Polymorphismus in dem Rezeptorgen ein signifikant verringertes Risiko hatten, Arteriosklerose zu entwickeln⁷³.

CXCL16 ist als sogenannter Scavenger-Rezeptor entdeckt worden- eine Bezeichnung, die sich auf die Fähigkeit bezieht, oxidiertes „Low Density Lipoprotein“ (oxLDL) zu binden und aufzunehmen⁴⁰. Weiterhin vermittelt membrangebundenes, auf Antigen-präsentierenden Zellen exprimiertes CXCL16 über seine Chemokin-Domäne die Phagozytose Gram-positiver oder -negativer Bakterien⁷⁴. Es kann aber auch als Adhäsionsmolekül für CXCR6-exprimierende Leukozyten dienen, wie eine Studie belegt, in der auf einer Plastikoberfläche immobilisiertes CXCL16 Plasmazellen des Knochenmarks binden konnte⁷⁵. Lösliches CXCL16 dagegen wirkt als klassisches Chemokin, indem es über seinen Rezeptor chemotaktische Migration von aktivierten T-Zellen und Plasmazellen induziert^{75,76}.

Eine gemeinsame Funktion der Rezeptoren von CX3CL1 und CXCL16 ist, dass sie als Korezeptoren neben CD4 bestimmten HIV-1-Stämmen den Eintritt in die Zelle ermöglichen⁴⁸.

1.3. Die proteolytische Ektodomän-Spaltung: *Shedding*

Da die transmembranen Chemokine CX3CL1 und CXCL16 als membrangebundene und lösliche Moleküle existieren, wurde vermutet, dass die lösliche Variante aus der transmembranen durch limitierte Proteolyse hervorgeht.

Das Phänomen der Abspaltung extrazellulärer Bereiche (Ektodomänen) membranständiger Proteine durch Proteasen wird als *Shedding* bezeichnet. Diese Form der posttranslationalen Regulation von Proteinen generiert physiologisch aktive, lösliche Fragmente und ist mittlerweile für eine Vielzahl von Molekülen unterschiedlicher Funktionen beschrieben worden, so zum Beispiel für Vertreter der Zytokine (TNF- α ⁷⁷), der Adhäsionsmoleküle (L-Selektin^{78,79}), für Wachstumsfaktoren (TGF- α ⁷⁸) und Rezeptoren (TNF-Rezeptor⁷⁸, IL6-Rezeptor^{80,81}). Die physiologischen Konsequenzen des *Sheddings* sind vielfältig: Werden durch diesen Vorgang beispielsweise Rezeptoren von der Zelloberfläche entfernt, können Zellen an Responsivität verlieren. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass die so entstandenen löslichen Rezeptorformen systemisch verbreitet werden und agonistisch oder antagonistisch wirken⁸².

Ein gut verstandenes Beispiel ist das *Shedding* des IL-6-Rezeptors, das eine lösliche Form des Rezeptors generiert, die an IL-6 binden und in diesem Komplex Zellen aktivieren kann, die keinen IL-6R exprimieren⁸³. Dieses Phänomen des *Transsignalling* ist prinzipiell auch für IL-11 und CNTF gezeigt worden⁸² und möglicherweise auf weitere Proteine übertragbar. Eine andere Funktion löslicher Rezeptoren kann in der Stabilisierung ihrer Liganden und damit der Verlängerung ihrer Halbwertszeit im Plasma bestehen⁸³⁻⁸⁶. Eine wichtige Rolle spielt das *Shedding* des L-Selektins während der Leukozytenrekrutierung, indem es zu einer vorübergehenden Aufhebung des Zellkontakts zum Endothel führt und somit die charakteristische rollende Bewegung der

Leukozyten erlaubt^{87,88}. Auch das Amyloid-Vorläuferprotein (APP) kann proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten werden. Dabei entstehen mehrere extrazelluläre Fragmente. Von diesen soll ein 42 Aminosäuren umfassendes Amyloid-beta (AP- β) Protein die Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung begünstigen⁸⁹.

Die größte Gruppe von Proteasen, die *Shedding*-Aktivität ausüben, sind Typ I transmembrane Proteine und gehören zu der Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen. Sie sollen im folgenden Abschnitt vorgestellt werden.

1.3.1. Die Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen

Die Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen (ADAMs) bilden zusammen mit den Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und den Schlangengift-Metalloproteinasen (SVMPs) die Superfamilie der Metzinkine^{90,91}. Die Bezeichnung „Disintegrin“ stammt von den ursprünglich aus Schlangengift isolierten gleichnamigen Proteinen und bezieht sich auf deren Eigenschaft, die durch Integrine vermittelte Bindung von Blutplättchen an Fibrin zu inhibieren^{92,93}. ADAMs sind mittlerweile in einem weiten Spektrum von Organismen, von der Hefe über die Fruchtfliege bis zum Menschen, gefunden worden^{93,94}. Sie gehören zum Typ I der membrangebundenen Proteine und sind folgendermaßen aufgebaut (Abb.4): Einer N-terminalen Pro-Domäne schließt sich eine katalytische Domäne an, gefolgt von einer Disintegrin-ähnlichen und einer Cystein-reichen Domäne, einer transmembranen und schließlich einer zytoplasmatischen Domäne^{93,95}. Bei manchen, aber nicht allen ADAMs, folgt auf die Cystein-reiche Domäne noch eine dem epidermalen Wachstumsfaktor (*Epidermal Growth Faktor*, EGF) ähnliche Domäne⁹³.

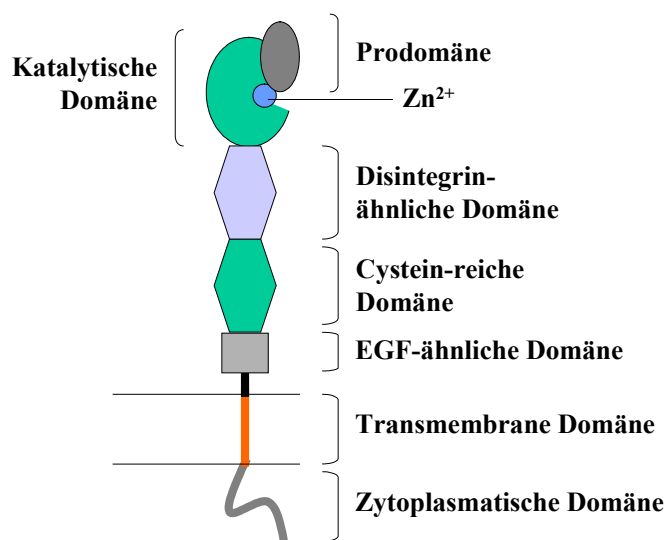


Abb.4 Schematischer Aufbau der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen. Auf eine Prodomäne folgt eine katalytische Domäne mit gebundenem Zn^{2+} . Es schließen sich eine Disintegrin-ähnliche sowie eine Cystein-reiche Domäne an, gefolgt von einer transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne. Die dem epidermalen Wachstumsfaktor ähnliche EGF-Domäne ist nur bei manchen, aber nicht allen ADAMs vorhanden. Um in einen katalytisch aktiven Zustand überführt zu werden, muss die Prodomäne, welche über einen Cysteinrest das Zn^{2+} gebunden hält, abgespalten werden.

Nicht alle der 29 bekannten ADAMs sind proteolytisch aktiv. Nachgewiesen ist eine solche Aktivität bisher für ADAM8, -9, -10, -12, -15, -17, -19 und 28⁹⁵⁻⁹⁷, wobei die Existenz einer charakteristischen Zink-bindenden Aminosäuresequenz innerhalb der katalytischen Domäne (im Einzelbuchstaben-Code mit X als beliebiger Aminosäure: HEXXHXXGXXH) entscheidend zu sein scheint⁹³⁻⁹⁵. Diese Sequenz findet sich nur bei 17 der 29 ADAMs⁹⁴. Aber auch die potentiell aktiven Vertreter liegen zunächst in einer inaktiven Proform vor und müssen in ihre aktive Form überführt werden. Erst nach Abspaltung des aminoterminalen Propeptids an einer Furinproteasespaltungsstelle wird das katalytisch aktive Zink, welches vorher von der Thiolgruppe eines im Propeptid liegenden Cysteins gebunden war, frei und das aktive Zentrum wird funktionsfähig⁹⁸.

Als erste ADAM, die bei Sheddingprozessen eine Rolle spielt, wurde ADAM17 entdeckt⁹⁹. ADAM17 ist maßgeblich an der Abspaltung des TNF- α von der Zelloberfläche beteiligt und wird daher auch als *TNF- α -converting enzyme* (TACE) bezeichnet. Dies wurde übereinstimmend sowohl in zellulären TNF- α -

Spaltungsversuchen mit gereinigter ADAM17 oder durch gezieltes Ausschalten des ADAM17-Gens gezeigt^{77,78}. Daneben spaltet ADAM17 noch viele weitere Transmembranproteine wie die *Transforming Growth Factor-alpha* (TGF- α) Proform¹⁰⁰, den TNF- α -2 Rezeptor¹⁰¹, den Interleukin-6-Rezeptor (IL6-R)¹⁰², den Notch-1-Rezeptor¹⁰³, das *Amyloid Precursor Protein* (APP)¹⁰⁴, den HER4 / erbB4-Rezeptor¹⁰⁵, das L-Selektin⁷⁸ und das zelluläre Prion Protein (PrP)¹⁰⁶.

ADAM10 wurde 1989 aus Rinderhirn als APP-degradierendes Enzym isoliert¹⁰⁷ und nach seiner Klonierung als ADAM klassifiziert¹⁰⁸. Durch Überexpression von ADAM10 gelang es, TNF- α -Konvertase-Aktivität¹⁰⁹ sowie α -Sekretaseaktivität bei der Spaltung des APPs¹¹⁰⁻¹¹² nachzuweisen. Zwar war es nicht möglich, mit ADAM10-defizienten Fibroblasten dessen physiologische Relevanz als α -Sekretase eindeutig zu belegen, jedoch konnte mit diesen Zellen die Bedeutung von ADAM10 bei der Spaltung des PrP¹⁰⁶, des IL6-R¹¹³ und des Notch-1 Rezeptors¹¹⁴ demonstriert werden. Damit sind mit TNF- α , PrP, IL6-R, Notch-1-Rezeptor und vielleicht auch APP eine Reihe von Substraten bekannt, die sowohl durch ADAM17 als auch durch ADAM10 gespalten werden können.

Inzwischen weiß man, dass die Abspaltung der Ektodomäne vieler transmembraner Moleküle durch Zellstimulation gesteigert werden kann. Der Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), ein Aktivator der Proteinkinase C (PKC), ist dabei ein häufig verwendeter *Shedding*-Induktor. Moleküle wie der IL6-Rezeptor^{80,100,113}, TGF- α ^{96,100}, L-Selektin^{78,100}, APP^{100,104} oder auch das transmembrane Chemokin CX3CL1 (siehe unten) werden nach PMA-Stimulation verstärkt von der Zelloberfläche abgespalten. Man unterscheidet daher zwischen zwei Formen des *Sheddings*, einerseits dem basalen oder konstitutiven *Shedding* und andererseits dem induzierten.

In bisher zwei Studien ist ADAM17 als die verantwortliche Protease für das PMA-induzierte, nicht aber das konstitutive CX3CL1-*Shedding* beschrieben worden^{115,116}. In diesen Arbeiten wurden stabil mit CX3CL1 transfizierte Epithel- oder Endothelzelllinien mit den Breitspektrum-Metalloproteinaseinhibitoren Phenantrolin und GM6001 behandelt. Beide Inhibitoren reduzierten konzentrationsabhängig die Produktion von löslichem CX3CL1, wobei GM6001 das PMA-induzierte *Shedding* nicht so effektiv inhibieren konnte wie das konstitutive- ein erster Hinweis auf die Beteiligung

unterschiedlicher Proteasen an konstitutivem und induziertem CX3CL1-*Shedding*¹¹⁶. Transfektionsexperimente mit mutierten CHO-Zellen^{100,115} und murinen Fibroblasten ohne ADAM17-Aktivität^{78,115,116} ergaben ein im Vergleich zu den Wildtypzellen unverändertes konstitutives, aber deutlich verringertes PMA-induziertes CX3CL1-*Shedding*^a. Diese Ergebnisse und der zusätzliche Befund, dass durch Retransfektion des Wildtyp-ADAM17 der PMA-Effekt wiederhergestellt werden konnte, wiesen auf ADAM17 als die für das induzierte CX3CL1-*Shedding* verantwortliche Protease hin, ohne allerdings die Frage nach dem Mechanismus des konstitutiven *Sheddings* zu beantworten.

Für das zweite transmembrane Chemokin, CXCL16, lagen bis zur vorliegenden Arbeit noch keine Untersuchungen zur Regulation durch *Shedding* vor, wenngleich aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zum CX3CL1 ADAM17 als beteiligte Protease vermutet wurde¹¹⁵.

^a Die Fibroblasten ohne funktionales ADAM17 wurden aus transgenen Mäusen isoliert, die homozygot für eine gezielte Mutation im ADAM17-Gen waren. Hierbei wurde die katalytische Zink-bindende Domäne durch eine für den Selektionsmarker Neomycin kodierende cDNA (Neomycin-Kassette) ersetzt⁷⁸.

2. Fragestellungen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die proteolytische Regulation der transmembranen Chemokine CX3CL1 und CXCL16 untersucht werden. Dabei ging es zunächst um die Frage, welche Protease für die konstitutive Entstehung von löslichem CX3CL1 verantwortlich ist. Weiterhin sollte die funktionale Bedeutung des *Sheddings* für die Funktion von CX3CL1 als Adhäsionsmolekül analysiert werden.

Die Entstehungsweise der löslichen Variante des verwandten CXCL16 war zu Beginn der Arbeit noch völlig ungeklärt. Es sollte die Hypothese geprüft werden, dass auch dieses Chemokin durch Disintegrin-ähnliche Metalloproteinasen prozessiert wird. Dabei ging es auch um die Frage, ob bekannte Aktivatoren von ADAMs wie zum Beispiel PMA die Entstehung von löslichem CXCL16 induzieren können und ob konstitutive und induzierte Freisetzung von unterschiedlichen Proteasen vermittelt wird. Um zu klären, ob CXCL16 in ähnlicher Weise wie CX3CL1 eine Rolle bei entzündungsbedingten Gefäßkrankheiten spielen könnte, sollte dessen Expression und Induzierbarkeit durch proinflammatorische Zytokine in vaskulären Zellen analysiert werden.

Schließlich sollten erstmalig Untersuchungen zur Expression von CXCL16 im Gehirn durchgeführt werden. Das primäre Ziel war, einen möglichst umfassenden Überblick über das Vorkommen des Chemokins auf mRNA- und Proteinebene in verschiedenen Zelltypen des Organs zu gewinnen und dabei auch Vergleiche zwischen gesundem und entartetem Gewebe vorzunehmen. Stimulationsversuche mit proinflammatorischen Zytokinen sowie Untersuchungen zum *Shedding* sollten Aufschluss über eine mögliche Beteiligung von CXCL16 bei Entzündungsvorgängen im Gehirn geben.

3. Ergebnisse

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sind in drei Veröffentlichungen erschienen:

Veröffentlichung 1

Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K, Hartmann D, Fahrenholz F, Postina R, Matthews V, Kallen KJ, Rose-John S, Ludwig A.

The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood*. 2003 Aug 15;102(4):1186-95.

Veröffentlichung 2

Abel S, Hundhausen C, Mentlein R, Schulte A, Berkhout TA, Broadway N, Hartmann D, Sedlacek R, Dietrich S, Muetze B, Schuster B, Kallen KJ, Saftig P, Rose-John S, Ludwig A.

The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J Immunol*. 2004 May 15;172(10):6362-72.

Veröffentlichung 3

Ludwig A, Schulte A, Schnack C, Hundhausen C, Reiss K, Broadway N, Held-Feindt J, Mentlein R.

Enhanced expression and shedding of the transmembrane chemokine CXCL16 by reactive astrocytes and glioma cells. Akzeptiert von *Journal of Neurochemistry*, Januar 2005.

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den Publikationen ausführlich dargestellt. Methoden, die eine detaillierte Beschreibung erfordern, werden in Fußnoten aufgeführt.

3.1. Die Disintegrin-ähnliche Metalloproteinase ADAM10 vermittelt die konstitutive Spaltung von CX3CL1 und reguliert die durch CX3CL1 verursachte Zell-Zell-Adhäsion (Veröffentlichung 1)

Das transmembrane Chemokin CX3CL1 oder Fraktalkin existiert in zwei Formen, einer membrangebundenen und einer löslichen, wobei letztere aus der ersten durch proteolytische Abspaltung der Ektodomäne hervorgeht, ein Vorgang, der als *Shedding* bezeichnet wird (siehe auch Einleitung, 1.3). Während die lösliche Variante bei Monozyten und T-Zellen Chemotaxis induziert, vermittelt die in der Membran verankerte Variante die feste Adhärenz dieser Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von löslichem CX3CL1 einerseits konstitutiv, das heißt, kontinuierlich und ohne weiteren Einfluss externer Stimuli, vonstatten geht, andererseits aber auch

induziert werden kann, zum Beispiel durch Phorbolster wie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA). Während Studien ergeben hatten, dass das PMA-induzierte *Shedding* von CX3CL1 durch die Metalloproteinase ADAM17 (ADAM17) vermittelt wird, blieb die für das konstitutive *Shedding* verantwortliche Protease unbekannt. Jene zu identifizieren und außerdem mehr über die biologische Funktion der membrangebundenen und löslichen Form des Chemokins zu erfahren, war Ziel der nachfolgenden Experimente.

3.1.1. Konstitutive und induzierbare Freisetzung von löslichem CX3CL1

Die ersten Versuche dienten der Etablierung eines Systems, in dem konstitutive und induzierbare Freisetzung von CX3CL1 verlässlich beobachtet werden konnten. Hierbei erwiesen sich stabil mit CX3CL1 transfizierte ECV-304-Zellen, die bereits in mehreren Arbeiten zur Untersuchung der CX3CL1-Regulation verwendet worden waren¹¹⁶⁻¹¹⁸, als besonders geeignet. Die Zelllinie ECV-304 wurde ursprünglich als humane Endothelzelllinie beschrieben¹¹⁹, später aber korrekterweise als Blasenkarzinomzelllinie mit „endothelialen Merkmalen“ identifiziert¹²⁰. Sie zeichnet sich durch ein lückenloses, einschichtiges Wachstum aus.

Das primäre Ziel war der Nachweis der membranassoziierten und der löslichen Variante von CX3CL1 im Western Blot. Hierzu wurden verschiedene Antikörper gegen humanes CX3CL1 getestet, wobei ein von GlaxoSmithKline (GSK) hergestelltes Antiserum die größte Sensitivität zeigte. Da dieses gegen die Chemokin-Domäne von CX3CL1 gerichtet war, gelang sowohl die Detektion der membrangebundenen Form in den Zelllysaten als auch die der löslichen Form in den Zellüberständen. In den Lysaten fand sich eine Bande bei ca. 95 kD und in den Überständen eine bei ca. 80 kD. Da keine dieser Banden in den untransfizierten Wildtyp-ECV-304-Zellen (WT-ECV-304) detektiert wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich tatsächlich um die beiden Formen des Chemokins handelte.

In den folgenden Experimenten sollte der Mechanismus, der zur Entstehung von löslichem CX3CL1 führt, näher untersucht werden. Dazu dienten von uns als *Sheddingassays*^b bezeichnete Versuche und Analysen im Durchflußzytometer^c. Das

^b Durchführung der *Sheddingassays*: CX3CL1-ECV-304-Zellen wurden in 6-Loch-Platten bis zu ca. 90% Konfluenz angezogen. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit 37°C warmem sterilem *Phosphate*

Prinzip der *Sheddingassays* bestand darin, dass CX3CL1-exprimierende Zellen, in diesem Fall CX3CL1-ECV-304-Zellen, für einen definierten Zeitraum in An- oder Abwesenheit von PMA inkubiert wurden und im Anschluss daran die Zellüberstände auf ihr Gehalt an löslichem CX3CL1 im Western Blot oder mit Hilfe des *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) analysiert wurden. Die Zugabe des Breitspektrum-Metalloproteinaseinhibitors Batimastat zu unstimulierten oder PMA-behandelten Zellen sollte erste Informationen über die Beteiligung von Metalloproteinasen an der Entstehung von löslichem CX3CL1 liefern.

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie war es möglich, die Expression des membranständigen CX3CL1 auf der Zelloberfläche zu erfassen und Veränderungen nach Stimulation mit PMA oder Einsatz von Inhibitoren zu verfolgen. Bestätigte sich die Hypothese des CX3CL1-*Sheddings*, sollte die Freisetzung von löslichem CX3CL1 mit einer Abnahme der membranassoziierten Form auf der Zelloberfläche korrespondieren und damit zu einem abnehmendem Signal im Durchflußzytometer führen.

Im Western Blot zeigte sich für jede Inkubationszeit eine gegenüber den unbehandelten Proben deutliche Zunahme des löslichen CX3CL1 im Zellüberstand der PMA-stimulierten Zellen (Abb.1a, Veröffentl.1). Diese auf den PMA-Effekt zurückzuführende Zunahme wurde als induziertes *Shedding* definiert, im Gegensatz zu dem konstitutiven der unstimulierten Zellen. Die Größe des detektierten CX3CL1-

Buffered Saline (PBS) wurden 700 µl serum-freies Medium pro Vertiefung hinzugefügt. Die Verwendung von serum-freiem Medium war notwendig, weil Vorversuche ergeben hatten, dass das im Serum enthaltene Albumin die Detektion von CX3CL1 im Western Blot erschwerte. Die Zellen wurden für eine, zwei oder drei Stunden mit 200 ng/ml PMA stimuliert oder unstimuliert belassen. Bei Einsatz des Breitspektrum-Metalloproteinaseinhibitor Batimastat wurden die Zellen 10 Minuten mit dem Inhibitor vorinkubiert, um eine möglichst effektive Blockade der Metalloproteinase-Aktivität zu erreichen. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeiten wurden die Zellüberstände abgenommen, zentrifugiert (Entfernung von Zelldebris) und mit einem Protease-Inhibitor-Mix versetzt. Für eine Detektion des löslichen Chemokins im Western Blot mussten die Überstände ca. 10fach konzentriert werden, was mit Hilfe von Konzentratoren erreicht wurde. Die Zelllysate wurden durch Abkratzen der Zellen auf Eis in 500 µl Lysispuffer (PBS, 1% Triton-X-100, Protease-Inhibitor-Mix) pro Probe hergestellt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis unter Schütteln wurden die Lysate abzentrifugiert und wie die Überstände bei -20°C bis zur Analyse in der Gelelektrophorese oder im ELISA gelagert.

^o Präparation der Zellen für die Durchflußzytometrie: Nach Beendigung des *Sheddingassays* wurden die Zellüberstände abgenommen, die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend vorsichtig auf Eis in PBS abgekratzt. Nach Zentrifugation und Fixierung mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung wurden die Zellen mit einem Phycoerythrin- (PE)-gekoppelten monoklonalen anti-CX3CL1-Antikörper bzw. einer Isotyp-Kontrolle für 1 Stunde inkubiert. Nach zweimaligem Waschen und Resuspendierung in PBS wurde das Fluoreszenzsignal der markierten Zellen im Durchflußzytometer gemessen.

Fragments von ca. 80 kD entsprach derjenigen, die für das lösliche CX3CL1 in Endothelzellen und glatten Muskelzellen bestimmt worden war^{38,118}. Sowohl das konstitutive als auch das PMA-induzierte CX3CL1-*Shedding* wurde deutlich durch Batimastat inhibiert (Abb.1b, Veröffentl.1). In Übereinstimmung mit dem Anstieg des löslichen CX3CL1 nach PMA-Stimulation konnte mit Hilfe der Durchflußzytometrie eine Abnahme des membrangebundenen CX3CL1 auf der Zelloberfläche gemessen werden. Bereits nach einer Stunde Inkubation war die Mittlere Fluoreszenz-Intensität (MIF) der PMA-stimulierten Zellen um 55% reduziert gegenüber den nicht behandelten Zellen. Der Einsatz von Batimastat führte sowohl bei unstimulierten als auch bei PMA-stimulierten Zellen zu einem Anstieg der MIF auf einen gemeinsamen Wert, der um ca. 100% höher lag als der nicht behandelte Zellen (Abb.1c, Veröffentl.1). Das bedeutete, dass in den CX3CL1-ECV-304-Zellen ca. zwei Drittel des *Sheddings* konstitutiv bedingt und nur ein Drittel induzierbar war. Die Inhibition der Produktion von löslichem CX3CL1 durch Batimastat zeigte die Beteiligung von Metalloproteinasen an beiden Formen des *Sheddings*.

3.1.2. Unterschiedliche Regulation von konstitutivem und induziertem CX3CL1-*Shedding*

Um die Identität der am CX3CL1-*Shedding* beteiligten Proteasen näher einzugrenzen, wurden in weiteren Experimenten die natürlich vorkommenden Metalloproteinase-Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 verwendet. Beide Inhibitoren sind für eine Reihe von membrangebundenen sowie löslichen Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) wirksam, wobei TIMP-1, nicht aber TIMP-2, zusätzlich die Aktivität von ADAM10 inhibiert¹²¹. Andere Mitglieder der ADAM-Familie wie z.B. ADAM8 oder ADAM9, werden von diesen TIMPs nicht reguliert¹²².

Die quantitative Analyse der Western Blot-Signale mittels Densitometrie ergab zunächst, dass TIMP-2 keinen Einfluss auf die Entstehung von löslichem CX3CL1 hatte. Dagegen konnte TIMP-1 in der höchsten eingesetzten Konzentration von 200nM das CX3CL1-*Shedding* in den unbehandelten Zellen um bis zu 60% reduzieren. In den PMA-stimulierten Zellen wurde nur eine Reduktion um maximal 36% festgestellt. Dabei blieb der auf den PMA-Effekt zurückzuführende Anteil an löslichem CX3CL1

nahezu konstant. Diese Ergebnisse wiesen auf ADAM10 als die für das konstitutive CX3CL1-*Shedding* wichtigste, wenn auch nicht notwendigerweise einzige, Protease hin.

Zur weiteren Untersuchung der möglichen Beteiligung von ADAM10 am *Shedding* von CX3CL1 wurden zwei Metalloproteinase-Inhibitoren (GI254023X und GW280264X, im folgenden GI und GW genannt) eingesetzt, die selektiv die Aktivität von ADAM10 bzw. ADAM10 plus ADAM17 blockieren¹²³. Diese bei GlaxoSmithKline (GSK) in Stevenage, UK, entwickelten und uns im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellten Inhibitoren wirken durch eine Hydroxamat-Gruppe, die das Zink-Ion der katalytischen Domäne der Metalloproteinasen bindet und so deren Aktivität hemmt. (Abb.2B, Veröffentl.1). Als ein Maß für die Wirksamkeit von Inhibitoren enzymatischer Reaktionen gelten die sogenannten IC₅₀-Werte. IC₅₀ steht für *Inhibitor Concentration 50%* und bezeichnet diejenige Inhibitorkonzentration, die zu halbmaximaler Inhibition des jeweiligen Enzyms führt. Im Falle von GI und GW wurde die Inhibition der Spaltung von speziellen Peptiden durch die Ektodomänen von rekombinantem humanem ADAM17 oder ADAM10 gemessen¹²⁴. Die IC₅₀-Werte von GI und GW verdeutlichen, dass GW ADAM10 und ADAM17 vergleichbar gut inhibiert, GI dagegen nur ADAM10 bzw. ADAM17 mit 100fach reduzierter Wirksamkeit (Tab.1, Veröffentl.1). GW und GI werden daher im Folgenden auch als „kombinierter ADAM10/ADAM17-Inhibitor“ und „selektiver ADAM10-Inhibitor“ bezeichnet. In den *Shedding*-versuchen wurden sie generell 10 Minuten vor Stimulation der Zellen zu diesen hinzugegeben.

Die Analyse der Zellüberstände im Western Blot ergab, dass GW konzentrationsabhängig sowohl das konstitutive als auch das PMA-induzierte CX3CL1-*Shedding* inhibiert, GI dagegen nur das konstitutive (Abb. 2B, Veröffentl.1). Diese unterschiedliche Wirkungsweise der Inhibitoren wurde durch Experimente im Durchflußzytometer bestätigt (Abb. 2C, Veröffentl.1): Während ohne Einsatz von Inhibitoren eine einstündige Stimulation der Zellen mit PMA die CX3CL1-Expression auf der Zelloberfläche um 53% reduzierte, wurde dieser Effekt in Anwesenheit des kombinierten ADAM10/ADAM17-Inhibitors vollständig aufgehoben, in Anwesenheit des selektiven ADAM10-Inhibitors jedoch nicht. Um die Frage zu beantworten, ob CX3CL1 auch in primären Zellen ähnlich reguliert wird, wurde der Befund genutzt,

dass die Expression des Chemokins in glatten Muskelzellen durch Kostimulation mit IFN- γ und TNF- α induzierbar ist³⁸. Glatte Muskelzellen der Aorta wurden für 24 Stunden mit einer Kombination aus je 20 ng/ml IFN- γ und TNF- α stimuliert und anschließend mit PMA bzw. den Inhibitoren behandelt. Auch hier konnte der selektive ADAM10-Inhibitor GI hauptsächlich die konstitutive, nicht aber die durch PMA induzierte Produktion von löslichem CX3CL1 blockieren. Insgesamt festigten diese Ergebnisse die Hypothese, dass ADAM10 für das konstitutive *Shedding* des Chemokins verantwortlich ist. Außerdem bestätigten sie die in der Literatur beschriebene Rolle von ADAM17 für das PMA-induzierte CX3CL1-*Shedding*^{115,116}.

3.1.3. Verstärkung des konstitutiven CX3CL1-*Sheddings* durch ADAM10-Überexpression

Durch Überexpression von ADAM10 und CX3CL1 in COS-7-Zellen sollte der direkte Effekt einer verstärkten Protease-Aktivität auf das *Shedding* des Chemokins untersucht werden. COS-7 ist die Bezeichnung für eine Primaten-Fibroblastenzelllinie, die sehr effizient transient transfiziert werden kann (80-90%) und daher hohe Proteinausbeuten liefert. In einem Vorversuch wurden COS-7-Zellen nur mit CX3CL1 transfiziert und sowohl der PMA-Effekt als auch die Wirkung der Inhibitoren GI und GW auf das CX3CL1-*Shedding* untersucht. 48 Stunden nach Transfektion der COS-7-Zellen wurde ein einstündiger *Shedding*-Versuch durchgeführt und anschließend die Konzentrationen des löslichen CX3CL1 in den Zellüberständen mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bestimmt^d.

In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen inhibierte der selektive ADAM10-Inhibitor GI hauptsächlich das konstitutive und der kombinierte ADAM10/ADAM17-

^d Aufbau des CX3CL1-ELISAs: Eine 96-Loch-ELISA-Platte wurde über Nacht mit 2 μ g/ml eines monoklonalen murinen Antikörpers gegen humanes CX3CL1 beschichtet. Bereiche der Plastikoberfläche, an die der Antikörper nicht gebunden hatte, wurden mit 2% Albumin aus Rinderserum in PBS abgesättigt. Nach Zugabe der zu untersuchenden Zellüberstände oder -lysate und zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde das an den Erst-Antikörper gebundene CX3CL1-Protein mit einem zweiten, Biotin-gekoppelten monoklonalen Antikörper gegen CX3CL1 detektiert. Dieser wurde in einem nächsten Schritt von dem Streptavidin-Anteil eines hinzugefügten Streptavidin-Peroxidase (POD)-Konjugates erkannt. Die Zugabe eines POD-Substrates führte schließlich zu einer Farbreaktion, deren Intensität mit den CX3CL1-Konzentrationen in den Proben korrelierte. Die Reaktion wurde nach 20 Minuten mit 1,8M Schwefelsäure abgestoppt und anschließend die Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda=450$ nm im Photometer gemessen.

Inhibitor GW sowohl konstitutives als auch PMA-induziertes CX3CL1-*Shedding* (Abb.3A, Veröffentl.1). Interessanterweise konnten aber weder GI und GW noch Batimastat, obwohl in hohen Konzentrationen bis zu 30 μ M angewendet, die Produktion von löslichem CX3CL1 vollständig blockieren. Letzterer Inhibitor reduzierte das *Shedding* zwar um bis zu 84%, dennoch waren offensichtlich noch andere, möglicherweise von Metalloproteaseaktivität unabhängige Faktoren am konstitutiven CX3CL1-*Shedding* beteiligt.

Für die Überexpression von ADAM10 in COS-7-Zellen wurde ein Konstrukt mit einem Hämagglutinin (HA)-TAG^e gewählt (ADAM10-HA), welches bereits erfolgreich für den Nachweis der ADAM10-vermittelten APP-Spaltung eingesetzt wurde¹¹². Auf diese Weise konnte im Western Blot die transfizierte Protease von der endogen vorhandenen unterschieden werden. Der Nachweis mit Hilfe eines anti-HA-Antikörpers führte zu zwei Signalen bei ca. 90 und 65 kD, die die Pro-Form bzw. die mature Form von ADAM10 repräsentierten (Abb.3C, Veröffentl.1). Kontroll-Transfektionen wurden mit CX3CL1 und dem leeren Expressionsvektor sowie CX3CL1 und einer dominant-negativen Mutante von ADAM10 (DN-ADAM10), deren Expression die Wildtyp-Protease kompetitiv hemmen sollte, durchgeführt. Während die Überexpression von ADAM10-HA, der aktiven Protease, in einem Anstieg des löslichen CX3CL1 um 77% verglichen mit der Leervektor-Kontrolle resultierte, bewirkte die ADAM10-Mutante einen signifikanten Rückgang des *Sheddings* um 26% (Abb. 3C, Veröffentl.1). Die relative Zunahme des CX3CL1-*Sheddings* nach PMA-Stimulation blieb in allen Fällen unverändert. Diese Ergebnisse zeigten, dass Veränderungen der ADAM10-Aktivität die konstitutive Ektodomänabspaltung des Chemokins beeinflussen, die PMA-induzierte aber erwartungsgemäß nicht.

3.1.4. Reduktion des konstitutiven CX3CL1-*Sheddings* in ADAM10-defizienten embryonalen Maus-Fibroblasten

In einem weiteren Ansatz, die Rolle von ADAM10 für die konstitutive Spaltung von CX3CL1 zu untersuchen, wurden embryonale Wildtyp-Maus-Fibroblasten und embryonale Maus-Fibroblasten aus gentechnisch hergestellten ADAM10-defizienten

^e Das HA-TAG wurde durch Fusion einer für das HA-Epitop (YPYDVPDYA) kodierenden cDNA mit dem intrazellulären C-Terminus der cDNA für bovines ADAM10 hergestellt.

Mäusen auf ihr CX3CL1-*Shedding*-Verhalten analysiert. Die ADAM10-Defizienz wurde durch Einfügen einer Neomycin-Kassette an Nukleotid-Position 187 des Gens erreicht. Während heterozygote ADAM10^{-/+}-Mäuse einen normalen Phänotyp aufwiesen, waren homozygote ADAM10^{-/-}-Mäuse nicht lebensfähig und starben spätestens am Tag 9,5 der Embryogenese¹¹⁴. Sowohl die Wildtyp-Fibroblasten als auch die ADAM10-defizienten Zellen wurden uns freundlicherweise von Professor Paul Saftig (Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität, Kiel) zur Verfügung gestellt. Die Charakterisierung der Zelllinien im Western Blot ergab wie erwartet die Präsenz der Pro-Form sowie der maturen Form von ADAM10 in den Wildtyp-Zellen und das Fehlen derselben in den ADAM10-defizienten Fibroblasten (Abb. 4A, Veröffentl.1)^f.

In dem Kulturmedium der ADAM10-defizienten, unstimulierten Zellen war der Anteil des löslichen CX3CL1 um 61% niedriger als in dem der unbehandelten Wildtyp-Zellen, wobei der ADAM10-selektive Inhibitor GI diesen Prozentsatz erwartungsgemäß nicht weiter verringerte. Auf der anderen Seite war in beiden Zelllinien die nach PMA-Stimulation beobachtete zusätzliche Freisetzung an löslichem CX3CL1 ähnlich hoch (Abb. 4B, Veröffentl.1).

Insgesamt ergab sich folgendes Bild zur proteolytischen Regulation von CX3CL1 (Abb.5): Durch die Aktivität von Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen kommt es zur Abspaltung der Ektodomäne des auf der Zelloberfläche exprimierten Chemokins und damit zur Bildung eines löslichen Fragments. Dieser als *Shedding* bezeichnete Vorgang findet in den untersuchten Zelllinien (ECV-304, COS-7, murine embryonale Fibroblasten) konstitutiv statt, das heißt kontinuierlich und unabhängig von externen Stimuli. Die Behandlung der Zellen mit PMA führt zu einer Verstärkung des *Sheddings*, das heißt, zu einer vermehrten Produktion des löslichen Fragments bei gleichzeitiger Abnahme der membranständigen Form. Der Einsatz von Inhibitoren, die ADAM10,

^f Da Vorversuche zur Transfizierbarkeit beider Zelltypen unter Verwendung eines *Green Fluorescent Protein* (GFP)-kodierenden Vektors zum Teil deutliche Unterschiede in den Transfektionseffizienzen ergaben, mussten die im ELISA gemessenen Werte für das lösliche CX3CL1 normiert werden. Deshalb wurden zusätzlich auch die Konzentrationen des membranassoziierten CX3CL1 bestimmt und dann der Anteil des *Sheddings* nach folgender Formel berechnet: $[A] * 100 / ([A] + [B]) = \% \textit{Shedding}$, wobei [A] die Konzentration an löslichem und [B] die Konzentration an membranassoziiertem CX3CL1 bezeichnet. Die einstündigen *Shedding*-Experimente wurden wie gewohnt zwei Tage nach der Transfektion mit CX3CL1 in Gegenwart oder Abwesenheit von PMA in serum-freiem Medium durchgeführt.

aber nicht ADAM17 hemmen (TIMP-1, GI254023X), resultiert in einer Reduktion des konstitutiven, nicht aber des PMA-induzierten *Sheddings*. Letzteres wird nur durch den kombinierten ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW blockiert, wobei das konstitutive nicht weiter verringert wird als durch den ADAM10-selektiven Inhibitor GI alleine. Die Überexpression von ADAM10 in COS-7-Zellen verstärkt die Produktion von löslichem CX3CL1 und in ADAM10-defizienten Maus-Fibroblasten ist nur die konstitutive, nicht aber die durch PMA induzierte Spaltung des Chemokins vermindert.

Daher kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass ADAM10 die wichtigste Protease für das konstitutive *Shedding* von CX3CL1 ist, während ADAM17 sehr wahrscheinlich zu dem durch PMA induzierten *Shedding* des Chemokins beiträgt.

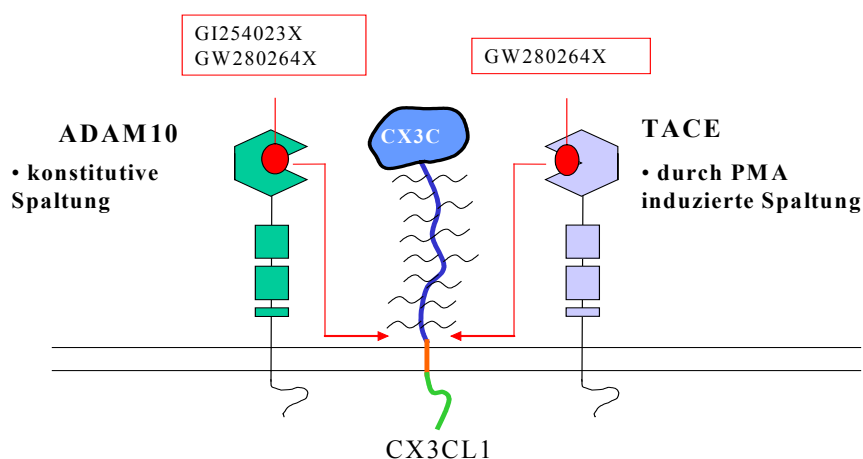


Abb.5 Schematische Darstellung der differentiellen Regulation der proteolytischen Ektodomänsplattung (*Shedding*) von CX3CL1. Das als membranständiges Molekül auf der Zelloberfläche exprimierte CX3CL1 unterliegt dem Prozeß der Abspaltung seiner Ektodomäne durch die Aktivität von Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen. Dieser als *Shedding* bezeichnete Vorgang führt zur Entstehung eines löslichen, chemotaktisch aktiven Fragments. Man unterscheidet zwischen der kontinuierlichen, von externen Stimuli unabhängigen Spaltung des Moleküls (konstitutives *Shedding*) und der induzierten Spaltung, in diesem Fall hervorgerufen durch die Behandlung der Zellen mit dem Phorbol ester PMA (PMA-induziertes *Shedding*). Die konstitutive Entstehung von löslichem CX3CL1 kann sowohl durch den selektiven ADAM10-Inhibitor GI254023X (GI) als auch durch den kombinierten ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW280264X (GW) blockiert werden, während die durch PMA induzierte Spaltung des Chemokins nur durch letzteren Inhibitor gehemmt wird. Die Inhibitor Daten sowie Experimente zur Überexpression von ADAM10 und Studien zum CX3CL1-*Shedding* in ADAM10-defizienten Maus-Fibroblasten (siehe Text) weisen darauf hin, dass ADAM10 die wichtigste Protease für die konstitutive Spaltung von CX3CL1 ist, während

ADAM17 sehr wahrscheinlich an der durch PMA induzierten Freisetzung des Chemokins beteiligt ist.

3.1.5. Verminderte Adhäsionseigenschaften CX3CL1-exprimierender Zellen durch *Shedding*

Die Chemokindomäne der membranständigen Form von CX3CL1 vermittelt die Adhäsion von Zellen, die den Rezeptor für das Chemokin, CX3CR1, tragen. Damit besitzt CX3CL1 eine Eigenschaft, die in erster Linie die Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle (*Cellular Adhesion Molecules*, CAM) auszeichnet. Ungeklärt war bisher die Frage, ob *Shedding* von CX3CL1 zu einer signifikanten Verminderung der Adhäsionseigenschaften CX3CL1-exprimierender Zellen führt. Darüber sollten *Adhäsionsassays*[§] Aufschluss geben. In diesen Versuchen wurden CX3CR1-positive Zellen der monozytären Zelllinie THP-1¹¹⁸ mit dem fluoreszierenden Farbstoff Calcein markiert und zu CX3CL1-ECV-304-Zellen gegeben, die entweder unstimuliert oder mit PMA oder den Metalloproteinase-Inhibitoren GI und GW behandelt waren. Nach Entfernen der ungebundenen Zellen durch Waschen mit PBS wurde die Anzahl der auf den ECV-Zellen verbliebenen Monozyten mit Hilfe eines Fluoreszenzmeßgerätes bestimmt.

Zunächst war festzustellen, dass in Abwesenheit von Stimuli oder Inhibitoren die Anzahl der an die CX3CL1-ECV-304-Zellen bindenden THP-1-Zellen um ein Vielfaches höher war als die, die an die Wildtyp-ECV-304-Zellen adhärten (Abb. 5A, Veröffentl.1). Dies verdeutlichte, dass die stabilste Form der Adhärenz hauptsächlich durch CX3CL1 vermittelt wurde und dass die von CX3CL1 unabhängige Bindung von THP-1-Zellen zum größten Teil schwächer war und den Waschschritten nicht

[§] Durchführung der *Adhäsionsassays*: Wildtyp- und CX3CL1-exprimierende ECV-304-Zellen wurden in einer Dichte von 6×10^4 Zellen pro Vertiefung in 24-Loch-Platten ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Zu Versuchsbeginn wurde das *Shedding* von CX3CL1 durch Stimulation mit PMA (200 ng/ml) induziert, und zwar für eine Stunde in Gegenwart oder Abwesenheit der Metalloproteinaseinhibitoren GI oder GW. Danach wurden THP-1-Zellen, die mit dem fluoreszierenden Farbstoff Calcein markiert worden waren, in einer Dichte von 3×10^5 Zellen pro Vertiefung zu den ECV-304-Zellen gegeben. Um eine möglichst gleichmäßige und schnelle Adhäsion der THP-1-Zellen zu erreichen, wurde die Platte bei 100g für drei Minuten zentrifugiert. Nach anschließender Inkubation der Zellen bei 37°C für 20 Minuten und zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Fluoreszenz der adhärenen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet bzw. mit Hilfe eines Fluoreszenz-Meßgeräts genau bestimmt. Um Dauer und Stärke der Adhärenz zu erfassen, wurde die Fluoreszenz zum Teil nach jedem Waschschriff gemessen.

standhielt. Nach Vorbehandlung der Epithelzellen mit PMA reduzierte sich die Zahl der an die CX3CL1-ECV-304 Zellen bindenden Monozyten deutlich, während die Zahl der an die Wildtyp-ECV-304-Zellen bindenden THP-1-Zellen nicht weiter reduziert wurde (Abb. 5B, Veröffentl.1). Der Einsatz beider Inhibitoren GI und GW führte zu einer Zunahme adhärenter Monozyten, obwohl bei gleichzeitiger PMA-Stimulation nur der kombinierte ADAM10/ADAM17 Inhibitor GW in der Lage war, den PMA-induzierten Rückgang an gebundenen THP-1-Zellen wieder umzukehren (Abb. 5C, Veröffentl.1).

Die Ergebnisse zeigten, dass *CX3CL1-Shedding* eine deutliche Verminderung der Adhäsionseigenschaften CX3CL1-exprimierender ECV-304-Zellen zur Folge hat und dass die Inhibition von ADAM10 ausreichend ist, um diese Eigenschaften wieder zu verbessern. Allerdings ist zusätzlich die Inhibition von ADAM17 erforderlich, um Verluste in der Adhäsionsfähigkeit der Epithelzellen nach PMA-Stimulation wieder auszugleichen.

In weiteren Experimenten wurde festgestellt, dass durch *Shedding* von CX3CL1 auch bereits gebundene Zellen wieder von ihrem Substrat abgelöst werden können. Nach 30minütigem intensivem Waschen mit PBS waren nur noch 10-20 % der THP-1-Zellen an ihre Unterlage, eine konfluente Schicht CX3CL1-exprimierender ECV-304-Zellen, gebunden. Dieser Effekt des Ablösens der THP-1-Zellen konnte gleichermaßen gut sowohl von dem selektiven ADAM10- als auch dem kombinierten ADAM10/ADAM17-Inhibitor verhindert werden. Nach 30 Minuten Waschen in Gegenwart von 3 oder 10 μ M Inhibitor waren immer noch 60-70% der THP-1-Zellen adhären. Im Gegensatz dazu blieb bei den Wildtyp-ECV-304-Zellen der Anteil gebundener THP-1-Zellen auch in Gegenwart der Inhibitoren konstant gering (Abb.6, Veröffentl.1).

Inwieweit die beobachtete Ablösung CX3CR1-positiver Zellen von ihrem zellulären Substrat infolge von *CX3CL1-Shedding* einen physiologischen Vorgang widerspiegelt, bleibt offen. Eine mögliche *in vivo*-Relevanz wird an späterer Stelle diskutiert (siehe 4. Diskussion).

3.2. Der transmembrane CXC-Chemokinligand 16 wird durch IFN-gamma und TNF-alpha induziert und durch die Disintegrin-ähnliche Metalloprotease ADAM10 gespalten (Veröffentlichung 2)

In dieser Arbeit wurde der Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die CXCL16-Expression in vaskulären Zellen untersucht und der Frage nach der Entstehung löslichen CXCL16 nachgegangen. Im Falle einer Regulation durch *Shedding* sollten konstitutive und induzierbare Mechanismen analysiert und die beteiligten Metalloproteinasen identifiziert werden.

3.2.1. Entstehung von löslichem CXCL16

Um den Mechanismus für die Entstehung von löslichem CXCL16 zu untersuchen, wurde zunächst CXCL16-cDNA aus PMA-stimulierten THP-1-Zellen generiert und mit einem C-terminalen HA-Tag versehen (Abb. 1A, Veröffentl.2). COS-7-Zellen wurden transient mit diesem Konstrukt transfiziert und die Zelllysate im Western Blot analysiert (Abb. 1B, Veröffentl.2). Die Detektion mit einem HA-spezifischen Antikörper führte zu einem starken Signal bei ca. 49 kD und einem sehr schwachen bei ca. 30 kD. Da keine dieser Banden in den untransfizierten Kontroll-Lysaten vorkam, handelte es sich vermutlich in beiden Fällen um CXCL16. Auch in stabil mit CXCL16 transfizierten ECV-304-Zellen wurden zwei Banden der gleichen Größe detektiert. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen die Chemokin-Domäne von CXCL16 konnte in den konzentrierten COS-7-Zellüberständen ein ca. 32 kD-Protein detektiert werden, das in der Kontrolle nicht vorhanden war und deshalb sehr wahrscheinlich lösliches CXCL16 repräsentierte.

Um erste Hinweise auf den Regulationsmechanismus des Chemokins zu erhalten, wurden *Shedding*-Versuche mit CXCL16-transfizierten COS-7-Zellen in Anwesenheit des Breitspektrum-Metalloproteinase-Inhibitors Batimastat bzw. des ADAM10-selektiven Inhibitors GI sowie des kombinierten ADAM10/ADAM17-Inhibitors GW durchgeführt (zur Methodik siehe auch 3.1.1. und 3.1.2.). Die eingesetzten Inhibitor-

Konzentrationen lagen zwischen 0,15 und 10 μ M. Sowohl die Zellüberstände als auch die Zelllysate wurden auf ihren CXCL16-Gehalt im ELISA analysiert^h.

Alle drei Inhibitoren blockierten konzentrationsabhängig die Produktion von löslichem CXCL16 und führten gleichzeitig zu einer Zunahme der membrangebundenen Form (Abb. 1D, Veröffentl.2). Die Ähnlichkeit der Inhibitionsprofile war aufgrund des viel breiteren Wirkungsspektrums von Batimastat verglichen mit den ADAM-spezifischen Inhibitoren GI und GW nicht unbedingt erwartet. Dass sich der selektive ADAM10-Inhibitor GI und der kombinierte ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW in ihrer Wirkung nicht unterschieden, deutete darauf hin, dass ADAM17 für die Entstehung von löslichem CXCL16 in unstimulierten Zellen keine Rolle spielt, ADAM10 dagegen eine wichtige.

Der Frage nach einer möglicherweise Spezies-abhängigen Regulierung des Chemokins sollte durch einen Vergleich mit murinem CXCL16, das in seiner Aminosäuresequenz zu 49% dem humanen homolog ist, nachgegangen werden. Dazu wurde murine CXCL16 cDNA aus der Milz generiert und transient in COS-7-Zellen transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurde ein achtstündiger *Shedding*-Versuch in serum-freiem Medium durchgeführt und anschließend die Zelllysate sowie die konzentrierten Zellüberstände im Western Blot analysiert. Die Immunfärbung erfolgte mit einem Antiserum gegen murines CXCL16.

Im Zelllysate wurden ähnlich wie bei humanem CXCL16 zwei Banden detektiert, eine sehr prominente bei ca. 48 kD und eine wesentlich schwächere bei ca. 30 kD. Im Zellüberstand fand sich ein ca. 32 kD-Fragment, das in Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen dem löslichen CXCL16 entsprach (Abb.1E, Veröffentl.2). Der selektive ADAM10-Inhibitor GI konnte die Produktion dieses CXCL16-Fragments fast vollständig blockieren und bewirkte gleichzeitig eine Zunahme der 48 kD membranassoziierten Form, nicht aber der 30 kD-Variante (Abb. 1F, Veröffentl.2). Dies wies darauf hin, dass die 32 kD lösliche Form sowohl des humanen als auch des

^h Die ELISA-Platte wurde mit 2 μ g/ml eines monoklonalen anti-humanen CXCL16-Antikörpers (R&D Systems) beschichtet und zur Detektion wurden 200 ng/ml eines aufgereinigten, biotinylierten anti-humanen CXCL16-Antiserums verwendet.

murinen CXCL16 durch Metalloproteinase-vermittelte Proteolyse eines membranständigen, ca. 48 kD großen Moleküls gebildet wird.

3.2.2. Regulation von CXCL16 auf der Zelloberfläche

Die bisherigen Experimente ließen vermuten, dass die Entstehung von löslichem CXCL16 durch Sheddingvorgänge auf der Zelloberfläche zu erklären ist. Mit Hilfe der Durchflußzytometrie sollte dies überprüft werden. Zunächst wurde getestet, ob die gewählte Antikörper-Kombination aus gereinigtem anti-humanem CXCL16-Serum aus dem Kaninchen und Fluorescein-gekoppeltem anti-Kaninchen IgG für die Detektion von CXCL16 auf der Zelloberfläche von CXCL16-ECV-304-Zellen geeignet ist. Dass dies der Fall war, zeigte sich an dem deutlichem Signal, dass für CXCL16-positive ECV-304-Zellen, aber nicht für die Wildtyp-Zellen erhalten wurde (Abb. 2A, Veröffentl.2). Die Verwendung des ADAM10-selektiven Inhibitors GI führte in konzentrationsabhängiger Weise zu einer Zunahme der CXCL16-Expression auf der Zelloberfläche (Abb. 2B, Veröffentl.2). Die Analyse der Zellüberstände im ELISA ergab eine entsprechende Abnahme der Konzentrationen für das lösliche Chemokin. Damit gab es einen ersten Anhaltspunkt für die Regulation von CXCL16 durch ADAM10-vermitteltes *Shedding*.

3.2.3. Beteiligung von ADAM10 am konstitutiven CXCL16-*Shedding*

Um die Rolle von ADAM10 für das konstitutive CXCL16-*Shedding* weiter zu untersuchen, wurden die bereits unter 3.1.4. erwähnten ADAM10-defizienten (ADAM10^{-/-}) Maus-Fibroblasten verwendet. Ihre Defizienz für ADAM10-Proteinexpression konnte im Western Blot mit einem spezifischen Antiserum gegen murines ADAM10 bestätigt werden, genauso wie die Existenz sowohl der Pro-Form als auch der maturen Form des Proteins in den Wildtyp-Zellen (Abb. 3A, Veröffentl.2). Um mögliche ADAM10-unabhängige Unterschiede im Sheddingverhalten beider Zelllinien auszuschließen, wurde zusätzlich funktionales ADAM10 stabil in die ADAM10^{-/-} - Zellen retransfiziert¹. Die Klone der mit ADAM10 retransfizierten Zellen (ADAM10^{-/-}

¹ Herstellung der mit ADAM10 retransfizierten Maus-Fibroblasten: Bovines ADAM10-HA wurde in einen retroviralen Expressionsvektor kloniert und dieses Konstrukt in eine ecotrope Verpackungszelllinie

[+ADAM10]) wurden im Western Blot mit Hilfe eines anti-HA-Antikörpers auf ADAM10-Proteinexpression getestet. Beide ADAM10-Formen wurden detektiert und ähnlich stark exprimiert wie in den Wildtyp-Zellen (Abb. 3A, Veröffentl. 2).

Die nun zur Verfügung stehenden drei Zelllinien Wildtyp, ADAM10^{-/-} und ADAM10^{-/-} [+ADAM10] wurden transient mit humanem CXCL16 transfiziert und in vierstündigen Sheddingversuchen auf ihre Fähigkeit, lösliches CXCL16 zu generieren, untersucht. Da es zwischen den Zelllinien Unterschiede in den Transfektionseffizienzen gab, mussten die im ELISA gemessenen Konzentrationen an freigesetztem Chemokin normiert werden. Dies geschah in gleicher Weise wie bereits für CX3CL1 unter 3.1.4. beschrieben, indem auch die CXCL16-Konzentrationen der Lysate bestimmt wurden und die Menge an löslichem Chemokin dann in Prozent von der Gesamtmenge aus löslichem und membranassoziiertem CXCL16 dargestellt wurde.

Die ELISA-Daten zeigten deutliche Unterschiede im CXCL16-Sheddingverhalten zwischen den ADAM10-positiven bzw. -defizienten Zellen: Der Anteil von 51% löslichem CXCL16 nach vier Stunden *Shedding* im Zellüberstand der Wildtyp-Zellen war in den ADAM10^{-/-}-Fibroblasten auf 13% reduziert (Tab.1, Veröffentl.2). Interessanterweise wurde dieser Verlust an Sheddingaktivität durch die Retransfektion von ADAM10 vollständig kompensiert (Abb.3B, Veröffentl.2).

Um das CXCL16-*Shedding* unter physiologischeren Bedingungen zu untersuchen, wurde die endogene CXCL16-Expression der Maus-Fibroblasten durch Stimulation mit je 20ng/ml TNF- α und IFN- γ für 24 Stunden induziert und in einem für das murine CXCL16 spezifischen ELISA nachgewiesen. Der durch *Shedding* freigesetzte Anteil an löslichem CXCL16 war in den ADAM10^{-/-}-Zellen verglichen mit dem Wildtyp deutlich geringer (18% zu 40%). In Übereinstimmung mit den Transfektionsversuchen war die CXCL16-Sheddingaktivität in den retransfizierten Zellen wiederhergestellt (Abb.3C, Veröffentl.2). Wie erwartet konnte der ADAM10-spezifische Inhibitor GI das *Shedding* in den ADAM10-defizienten Fibroblasten nicht weiter verringern, dafür blockierte er aber die CXCL16-Freisetzung sowohl in den Wildtyp- als auch in den retransfizierten Zellen sehr effektiv (Abb.3C, Veröffentl.2).

transfiziert. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellüberstände abgenommen, durch Zentrifugation gereinigt und in Gegenwart von 10ng/ml Sequabrene zu den ADAM10-defizienten Fibroblasten gegeben. Nach weiteren sechs Tagen wurden die transfizierten Zellen subkloniert und nach Expression von GFP, das im Vektor kodiert war, selektiert.

Insgesamt verdeutlichten die Ergebnisse die besondere Rolle von ADAM10 für das konstitutive CXCL16-*Shedding*. Da jenes allerdings auch in den ADAM10^{-/-}-Zellen nicht vollständig inhibiert war, ist Beteiligung auch noch anderer, von den Fibroblasten exprimierter Metalloproteinasen am CXCL16-*Shedding* wahrscheinlich. Dieser Befund ist prinzipiell der gleiche, der auch schon für CX3CL1 festgestellt wurde (siehe 3.1.4.)

3.2.4. PMA-induziertes CXCL16-*Shedding*

Da für eine Reihe von Substraten wie zum Beispiel TNF- α , L-Selectin, IL-6R und insbesondere CX3CL1 beschrieben worden ist, dass *Shedding* durch Aktivierung der Protein Kinase C (PKC) mit Hilfe von Phorbolestern induziert werden kann^{78,80,116}, sollte geprüft werden, ob dies auch für CXCL16 der Fall ist. Zu diesem Zweck wurden COS-7-Zellen transient mit humanem CXCL16 transfiziert und *Shedding*-Versuche mit und ohne PMA-Stimulation für unterschiedliche Zeiten durchgeführt.

Im ELISA zeigte sich schon nach einer Stunde PMA-Behandlung ein deutlicher Anstieg an löslichem CXCL16 gegenüber den unstimulierten Zellen, welcher nach zwei Stunden am größten war und dann auch nach längeren Inkubationszeiten bis zu acht Stunden konstant blieb (Abb.4A, Veröffentl.2). Eine gesteigerte Biosynthese von CXCL16 oder Metalloproteinasen durch PMA-Stimulation kam als Ursache für diesen Effekt nicht in Betracht, da die erhöhten Konzentrationen an löslichem Chemokin bereits nach kurzer Zeit messbar waren. Diese Überlegung wurde durch Analyse der Zelllysate im ELISA bestätigt: Nach zwei Stunden *Shedding* war keine Zunahme des Gesamt-CXCL16 festzustellen, sondern der Anstieg der löslichen Form bewirkte gleichzeitig eine Reduktion der membrangebundenen Form (Abb.4B, Veröffentl.2). Auch im Western Blot ließ sich der PMA-Effekt durch eine zunehmende Bande im Überstand bzw. eine schwächer werdende im Lysat nachweisen (Abb. 4C, Veröffentl.2). Zusätzlich wurde deutlich, dass durch PMA-Stimulation zwar vermehrt die 32 kD-Form des Chemokins generiert wird, dass aber keine weiteren Fragmente entstehen.

Um zu untersuchen, welches die verantwortliche Proteasen für das PMA-induzierte CXCL16-*Shedding* sind, wurden CXCL16-transfizierte COS-7-Zellen mit den

Metalloproteinasen-Inhibitoren Batimastat, GI und GW behandelt und dann in Gegenwart oder Abwesenheit von PMA auf ihr CXCL16-Sheddingverhalten analysiert (Abb.4D, Veröffentl.2). Die ELISA-Daten bestätigten zunächst die Bedeutung von ADAM10 für das konstitutive CXCL16-*Shedding*: Der selektive ADAM10-Inhibitor GI bewirkte eine genauso starke Reduktion der Konzentrationen an löslichem CXCL16 wie der kombinierte ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW oder der Breitspektrum-inhibitor Batimastat. Andererseits zeigte sich, dass das PMA-induzierte CXCL16-*Shedding* sowohl von Batimastat als auch von GW, nicht aber von GI blockiert werden kann. Zusammen mit der Beobachtung, dass PMA ohne weiteres CXCL16-*Shedding* in den ADAM10-defizienten Maus-Fibroblasten induzierte, und dies sogar effektiver als in den retransfizierten, ADAM10-positiven Zellen (Abb.4 E, Veröffentl.2), wies dies darauf hin, dass ADAM10 nicht für das PMA-induzierte CXCL16-*Shedding* verantwortlich ist. Hierfür schien jedoch ADAM17 ein geeigneter Kandidat zu sein, da GW den PMA-Effekt erfolgreich inhibierte und- soweit bekannt- sich von GI im Wesentlichen durch sein Potential ADAM17 zu inhibieren unterscheidet.

3.2.5. CXCL16-Induktion und –*Shedding* in vaskulären Zellen

Obwohl die konstitutive Expression von CXCL16 in verschiedenen Geweben wie beispielsweise der Lunge, der Leber und Niere auf mRNA-Ebene nachgewiesen worden war⁴¹, blieb die Funktion des Chemokins weitgehend ungeklärt. Es sollte zunächst überprüft werden, ob CXCL16 ähnlich wie CX3CL1 durch TH-1-polarisierende Zytokine induziert werden kann. Dazu wurden Endothelzellen der Nabelschnur (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) und humane glatte Muskelzellen der Aorta für 24 Stunden mit TNF- α und IFN- γ stimuliert oder zum Vergleich unbehandelt belassen, wobei die Zytokine entweder alleine oder in Kombination eingesetzt wurden. Die CXCL16-mRNA-Expression wurde dann mittels quantitativer RT-PCR (TaqMan) bestimmt (Abb. 5A und 5B, Veröffentl.2). Die Stimulation mit nur einem der beiden Zytokine führte sowohl in den Endothelzellen als auch den glatten Muskelzellen nur zu einem sehr geringen Anstieg der mRNA-Expression gegenüber den unstimulierten Zellen. Dagegen bewirkte die Kombination aus TNF- α und IFN- γ in konzentrationsabhängiger Weise eine starke Zunahme der CXCL16-mRNA in beiden Zelltypen. Auf Protein-Ebene konnte entsprechend im ELISA nur bei den TNF- α /

IFN- γ -behandelten Zellen nennenswerte Mengen an CXCL16 gemessen werden, wobei interessanterweise der Anteil an freigesetztem CXCL16 in den Endothelzellen größer war als die verbleibende Menge an membranassoziiertem Chemokin (Abb.5C, Veröffentl.2). Da IL-4 die TNF- α / IFN- γ -induzierte Heraufregulation von CX3CL1 teilweise inhibiert⁶², wurde in einem weiteren Versuch die Endothelzellen mit TNF- α / IFN- γ in Gegenwart oder Abwesenheit von IL-4 stimuliert und nach 24 Stunden die CXCL16-Konzentrationen in den Zellüberständen bzw. -lysaten bestimmt (Abb.5D, Veröffentl.2). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für CX3CL1 war in den IL-4-behandelten Proben der durch die proinflammatorischen Zytokine induzierte Anstieg der CXCL16-Expression deutlich supprimiert.

Es sollte abschließend geprüft werden, ob die Endothelzellen funktionales ADAM10-Protein exprimieren und ob in diesem Fall die Protease das CXCL16-*Shedding* in den Zellen reguliert. Dazu wurden zunächst Lysate von unstimulierten und TNF- α / IFN- γ -behandelten Endothelzellen hergestellt und im Western Blot unter Verwendung eines Antiserums gegen humanes ADAM10 analysiert. Unabhängig von der Zytokin-Stimulation der Zellen zeigte der Western Blot die Präsenz und gleichmäßig starke Expression beider ADAM10-Formen (Abb.6A, Veröffentl.2).

In *Shedding*-Versuchen mit TNF- α /IFN- γ -stimulierten Endothelzellen wurde nun das Potential der Metalloproteinaseinhibitoren GI und GW getestet, die Freisetzung von löslichem CXCL16 zu blockieren. Beide Inhibitoren zeigten hierbei in konzentrationsabhängiger Weise die gleiche Effektivität (Abb.6B, Veröffentl.2). Da der kombinierte ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW nicht in der Lage war, das CXCL16-*Shedding* besser zu blockieren als der ADAM10-selektive Inhibitor GI, konnte ADAM10, nicht aber ADAM17, als die entscheidende Protease für das konstitutive *Shedding* in den Endothelzellen angenommen werden.

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurden schließlich Veränderungen der CXCL16-Expression auf der Zelloberfläche der Endothelzellen aufgrund von TNF- α /IFN- γ -Stimulation sowie PMA-Behandlung und Einsatz von Metalloproteinaseinhibitoren verfolgt. Wie erwartet, wurde die vermehrte CXCL16-Expression nach Zytokin-Stimulation durch den ADAM10-selektiven Inhibitor GI noch weiter verstärkt (Abb.6D, Veröffentl.2). Der kombinierte ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW konnte außerdem die

PMA-induzierte Abnahme der CXCL16-Oberflächenexpression vollständig kompensieren (Abb.6D, Veröffentl.2).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ synergistisch die CXCL16-Expression in Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Vaskulatur heraufregulieren und dass in den Endothelzellen ADAM10 für das konstitutive *Shedding* des Chemokins verantwortlich ist. Dagegen spielt ADAM17 vermutlich eine wichtige Rolle für das PMA-induzierte CXCL16-*Shedding* (Abb.6).

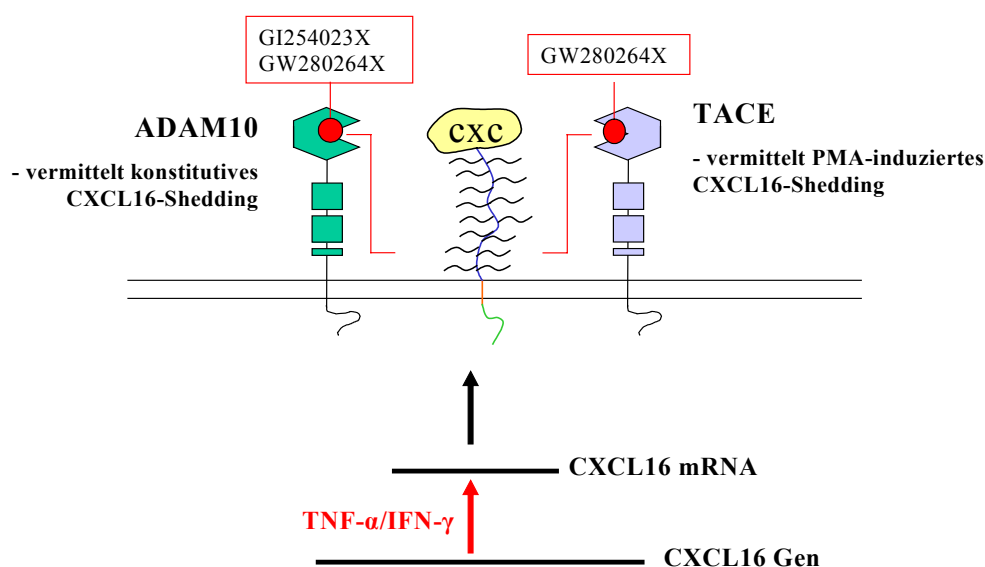


Abb.6 Modell zur Induktion von CXCL16 durch proinflammatorische Zytokine und zur Regulation von CXCL16-*Shedding* durch Metalloproteinasen. Die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ induzieren synergistisch die Synthese von CXCL16 mRNA bzw. CXCL16-Protein. Das konstitutive *Shedding* des auf der Zelloberfläche exprimierten Chemokins wird sowohl durch den selektiven ADAM10-Inhibitor GI254023X (GI) als auch durch den kombinierten ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW280264X (GW) blockiert, während das PMA-induzierte *Shedding* nur durch GW280264X inhibiert wird. Zusammen mit der Beobachtung einer deutlich verringerten konstitutiven, nicht aber PMA-induzierten CXCL16-Spaltung in ADAM10-defizienten Zellen (siehe Text) kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass ADAM10 die wichtigste Protease für das konstitutive CXCL16-*Shedding* ist und dass ADAM17 wahrscheinlich das PMA-induzierte *Shedding* des Chemokins vermittelt.

3.3. Gesteigerte Expression und *Shedding* des transmembranen Chemokins CXCL16 durch reaktive Astrozyten und Gliomazellen (Veröffentlichung 3)

Diese Veröffentlichung behandelt die Frage nach Existenz und Funktion von CXCL16 im Gehirn. Es sollte untersucht werden, ob die bisherigen Ergebnisse zu Induzierbarkeit und *Shedding* des Chemokins auf die Situation im Gehirn übertragbar sind und ob CXCL16 möglicherweise eine besondere Bedeutung bei entzündlichen oder malignen Erkrankungen des Organs hat.

3.3.1. CXCL16-Expression in reaktiven Astrozyten und Glioma-Zellen

Zunächst wurden Gewebeschnitte von gesundem menschlichen Gehirn und einem Glioblastom (*Glioblastoma multiforme*) sowie eine humane Glioma-Zelllinie (U343) mit Hilfe der Immunhistochemie auf das Vorkommen von CXCL16 analysiert^j.

Während beim gesunden Gehirn die CXCL16-Expression auf die Endothelzellen der Blutgefäße und einige perivaskuläre Zellen mit der Morphologie von Astrozyten beschränkt war, wurden im Glioblastom neben den Endothelzellen besonders die Tumorzellen als CXCL16-positiv nachgewiesen (Abb.1A und B, Veröffentl.3). Die positive CXCL16-Färbung der U343-Zellen unterstützte diesen *in situ*-Befund (Abb.1C, Veröffentl.3)

3.3.2. Heraufregulation der CXCL16-mRNA-Expression in Gliomen, Glioma-Zelllinien und isolierten murinen Astrozyten

Mit Hilfe quantitativer RT-PCR wurde die CXCL16-mRNA-Expression verschiedener Astrozytome mit der von gesundem Gehirn verglichen, wobei die Messwerte in Prozent

^j Die Immunfärbung erfolgte über Nacht mit einem anti-CXCL16-Serum bzw. einer Isotyp-Kontrolle. Gebundener Antikörper wurde über einen zweiten, biotinylierten Antikörper und ein Avidin-Peroxidase-Konjugat, dessen Reaktion mit einem Chromogen zu einer bräunlichen Färbung führte, detektiert. Zusätzlich wurden die Zellkerne der U343-Zellen mit Hämalaun gegengefärbt.

der gleichzeitig bestimmten GAPDH-mRNA-Expression angegeben wurden. Im Gegensatz zu den Proben des gesunden Gewebes, in denen sich nur sehr geringe Mengen an CXCL16-mRNA fanden, lagen die Werte für die Astrozytome über 200fach höher (Abb.2A Veröffentl.2).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Immunhistochemie wurden erhebliche Mengen CXCL16-mRNA in zwei Glioma-Zelllinien (U343 und U118) detektiert, während humane Endothelzellen und Fibroblasten nur sehr geringe und die humane T-Zelllinie Jurkat gar keine CXCL16-mRNA Expression aufwiesen (Abb.2B, Veröffentl.3).

Die Analyse verschiedener muriner Gehirn-Zelltypen bestätigte, dass CXCL16 mRNA vorwiegend von Astroglia-Zellen exprimiert wird und nur in viel geringerem Maße von Endothelioma-Zellen, primären Microglia-Zellen und Fibroblasten. In Neuro 2a-Zellen konnte gar keine mRNA für das Chemokin nachgewiesen werden, während primäre Neuronen CXCL16-positiv waren. Dies könnte allerdings an der Zellpräparation liegen, die sehr wahrscheinlich mit Astrozyten verunreinigt war. Die CXCL16-Expression in Homogenaten von gesundem Gehirn adulter Mäuse bzw. E18-Embryos war sehr niedrig, in den Gehirnpräparationen postnataler Mäuse (P2) hingegen etwas höher-letzteres vermutlich ein Zeichen verstärkter Astroglia-Proliferation in diesem Stadium (Abb.2C, Veröffentl.3).

3.3.3. Erhöhte CXCL16-Expression nach IFN- γ - und TNF- α -Stimulation

Nachdem bereits gezeigt worden war, dass CXCL16-mRNA- und Protein-Expression in Endothelzellen durch IFN- γ und TNF- α heraufreguliert werden (siehe Veröffentl.2), sollte untersucht werden, ob proinflammatorische Mediatoren auch im Gehirn eine verstärkte Synthese des Chemokins induzieren können. Zu diesem Zweck wurden U343-Zellen und HUVECs für 24 Stunden entweder unstimuliert belassen oder mit 10ng/ml TNF- α bzw. IFN- γ oder einer Kombination aus beiden Zytokinen stimuliert und anschließend mittels quantitativer RT-PCR auf CXCL16-mRNA-Expression analysiert. Die Expression wurde in Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt (Abb.3, Veröffentl.3). Im Ergebnis zeigte sich, dass die Kombination aus TNF- α und

IFN- γ eine ca. 45fache Steigerung der CXCL16-Expression in der Glioma-Zelllinie bewirkte. Diese Zunahme war sogar leicht stärker als in den Endothelzellen (ca. 40fach). Wurden die Zytokine einzeln eingesetzt, konnte im Gegensatz zu den HUVECs bei den U343-Zellen immer noch eine deutliche Heraufregulierung des Chemokins festgestellt werden. Die CXCL16-Proteinexpression und deren Induktion durch TNF- α /IFN- γ wurde im Western Blot durch Analyse der Zellysate von U343-Zellen gezeigt (Abb.4A, Veröffentl.3): Nach Zytokin-Stimulation der Zellen war das Signal für CXCL16 deutlich verstärkt gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Als Kontrolle für die Detektion des richtigen Fragments wurden COS-7-Zellen mit humaner CXCL16 cDNA, die mit einer HA-Sequenz fusioniert war, transfiziert. Das 49 kD-Fragment für das membran-assoziierte Chemokin konnte dann sowohl mit einem anti-HA-Antikörper als auch mit dem Antikörper gegen humanes CXCL16, der für die Detektion in den Gliomazellen verwendet wurde, nachgewiesen werden. Die Heraufregulierung der CXCL16-Proteinexpression in den U343-Zellen durch TNF- α /IFN- γ wurde außerdem mittels Immunhistochemie bestätigt (Abb.1C, Veröffentl.3).

3.3.4. Freisetzung von löslichem CXCL16 in Gliazellen

U343- und A761-Gliomazellen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Stimuli behandelt und die Zellüberstände anschließend im ELISA auf lösliches CXCL16 analysiert. Die getesteten Stimuli waren neben TNF- α und IFN- γ Glutamat, TGF- β , EGF, Substanz P, IL-6 und H-IL-6. Nur die Behandlung der Zellen mit TNF- α /IFN- γ hatte einen mehr als zweifachen Anstieg der CXCL16-Konzentrationen zur Folge, alle anderen Reagenzien hatten praktisch keinen Effekt (Abb.4B, Veröffentl.3). Interessanterweise bewirkte in murinen Astrogliazellen die Stimulation mit TNF- α alleine eine Zunahme der CXCL16-Proteinexpression um das Dreifache, während sowohl unbehandelte als auch TNF- α -stimulierte Microgliazellen keine relevanten Mengen an CXCL16 exprimierten.

3.3.5. CXCL16-*Shedding* in Gliazellen durch unterschiedliche Metalloproteinasen

Um zu untersuchen, ob die Metalloproteinasen ADAM10 oder ADAM17 zum CXCL16-*Shedding* in Gliazellen beitragen, wurde das Potential des ADAM10-selektiven Inhibitors GI und des kombinierten ADAM10/ADAM17-Inhibitors GW getestet, die Freisetzung löslichen CXCL16 in Gliomazellen zu blockieren. Dazu wurde zunächst die Präsenz beider Metalloproteinasen in den U343-Zellen sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene mittels RT-PCR bzw. Western Blot-Analyse überprüft. Unter Verwendung ADAM10- und ADAM17-spezifischer Primer bewies die RT-PCR eine deutliche Expression beider Proteasen, wengleich auf etwas niedrigerem Niveau als in Endothelzellen (HUVEC) oder der monozytären Zelllinie THP-1. Generell wurde ADAM17 etwas schwächer exprimiert als ADAM10 (Abb.5A, Veröffentl.3). Im Western Blot konnten in den Zelllysaten der Gliomazellen die Proteine beider Metalloproteasen in ihrer Pro-Form und maturen Form detektiert werden (Abb.5 B, Veröffentl.3). Die bereits erwähnten ADAM10-defizienten Maus-Fibroblasten dienten als Negativ-Kontrolle für den ADAM10-Nachweis in den U343-Zellen. Zusätzlich wurde untersucht, ob PMA die ADAM17-Expression in diesen Zellen beeinflussen kann, was nicht der Fall war: Eine zweistündige Behandlung der U343-Zellen mit 200ng PMA/ml Kulturmedium hatte keinen Effekt auf die exprimierte Menge an ADAM17-Protein (Abb.5B, Veröffentl.3).

Der kombinierte ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW blockierte konzentrationsabhängig die Entstehung von löslichem CXCL16 in unstimulierten sowie TNF- α /IFN- γ -behandelten U343- und A761-Gliomazellen (Abb.6A, Veröffentl.3). Bei einer GW-Konzentration von 10 μ M lag die Inhibition in allen Fällen bei fast 100%. Dies wies deutlich auf eine Rolle von ADAM10 und/oder ADAM17 für das konstitutive CXCL16-*Shedding* in diesen Zellen hin.

Die produzierte Menge an löslichem CXCL16 konnte sowohl in den U343- als auch in den A761-Zellen durch PMA-Stimulation deutlich gesteigert werden (Abb.6B, Veröffentl.3). Der Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen war bereits nach einer Stunde Inkubation festzustellen und nahm auch bei längeren

Inkubationszeiten bis zu acht Stunden nicht weiter zu. Wurden die Inhibitoren GI und GW eingesetzt, um ihre Wirkung auf das PMA-induzierte CXCL16-*Shedding* zu testen, zeigte sich, dass nur der kombinierte ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW, nicht aber GI, den PMA-Effekt blockieren konnte. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für die CXCL16-Regulation in vaskulären Zellen (siehe Veröffentl.2) schien auch für die Gliomazellen zu gelten, dass ADAM10 hauptsächlich für das konstitutive und ADAM17 vermutlich für das PMA-induzierte *Shedding* des Chemokins verantwortlich ist.

3.3.6. Verstärkte Expression des CXCL16-Rezeptors CXCR6 in Gliomen und sein Nachweis in Astrozyten und Mikrogliazellen

CXCR6 ist sowohl der Rezeptor für die lösliche als auch die membranassoziierte Form von CXCL16⁷⁶. Deshalb wurden humane und murine Gehirn-Gewebeproben sowie primäre Zellen oder Zelllinien mittels quantitativer RT-PCR auf CXCR6-mRNA-Expression analysiert.

Während im gesunden menschlichen Gehirn kaum CXCR6-mRNA detektierbar war, wurden schwankende Expressionen in Gliomen festgestellt. In zwei Gewebeproben fortgeschrittener Glioblastome war die mRNA des Rezeptors allerdings stark heraufreguliert (Abb.7A, Veröffentl.3). Die Expressionsrate war vergleichbar mit der in der Milz, welche als CXCR6-positiv beschrieben worden war⁷⁶ und als Positivkontrolle diente. Innerhalb der Milz exprimieren T-Zellen den Rezeptor, die erwartungsgemäß ein deutliches Signal für CXCR6-mRNA lieferten.

Weder im gesunden adulten noch im gesunden embryonalen Gehirn der Maus konnte CXCR6-mRNA-Expression detektiert werden. Lediglich das gesunde postnatale P2-Gehirn, das durch vermehrte Proliferation von Astrogliazellen charakterisiert ist, war leicht positiv für die mRNA des Chemokinrezeptors. Kultivierte Astrogliazellen, insbesondere immortalisierte Astrozyten, exprimierten moderate Mengen an CXCR6-mRNA, während geringe Mengen in primären und immortalisierten Mikrogliazellen detektiert wurden. Im Gegensatz dazu konnte in murinen neuronalen und endothelialen Zelllinien keine relevante CXCR6-mRNA-Expression gemessen werden (Abb.7B,

Veröffentl.3). Insgesamt weisen die Daten darauf hin, dass eine gesteigerte CXCR6-Expression in Gliomen mit einer vermehrten Präsenz CXCL16-responsiver Zellen assoziiert ist und dass außer T-Zellen möglicherweise auch Astrozyten und Mikroglia auf CXCL16 reagieren können.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die proteolytischen Spaltungsmechanismen der transmembranen Chemokine CX3CL1 und CXCL16 untersucht sowie erstmals Studien zur Präsenz von CXCL16 und seinem Rezeptor CXCR6 im Gehirn durchgeführt. Neben der Identifikation der für die Spaltung der Moleküle verantwortlichen Proteasen war auch die Frage nach der biologischen Funktion der Chemokine von Interesse.

Während zu Beginn der Arbeit bereits einige Informationen zur Spaltung von CX3CL1 vorlagen, gab es für CXCL16 in dieser Hinsicht noch keine Erkenntnisse. Für CX3CL1 war bekannt, dass die membranassoziierte Form durch proteolytische Abspaltung der Ektodomäne in eine lösliche, chemotaktisch aktive Form überführt werden kann- ein Prozess, der auch als *Shedding* bezeichnet wird. Die dafür verantwortlichen Proteasen waren aber nur zum Teil identifiziert und es blieb ungeklärt, ob das strukturell verwandte CXCL16 ebenfalls einem solchen Regulationsmechanismus unterliegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zum Spaltungsmechanismus transmembraner Chemokine sowie mögliche Konsequenzen für die *in vivo*-Funktion von CX3CL1 und CXCL16 sollen im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

4.1. Differentielle Regulation des *Sheddings* von CX3CL1 und CXCL16

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit war, dass beide transmembranen Chemokine durch die Aktivität von mindestens zwei Vertretern der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen prozessiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Spaltung von CX3CL1 und CXCL16 sowohl konstitutiv erfolgt als auch durch den Phorbolester PMA induzierbar ist und dass hierbei ADAM10 und ADAM17 weitgehend separate Aufgaben übernehmen.

Während ADAM10 als die wichtigste Protease für das konstitutive *Shedding* beider Chemokine identifiziert werden konnte, ist ADAM17 vermutlich an der durch PMA induzierten Spaltung der Moleküle beteiligt. Die Rolle von ADAM10 wurde vor allem durch den Einsatz von ADAM10-Inhibitoren in verschiedenen Zelllinien sowie durch Transfektion von CX3CL1 oder CXCL16 in ADAM10-defiziente Zellen deutlich. Allerdings hatte die Ausschaltung der ADAM10-Aktivität keinen Einfluss auf die nach

PMA-Stimulation vermehrte Freisetzung der Chemokine, welche nur durch die Inhibition von ADAM17 wirksam reduziert wurde.

Damit war gezeigt, dass beide transmembranen Chemokine auf ähnliche Weise differentiell durch ADAM10 und ADAM17 reguliert werden. Ein quantitativer Unterschied bestand allerdings in dem deutlich geringeren PMA-Effekt beim CXCL16 als beim CX3CL1 - ein Hinweis darauf, dass ersteres Chemokin möglicherweise ein weniger geeignetes Substrat für ADAM17 ist als CX3CL1.

Mittlerweile ist für eine Vielzahl transmembraner Moleküle ein konstitutiver und induzierbarer Spaltungsmechanismus beschrieben worden, wobei als Induktoren meistens Phorbolster wie PMA eingesetzt wurden. Interessanterweise stellte man in vielen Fällen, ähnlich wie bei CX3CL1 und CXCL16, eine differentielle Regulation beider Formen des *Sheddings* durch ADAM10 und ADAM17 fest, so zum Beispiel für das Prion-Protein (PrP)¹⁰⁶ oder das Amyloid-Vorläuferprotein (APP)¹⁰⁴ oder das Adhäsionsmolekül L1 (Maretzky *et al.*, persönliche Mitteilung). Dennoch scheint eine solche Aufgabenteilung der Metalloproteasen nicht unbedingt die Regel zu sein, da andere Beispiele wie das N-Cadherin¹²⁵ zeigen, dass konstitutives und induzierbares *Shedding* auch von derselben Protease, in dem Fall ADAM10, vermittelt werden kann.

Inzwischen wurden von uns außer PMA noch weitere Induktoren des *Sheddings* von CX3CL1 und CXCL16 gefunden, so zum Beispiel Ionomycin, m- β -Cyclodextrin, der Calmodulin-Inhibitor W7 oder auch das bakterielle Toxin Streptolysin O (C. Hundhausen, unveröffentlichte Daten). Insbesondere Ionomycin, ein Kalzium-Ionophor, verursachte eine rapide Freisetzung an löslichem Chemokin innerhalb weniger Minuten. In den Zellüberständen transfizierter COS-7-Zellen konnte bereits nach 30 Minuten die Akkumulation an löslichem CX3CL1 mittels Western Blot nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu PMA scheint Ionomycin allerdings nicht über die Aktivität von ADAM17, sondern hauptsächlich über die von ADAM10 zu wirken. Der selektive ADAM10-Inhibitor GI reduzierte in CX3CL1-transfizierten, mit Ionomycin behandelten COS-7-Zellen die Produktion an löslichem Chemokin um 58%, wobei eine zusätzliche Inhibition von ADAM17 durch den kombinierten ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW keinen weiteren Effekt zeigte. Ob die Induktion des *Sheddings* von CX3CL1 und CXCL16 auch *in vivo* eine Rolle spielt, bleibt bislang ungeklärt. Die Beobachtung, dass eine Stimulation mit Glutamat die kurzfristige Freisetzung von CX3CL1 aus neuronalen Zellen induziert¹¹⁷, weist zumindest darauf

hin, dass die Sheddingaktivität auf diesen Zellen durch einen physiologisch relevanten Stimulus gesteigert werden kann. Hierbei wäre es wichtig, die Frage zu beantworten, welche Proteasen das durch Glutamat induzierte *Shedding* vermitteln und über welchen Mechanismus die Aktivität dieser Sheddasen gesteigert wird.

Festzuhalten bleibt jedoch auch, dass unabhängig von den verwendeten Stimuli weder die Inhibitoren noch ADAM10-defiziente Zellen eine vollständige Blockierung der Chemokin-Spaltung bewirken konnten. Es ist daher wahrscheinlich, dass noch andere, bisher nicht identifizierte Metalloproteasen zur Produktion von löslichem CX3CL1 und CXCL16 beitragen. Um dies näher zu untersuchen, könnten bereits generierte Zelllinien mit Mehrfachdefizienzen für bestimmte Mitglieder der ADAM-Familie verwendet werden, zum Beispiel ADAM9/10/15-defiziente Maus-Fibroblasten¹²⁶.

Eine weitere wichtige Frage ist, auf welche Weise die Metalloproteinasen ihr Substrat erkennen und ob möglicherweise Erkennungs- und Spaltstelle voneinander verschieden sind. Sehr wahrscheinlich ist in den meisten Fällen nicht die Primärsequenz, sondern vielmehr die räumliche Struktur und damit die Zugänglichkeit bestimmter Domänen des Substrats entscheidend für die Ektodomänenspaltung. In Homologie zu einer bei Syndecanen vorkommenden Spaltstelle wurde für CX3CL1 zunächst die dibasische Sequenz Arg-Arg in der membranproximalen Position 315-316 als Spaltmotiv angenommen³⁶. Allerdings konnte ein Austausch dieser Aminosäuren durch ein Fragment des nicht spaltbaren CD4 die durch PMA induzierte Spaltung der Chimäre nicht verhindern¹¹⁶, und auch das Fehlen der Spaltstelle Gln⁶¹²-Asp⁶¹³ für den IL6-R in gp130/IL6-R-Chimären führte nicht zu einer Blockierung des durch PMA induzierten *Sheddings*¹⁰². Geht man also davon aus, dass die Metalloproteinasen keine ausgesprochene Sequenzspezifität besitzen, stellt sich die Frage, warum die Spaltung der Substrate, soweit bekannt, immer in dem membranproximalen Abschnitt erfolgt. Denkbar ist, dass sterische Gründe dafür sorgen, dass nur diese Bereiche für die Proteasen zugänglich sind. Im Falle der Chemokine CX3CL1 und CXCL16 könnte zum Beispiel die kurz oberhalb der Transmembrandomäne beginnende Glykolysierung des Mucin-ähnlichen Stiels einen Angriff der Metalloproteinasen blockieren.

Obwohl in vorliegender Arbeit gezeigt wurde, dass mit ADAM10 und ADAM17 mindestens zwei Metalloproteasen in das *Shedding* von CX3CL1 und CXCL16 involviert sind, bleibt noch unklar, ob die Proteasen dieselbe oder verschiedene Spaltstellen nutzen. Die innerhalb dieser Arbeit vorgestellten Western Blots für das CX3CL1 lassen zunächst nur ein einziges lösliches Fragment von ca. 80 kD vermuten und zwar unabhängig davon, ob es sich um konstitutives oder induziertes *Shedding* handelt. Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass für Proteine dieser Größenordnung Differenzen von nur wenigen kD mit Hilfe der Western Blot-Technik nicht aufgelöst werden können und dass im Falle der transmembranen Chemokine die Glykolysierung der Mucin-ähnlichen Domäne zu einer diffusen Bande führt, die eine genaue Bestimmung des Molekulargewichts zusätzlich erschwert. Aus diesem Grund ist das Ziel weiterer Arbeiten die Identifikation der Spaltstellen von CX3CL1 und CXCL16 mit Hilfe von Proteinsequenzierungstechniken oder mittels Massenspektroskopie. Aufgrund der viel kleineren Größe und der sehr wahrscheinlich fehlenden Glykolysierung eignet sich dafür das nach der Ektodomänabspaltung intrazellulär verbleibende C-terminale Fragment (CTF) besser als das entstehende lösliche Fragment. Um das CTF mit Hilfe der Affinitätschromatographie aufzureinigen zu können, wurde der C-Terminus von CX3CL1 mit einer Markierungssequenz („2Z“) fusioniert, die an den Fc-Teil von Immunglobulinen bindet.

Interessanterweise ergab die nun mögliche Darstellung des intrazellulären Fragments im Western Blot die Existenz von zwei CTFs mit leicht unterschiedlichen Molekulargewichten von ca. 20 bis 25 kD. Da die Bildung dieser Fragmente in Gegenwart von Metalloproteinaseinhibitoren gehemmt wurde, gehen wir zurzeit davon aus, dass sie unmittelbar durch das CX3CL1-*Shedding* generiert werden und dass vermutlich zwei Spaltnotive im CX3CL1 vorliegen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Inhibition einer weiteren Protease, der innerhalb der Membran aktiven und für die APP-Spaltung wichtigen γ -Sekretase, zu einer verstärkten Bildung der CTFs führt. Möglicherweise ist diese Protease für den Abbau der intrazellulären Fragmente verantwortlich. Eine genauere Aufklärung der Spaltungsmechanismen der transmembranen Chemokine durch die Bestimmung der Spaltstellen sowie die Verwendung selektiver Proteaseinhibitoren ist das Ziel weiterer Arbeiten. Zusätzlich soll das Schicksal der CTFs weiter verfolgt werden. Denkbar ist, dass sie einem weiteren Abbau durch das Proteasom unterliegen oder auch in den Zellkern transportiert

werden und dort in ähnlicher Weise wie für den Notch-Rezeptor gezeigt¹⁰³ als Transkriptionsfaktoren wirken.

4.2. Bedeutung von CX3CL1 und CXCL16 für die Zelladhäsion und die Leukozytenrekrutierung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CX3CL1-exprimierende Zellen durch *Shedding* des Chemokins an Fähigkeit verlieren, CX3CR1-positive Zellen zu binden. Eine Blockierung der ADAM10-Aktivität durch den selektiven ADAM10-Inhibitor GI führte bei unstimulierten Zellen zur Wiederherstellung ihrer ursprünglichen Adhäsionseigenschaften, bei PMA-behandelten Zellen allerdings nicht. In letzterem Fall gelang dies nur durch eine zusätzliche Inhibition von ADAM17 durch den kombinierten ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW280264X. Diese Ergebnisse bestätigten nicht nur die Rolle von ADAM10 und ADAM17 für die konstitutive bzw. PMA-induzierte Spaltung von CX3CL1, sondern zeigten insbesondere die funktionelle Bedeutung des CX3CL1-*Sheddings* für die Adhäsion responsiver Zellen- ein entscheidender Schritt bei der Leukozytenrekrutierung im Verlauf entzündlicher Reaktionen. Interessanterweise führte die PMA-Stimulation CX3CL1-exprimierender Zellen zu einem nahezu vollständigen Verlust ihrer adhäsiven Eigenschaften, obwohl Analysen im Durchflußzytometer nur eine Reduktion des membranassoziierten CX3CL1 um ca. 50% belegten. Dies ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass unter physiologischen Bedingungen schon relativ kleine Veränderungen in der CX3CL1-Expression spürbare Auswirkungen auf die Zelladhäsion haben.

Zwar wurde bereits gezeigt, dass immobilisiertes CXCL16 die Adhäsion von Knochenmarksplasmazellen und aktivierten T-Zellen induziert¹²⁷. Ein möglicher Einfluss von Metalloproteinasen bei diesem Phänomen wurde allerdings bislang noch nicht berücksichtigt. Es bleibt zu zeigen, inwieweit auch beim CXCL16 die Funktion des Chemokins als Adhäsionsmolekül durch Induktion oder Blockierung der am *Shedding* beteiligten Metalloproteinasen gesteuert wird.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit war, dass an CX3CL1 gebundene Zellen durch *Shedding* des Chemokins wieder von ihrem zellulären Substrat abgelöst werden können bzw. dass die Inhibition von ADAM10 und damit der Spaltung von CX3CL1 die

Ablösung zum größten Teil verhindert. Da andere zeigen konnten, dass unter physiologischen Flussbedingungen immobilisiertes CX3CL1 mit CX3CR1-exprimierenden Leukozyten eine sehr feste Bindung eingeht¹²⁸, ist vermutlich das *Shedding* von CX3CL1 und nicht die Dissoziation des Rezeptors der entscheidende Mechanismus, der zur Aufhebung der Zell-Zell-Interaktion führt. Die Auflösung der zellulären Kontakte ist möglicherweise eine Voraussetzung für die Transmigration von Immunzellen durch endotheliale und epitheliale Zellschichten (Abb.7). Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurde in ersten *in vitro*-Experimenten geprüft, ob die Inhibition von CX3CL1-*Shedding* durch Metalloproteinaseinhibitoren die Transmigration von Leukozyten beeinträchtigt. Hierbei zeigte sich allerdings, dass die Inhibitoren generell die Transmigration beeinflussten, so auch bei den Kontrollexperimenten mit Zellen, die kein CX3CL1 exprimierten. Um die Bedeutung des *Sheddings* bei der Leukozytenadhäsion und dem anschließenden Transmigrationsvorgang weiter zu untersuchen, wird daran gearbeitet, eine nicht spaltbare Variante des Chemokins herzustellen.

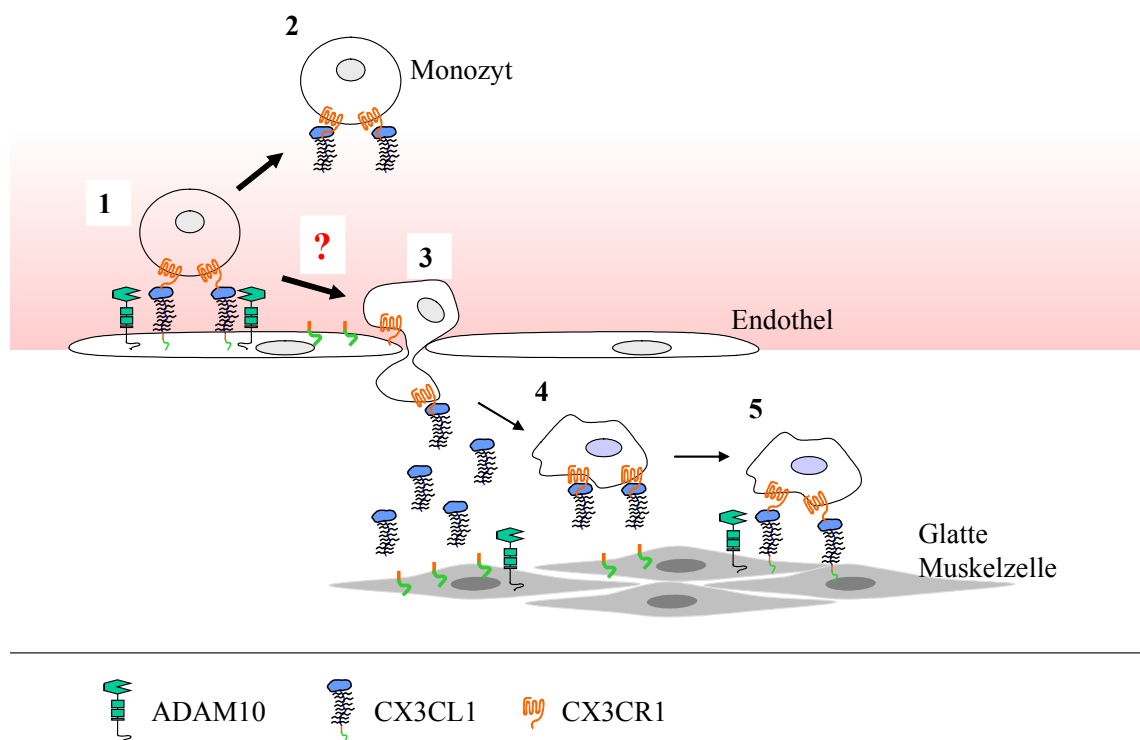


Abb.7 Modell zur Wirkungsweise von ADAM10 und CX3CL1 bei der Monozytenrekretierung. 1 Monozyten binden an CX3CL1 auf der Oberfläche von

Endothelzellen, **2** CX3CL1-Spaltung durch ADAM10 hebt die Adhäsion auf, **3** Induktion von Transmigration durch transmembranes CX3CL1, die Spaltung erfolgt im Verlauf der Transmigration, **4** von glatten Muskelzellen durch ADAM10 freigesetztes CX3CL1 baut einen chemotaktischen Konzentrationsgradienten auf, die transmigrierenden Zellen werden weiter in das entzündete Gewebe geleitet. **5** Monozyten binden an CX3CL1 auf der Oberfläche von glatten Muskelzellen.

4.3. Funktion der transmembranen Chemokine *in vivo*

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Regulation von CX3CL1 und CXCL16 deuten darauf hin, dass beide transmembranen Chemokine ähnliche bzw. ergänzende Funktionen *in vivo* ausüben könnten. Sie werden beide durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IFN- γ heraufreguliert und durch das antiinflammatorische IL-4 supprimiert. Zusammen mit dem Befund, dass auch CXCL16 in Endothelzellen der Vaskulatur exprimiert wird, kann man vermuten, dass beide Chemokine eine Rolle in entzündlichen Gefäßerkrankungen wie zum Beispiel der Arteriosklerose spielen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl die membranständige als auch die lösliche Form von CX3CL1 und CXCL16 wichtige Funktionen bei der Leukozytenrekrutierung übernehmen, einerseits als Adhäsionsmolekül und andererseits als chemotaktischer Stimulus zur gerichteten Wanderung der Immunzellen. Wie beschrieben, kann *in vitro* das *Shedding* der Chemokine induziert und dadurch das Gleichgewicht zur löslichen Variante hin verschoben werden. Mit Hilfe von transgenen Mäusen, die lösliches humanes CX3CL1 gewebsspezifisch in der Aorta überexprimieren, planen wir zu untersuchen, ob solche Veränderungen im Verhältnis von membranassoziierter und löslicher Form *in vivo* die Entwicklung von Gefäßerkrankungen beeinflussen.

Eine besondere Bedeutung in der Arteriosklerose kommt möglicherweise dem CXCL16 zu, da es unterschiedliche Funktionen zu vereinen scheint: Exprimiert auf Makrophagen vermittelt es die Aufnahme von oxidiertem LDL und könnte dadurch zur Transformation dieser Zellen zu den sogenannten Schaumzellen beitragen, welche sich im Verlauf der arteriosklerotischen Erkrankung in den subendothelialen Zellschichten ansammeln und den Hauptbestandteil der Plaques bilden. Weiterhin, und dies zeigen die Ergebnisse der Arbeit, hat CXCL16 aber nicht nur Funktionen als membranständiges Molekül, sondern kann ähnlich wie CX3CL1 durch *Shedding* von der Zelloberfläche abgespalten werden und dann als lösliches Chemokin seine Wirkung entfalten. Diese

könnte im entzündeten Gefäß in einer verstärkten Rekrutierung von TH1-Zellen bestehen. Der Einsatz bereits hergestellter CXCR6-defizienter Mäuse⁵³ wäre eine Möglichkeit, die Bedeutung der Interaktion zwischen CXCL16 und seinem Rezeptor für die Zellrekrutierung *in vivo* zu untersuchen. Interessant wäre dabei auch die Frage, ob ein kürzlich beschriebener Einzelnukleotidpolymorphismus innerhalb des Rezeptors (CXCR6-3K)¹²⁹ die Bindung und Funktion von CXCL16 beeinflusst und eventuell mit einem veränderten Risiko an Arteriosklerose zu erkranken einhergeht.

Aber CX3CL1 und CXCL16 spielen nicht nur bei vaskulären Entzündungen eine Rolle, sondern sehr wahrscheinlich auch bei Entzündungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) und möglicherweise auch bei der Tumorentwicklung. Die verstärkte Expression von CX3CL1 in Mikroglia von Mäusen nach LPS-Behandlung sowie im EAE-Modell ist ein Hinweis auf eine Funktion des Chemokins in entzündlichen Erkrankungen des Gehirns. Da Mikroglia auch den Rezeptor CX3CR1 exprimieren und durch lösliches CX3CL1 zur Proliferation angeregt werden, beruht eine dieser Funktionen vermutlich auf einem autokrinen Wirkungsmechanismus. Eine Vermehrung der Mikroglia im Gehirn erscheint in verschiedenen Szenarien sinnvoll, zum Beispiel nach einer Infektion. Die amöboid beweglichen und zur Phagozytose fähigen Zellen könnten zu einer beschleunigten Beseitigung der Krankheitserreger beitragen. Eine weitere Funktion von CX3CL1 steht möglicherweise im Zusammenhang mit der Regeneration geschädigter motorischer Neurone, in deren Umgebung Ansammlungen von Mikroglia beobachtet wurden- vermutlich infolge chemotaktischer Anlockung durch neuronal exprimiertes CX3CL1¹³⁰.

In dieser Arbeit wurde erstmals die Expression des zweiten transmembranen Chemokins, CXCL16, im Gehirn gezeigt. Immunhistologische Analysen ergaben, dass das Chemokin unter nicht pathologischen Bedingungen im Wesentlichen von Endothelzellen der Gefäße exprimiert wird. Im Vergleich dazu war eine starke Heraufregulation des Proteins in Gliomen unterschiedlicher Malignitätsgrade festzustellen. Insbesondere das *Glioblastoma multiforme*, ein extrem malignes, schnell proliferierendes Gliom, erwies sich als hoch immunpositiv für CXCL16. Eine vermehrte Expression des Chemokins wurde außerdem in verschiedenen Gliomazelllinien detektiert. Eine weitere Steigerung der Expression konnte durch zusätzliche Stimulation der Zellen mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IFN- γ erreicht werden. Quantitative RT-PCR-Analysen zur Präsenz des Rezeptors ergaben eine teilweise deutliche Heraufregulation in Glioblastomen, während in

murinen neuronalen und endothelialen Zelllinien keine relevanten Mengen an CXCR6-mRNA detektiert wurden. Genauere Untersuchungen zur Expression von CXCR6 im Gehirn könnten zukünftig mit transgenen Mäusen durchgeführt werden, bei denen das Rezeptorgen durch das Gen für das *Green Fluorescent Protein* (GFP) ersetzt wurde¹³¹. Inwieweit CXCL16 zur Transformation von Zellen oder zur Proliferation von Tumoren beiträgt, ist eine wichtige, noch unbeantwortete Frage. Da man allerdings weiß, dass einige Gliome lösliche Chemokine wie SDF-1, IL-8 und CCL2 exprimieren¹³²⁻¹³⁴ und für SDF-1 gezeigt wurde, dass es die Proliferation von Gliomazellen stimuliert¹³², ist auch für CXCL16 eine derartige Funktion denkbar. Im Labor von Professor Mentlein (Anatomisches Institut, CAU Kiel) durchgeführte Proliferationsexperimente weisen darauf hin, dass rekombinantes CXCL16 (10 nM) die DNA-Synthese von Astroglia- und Mikrogliazellen stimuliert. Es wird zu klären sein, ob dieser Effekt darauf beruht, dass CXCL16 die Überlebensfähigkeit oder die Proliferation der Gliazellen fördert. Bei vaskulären glatten Muskelzellen, die ebenfalls CXCR6 exprimieren sollen, wurde bereits ein Effekt auf die Zellproliferation beschrieben¹³⁵. Inwieweit bei Gliazellen derartige Phänomene auch *in vivo* eine Rolle spielen, soll in zukünftigen Experimenten mit CXCR6-defizienten Mäusen untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Innerhalb der Familie der chemotaktischen Zytokine (Chemokine) sind CX3CL1 und CXCL16 die bisher einzig bekannten Vertreter, die nicht sezerniert, sondern membranständig exprimiert werden. Ihre physiologische Funktion ist weitgehend unbekannt, obwohl für CX3CL1 eine Bedeutung für die Leukozytenrekrutierung bei entzündlichen Krankheiten wie zum Beispiel der Arteriosklerose vermutet wird. Die Besonderheit von CX3CL1 und CXCL16 liegt darin, dass sie einerseits als membrangebundene Proteine exprimiert werden, andererseits aber auch als lösliche Moleküle vorkommen. Allerdings sind sowohl der Mechanismus, der zur Entstehung der löslichen Formen führt, als auch die Bedeutung der Existenz von zwei verschiedenen Varianten nur unzureichend verstanden. Für das CX3CL1 wurde gezeigt, dass die lösliche Form durch proteolytische Abspaltung der Ektodomäne der membranständigen Form generiert wird, ein Prozess, den man auch als *Shedding* bezeichnet. Da dieser Vorgang kontinuierlich stattfindet, aber auch durch Phorbol ester wie Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) verstärkt werden kann, unterscheidet man zwischen konstitutivem und induziertem *Shedding*. Bisher gibt es Anzeichen dafür, dass an der PMA-induzierten Spaltung von CX3CL1 ein Mitglied der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen (engl. ADAM, *a disintegrin and metalloproteinase*), und zwar ADAM17, beteiligt ist.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Identifikation der für die konstitutive Spaltung von CX3CL1 verantwortlichen Proteasen. Außerdem sollte untersucht werden, ob CXCL16 einem ähnlichen Regulationsmechanismus unterliegt. Ein weiteres Ziel war, die Funktion von löslichem und membrangebundenem CX3CL1 während der Leukozytenrekrutierung und in Entzündungsreaktionen besser zu verstehen. Schließlich sollten erstmals Untersuchungen zum Vorkommen und zur Regulation von CXCL16 im Gehirn durchgeführt werden.

Ein wichtiges Ergebnis hinsichtlich der Regulation von CX3CL1 und CXCL16 war, dass beide Proteine durch *Shedding* prozessiert werden und dass dies differentiell durch mindestens zwei Vertreter der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen, nämlich ADAM10 und ADAM17, geschieht. Durch den Einsatz von Inhibitoren mit einem

definierten Wirkungsprofil, die in der Lage waren, die Aktivität der beiden Proteasen differentiell zu hemmen, konnte gezeigt werden, dass ADAM10 die wichtigste Protease für die konstitutive Spaltung von CX3CL1 und CXCL16 ist. Dieser Befund wurde durch einen Vergleich des *Shedding*-Verhaltens beider Chemokine in ADAM10-positiven und ADAM10-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten bestätigt. Auf der anderen Seite wurde auch deutlich, dass ADAM10 nicht an der durch PMA induzierten gesteigerten Freisetzung von CX3CL1 beteiligt ist. Inhibitorstudien wiesen darauf hin, dass für einen großen Teil dieser induzierten Spaltung ADAM17 verantwortlich ist. Insgesamt ist jedoch nicht auszuschließen, dass in geringem Maße auch noch andere, bisher nicht identifizierte Proteasen, zum *Shedding* beider Chemokine beitragen. Die differentielle Regulation von CX3CL1 und CXCL16 durch ADAM10 und ADAM17 wurde nicht nur in Zellen festgestellt, die mit der cDNA der Chemokine transfiziert worden waren, sondern auch in kultivierten Fibroblasten und Endothelzellen, die die endogenen Chemokine nach Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IFN- γ exprimierten. Dies ist ein Hinweis auf die physiologische Relevanz der beobachteten Spaltungsvorgänge.

In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass auf konfluenten Zellschichten exprimiertes CX3CL1 die feste Adhäsion von Monozyten vermittelt, die den CX3CL1-Rezeptor CX3CR1 tragen. Es wurde festgestellt, dass CX3CL1-*Shedding* nicht nur zu verminderten Adhäsionseigenschaften CX3CL1-exprimierender Zellen führt, sondern dass auch gebundene Monozyten wieder von ihrer zellulären Unterlage abgelöst werden können. Möglicherweise ist die Ablösung der Zellen durch *Shedding* von CX3CL1 eine Voraussetzung dafür, dass sie durch endotheliale oder epitheliale Zellschichten hindurchwandern können.

Da CX3CL1 neben seiner Funktion für die Leukozytenrekrutierung auch für die Interaktion von Neuronen und Mikrogliazellen im Gehirn eine Rolle spielt, stellte sich die Frage, ob auch CXCL16 in diesem Organ exprimiert wird. Mit Hilfe der Immunhistochemie konnte erstmalig das Vorkommen von CXCL16 im menschlichen Gehirn nachgewiesen werden. Während CXCL16 im gesunden Gehirn hauptsächlich auf die Endothelzellen der Blutgefäße beschränkt war, exprimierten Gliome eines hohen Malignitätsgrades erhebliche Mengen des Chemokins. CXCL16-Expression wurde außerdem in verschiedenen Gliomzelllinien detektiert und konnte durch TNF- α und IFN- γ weiter gesteigert werden. Quantitative RT-PCR-Analysen ergaben, dass der Rezeptor von CXCL16, CXCR6, in größeren Mengen in den Gewebeproben einiger

Gliome exprimiert wurde, aber auch deutlich in Astrozyten und Mikrogliazellen vorhanden war. Insgesamt weisen die Ergebnisse auf eine Rolle von CXCL16 und seinem Rezeptor in Entzündungsprozessen des Gehirnes und möglicherweise in maligner Zelltransformation hin.

Weitere *in vivo*-Studien sind notwendig, um die Relevanz der transmembranen Chemokine in entzündlichen Gefäßerkrankungen und Gehirntumoren weiter zu verfolgen. Zu diesem Zweck ist geplant, transgene Mäuse einzusetzen, die CXCR6-defizient sind oder selektiv lösliches CX3CL1 in Endothelzellen der Aorta exprimieren.

6. Summary

Among the family of chemotactic cytokines (chemokines) CX3CL1 and CXCL16 are the only members known so far, which are not secreted but membrane-expressed. Their physiological function remains largely unknown, although a role in leukocyte recruitment during inflammatory conditions such as atherosclerosis has been suggested for CX3CL1. What makes CX3CL1 and CXCL16 special is that they are expressed as membrane-bound proteins but occur as soluble molecules, too. However, both the mechanism of how the soluble forms are generated as well as the importance of the existence of two variants are poorly understood. It has been demonstrated for CX3CL1 that the soluble form is generated by protease-mediated ectodomain cleavage of the membrane-bound form, a process called *shedding*. As this event takes place permanently but can be enhanced by phorbol esters such as Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) one distinguishes between constitutive and inducible *shedding*. So far, ADAM17, a member of the disintegrin-like metalloproteinases (ADAMs), has been associated with the PMA-induced cleavage of CX3CL1.

The aims of this study were to identify the proteases involved in the constitutive cleavage of CX3CL1 and to find out if CXCL16 underlies a similar regulatory mechanism. Besides, the role of the soluble and membrane-bound form of CX3CL1 for leukocyte recruitment and inflammation should be further elucidated. Finally, investigations in the presence and regulation of CXCL16 in the brain should be done for the first time.

The main results concerning the regulation of CX3CL1 and CXCL16 were that both proteins are subject to *shedding* and that they both are differentially shed by at least two members of the ADAM-family of disintegrin-like metalloproteinases, namely ADAM10 and ADAM17. Using inhibitors with defined potencies to differentially block the two proteases it was shown that ADAM10 is the major protease for the constitutive cleavage of CX3CL1 and CXCL16. This finding was consistently supported by comparing the *shedding* behaviour of the chemokines in ADAM10-positive and ADAM10-deficient murine embryonic fibroblasts. However, ADAM10 is not involved in the enhanced *shedding* of the molecules induced by PMA. Inhibitor studies suggest that the PMA-

inducible cleavage is mediated to a large extent by ADAM17. Still, a minor contribution of other yet unidentified proteases to the *shedding* of both proteins cannot be excluded. The differential regulation of CX3CL1 and CXCL16 by ADAM10 and ADAM17 was not only found in cells transfected with chemokine cDNA but could be confirmed for the endogenous chemokines in cultured fibroblasts and endothelial cells induced by the proinflammatory cytokines TNF- α and IFN- γ . This may indicate the physiological relevance of the observed *shedding* processes.

Further experiments demonstrated that CX3CL1 expressed on confluent cell layers confers firm adhesion of monocytes expressing the CX3CL1 receptor CX3CR1. It was found that CX3CL1-*shedding* not only results in reduced adhesive properties of these cells but can lead to the detachment of bound monocytes from their cellular substrate, too. Possibly, the detachment of the cells is a prerequisite for their transmigration through endothelial and epithelial cell layers.

Since beside its role in leukocyte recruitment CX3CL1 has been shown to be involved in the interaction of neurons and microglia in the brain, the question arose if CXCL16 was expressed in this organ, too. Immunohistochemistry demonstrated the presence of CXCL16 in human brain for the first time. Whereas in healthy brain CXCL16 was mainly restricted to the endothelial cells of the blood vessels, the chemokine was abundantly expressed in gliomas of high malignancy. CXCL16-expression was also found in several human glioma cell lines and could be further enhanced by TNF- α and IFN- γ . Using quantitative RT-PCR, the receptor of CXCL16, CXCR6, was detected in larger quantities in some glioma samples and to a considerable extent in astrocytes and microglia. In summary, the results suggest a role of CXCL16 and its receptor in inflammatory processes of the brain and possibly in malignant transformation.

Further *in vivo* studies are necessary to follow up the relevance of the transmembrane chemokines in vascular inflammation and brain tumors. For this purpose, it is planned to use transgenic mice deficient of CXCR6 and mice selectively expressing soluble CX3CL1 in aortic endothelial cells.

7. Literaturverzeichnis

1. Zernecke A, Weber C. Inflammatory mediators in atherosclerotic vascular disease. *Basic Res Cardiol.* 2005;100:93-101.
2. Hamilton TA, Ohmori Y, Tebo J. Regulation of chemokine expression by antiinflammatory cytokines. *Immunol Res.* 2002;25:229-245.
3. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 2002;20:S1-13.
4. von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:7538-7542.
5. Bargatze RF, Jutila MA, Butcher EC. Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined. *Immunity.* 1995;3:99-108.
6. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994;76:301-314.
7. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Jr., Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science.* 1989;243:1160-1165.
8. Detmers PA, Lo SK, Olsen-Egbert E, Walz A, Baggiolini M, Cohn ZA. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med.* 1990;171:1155-1162.
9. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000;12:121-127.
10. Middleton J, Patterson AM, Gardner L, Schmutz C, Ashton BA. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood.* 2002;100:3853-3860.
11. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science.* 1989;245:1238-1241.
12. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol.* 2001;2:108-115.
13. Rollins BJ. Chemokines. *Blood.* 1997;90:909-928.
14. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* 2004;25:75-84.

15. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25:677-686.
16. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol.* 2001;2:123-128.
17. Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood.* 2000;95:3032-3043.
18. Spangrude GJ, Sacchi F, Hill HR, Van Epps DE, Daynes RA. Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. *J Immunol.* 1985;135:4135-4143.
19. Ma YC, Huang J, Ali S, Lowry W, Huang XY. Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell.* 2000;102:635-646.
20. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol.* 2001;2:129-134.
21. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420:868-874.
22. Steffens S, Mach F. Inflammation and Atherosclerosis. *Herz.* 2004;29:741-748.
23. Ying S, Meng Q, Zeibecoglou K, et al. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. *J Immunol.* 1999;163:6321-6329.
24. Lamkhioued B, Garcia-Zepeda EA, Abi-Younes S, et al. Monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 expression in the airways of patients with asthma. Induction in epithelial cells and mononuclear cells by proinflammatory cytokines. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:723-732.
25. Miyagishi R, Kikuchi S, Fukazawa T, Tashiro K. Macrophage inflammatory protein-1 alpha in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological diseases. *J Neurol Sci.* 1995;129:223-227.
26. Simpson J, Rezaie P, Newcombe J, Cuzner ML, Male D, Woodroffe MN. Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. *J Neuroimmunol.* 2000;108:192-200.
27. König A, Krenn V, Toksoy A, Gerhard N, Gillitzer R. Mig, GRO alpha and RANTES messenger RNA expression in lining layer, infiltrates and different leucocyte populations of synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis. *Virchows Arch.* 2000;436:449-458.
28. De Benedetti F, Pignatti P, Bernasconi S, et al. Interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with juvenile rheumatoid arthritis. Relation to onset types, disease activity, and synovial fluid leukocytes. *J Rheumatol.* 1999;26:425-431.

29. Bottazzi B, Walter S, Govoni D, Colotta F, Mantovani A. Monocyte chemotactic cytokine gene transfer modulates macrophage infiltration, growth, and susceptibility to IL-2 therapy of a murine melanoma. *J Immunol.* 1992;148:1280-1285.
30. Manome Y, Wen PY, Hershowitz A, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene transduction: an effective tumor vaccine strategy for non-intracranial tumors. *Cancer Immunol Immunother.* 1995;41:227-235.
31. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest.* 1991;88:1121-1127.
32. Yu X, Dluz S, Graves DT, et al. Elevated expression of monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:6953-6957.
33. Reape TJ, Groot PH. Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1999;147:213-225.
34. Gu L, Okada Y, Clinton SK, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell.* 1998;2:275-281.
35. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998;394:894-897.
36. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* 1997;385:640-644.
37. Pan Y, Lloyd C, Zhou H, et al. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature.* 1997;387:611-617.
38. Ludwig A, Berkhout T, Moores K, Groot P, Chapman G. Fractalkine is expressed by smooth muscle cells in response to IFN-gamma and TNF-alpha and is modulated by metalloproteinase activity. *J Immunol.* 2002;168:604-612.
39. Papadopoulos EJ, Sasseti C, Saeki H, et al. Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 1999;29:2551-2559.
40. Shimaoka T, Kume N, Minami M, et al. Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *J Biol Chem.* 2000;275:40663-40666.
41. Wilbanks A, Zondlo SC, Murphy K, et al. Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTR ligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines. *J Immunol.* 2001;166:5145-5154.
42. Raport CJ, Schweickart VL, Eddy RL, Jr., Shows TB, Gray PW. The orphan G-protein-coupled receptor-encoding gene V28 is closely related to genes for chemokine receptors and is expressed in lymphoid and neural tissues. *Gene.* 1995;163:295-299.

43. Combadiere C, Ahuja SK, Murphy PM. Cloning and functional expression of a human eosinophil CC chemokine receptor. *J Biol Chem.* 1995;270:16491-16494.
44. Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, Murphy PM. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem.* 1998;273:23799-23804.
45. Combadiere C, Gao J, Tiffany HL, Murphy PM. Gene cloning, RNA distribution, and functional expression of mCX3CR1, a mouse chemotactic receptor for the CX3C chemokine fractalkine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;253:728-732.
46. Imai T, Hieshima K, Haskell C, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell.* 1997;91:521-530.
47. Combadiere C, Ahuja SK, Murphy PM. Cloning, chromosomal localization, and RNA expression of a human beta chemokine receptor-like gene. *DNA Cell Biol.* 1995;14:673-680.
48. Loetscher M, Amara A, Oberlin E, et al. TYMSTR, a putative chemokine receptor selectively expressed in activated T cells, exhibits HIV-1 coreceptor function. *Curr Biol.* 1997;7:652-660.
49. Alkhatib G, Liao F, Berger EA, Farber JM, Peden KW. A new SIV co-receptor, STRL33. *Nature.* 1997;388:238.
50. Liao F, Alkhatib G, Peden KW, Sharma G, Berger EA, Farber JM. STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. *J Exp Med.* 1997;185:2015-2023.
51. Deng HK, Unutmaz D, KewalRamani VN, Littman DR. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature.* 1997;388:296-300.
52. Kim CH, Kunkel EJ, Boisvert J, et al. Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential. *J Clin Invest.* 2001;107:595-601.
53. Unutmaz D, Xiang W, Sunshine MJ, Campbell J, Butcher E, Littman DR. The primate lentiviral receptor Bonzo/STRL33 is coordinately regulated with CCR5 and its expression pattern is conserved between human and mouse. *J Immunol.* 2000;165:3284-3292.
54. Haskell CA, Cleary MD, Charo IF. Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation. *J Biol Chem.* 1999;274:10053-10058.
55. Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, et al. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med.* 1998;188:1413-1419.

56. Wong BW, Wong D, McManus BM. Characterization of fractalkine (CX3CL1) and CX3CR1 in human coronary arteries with native atherosclerosis, diabetes mellitus, and transplant vascular disease. *Cardiovasc Pathol.* 2002;11:332-338.
57. Greaves DR, Hakkinen T, Lucas AD, et al. Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:923-929.
58. Robinson LA, Nataraj C, Thomas DW, et al. A role for fractalkine and its receptor (CX3CR1) in cardiac allograft rejection. *J Immunol.* 2000;165:6067-6072.
59. Ruth JH, Volin MV, Haines GK, 3rd, et al. Fractalkine, a novel chemokine in rheumatoid arthritis and in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1568-1581.
60. Volin MV, Woods JM, Amin MA, Connors MA, Harlow LA, Koch AE. Fractalkine: a novel angiogenic chemokine in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol.* 2001;159:1521-1530.
61. Raychaudhuri SP, Jiang WY, Farber EM. Cellular localization of fractalkine at sites of inflammation: antigen-presenting cells in psoriasis express high levels of fractalkine. *Br J Dermatol.* 2001;144:1105-1113.
62. Fraticelli P, Sironi M, Bianchi G, et al. Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. *J Clin Invest.* 2001;107:1173-1181.
63. Efsen E, Grappone C, DeFranco RM, et al. Up-regulated expression of fractalkine and its receptor CX3CR1 during liver injury in humans. *J Hepatol.* 2002;37:39-47.
64. Cockwell P, Chakravorty SJ, Girdlestone J, Savage CO. Fractalkine expression in human renal inflammation. *J Pathol.* 2002;196:85-90.
65. Tarozzo G, Campanella M, Ghiani M, Bulfone A, Beltramo M. Expression of fractalkine and its receptor, CX3CR1, in response to ischaemia-reperfusion brain injury in the rat. *Eur J Neurosci.* 2002;15:1663-1668.
66. Feng L, Chen S, Garcia GE, et al. Prevention of crescentic glomerulonephritis by immunoneutralization of the fractalkine receptor CX3CR1 rapid communication. *Kidney Int.* 1999;56:612-620.
67. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, et al. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol.* 2000;20:4106-4114.
68. Cook DN, Chen SC, Sullivan LM, et al. Generation and analysis of mice lacking the chemokine fractalkine. *Mol Cell Biol.* 2001;21:3159-3165.
69. Haskell CA, Hancock WW, Salant DJ, et al. Targeted deletion of CX(3)CR1 reveals a role for fractalkine in cardiac allograft rejection. *J Clin Invest.* 2001;108:679-688.

70. Soriano SG, Amaravadi LS, Wang YF, et al. Mice deficient in fractalkine are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury. *J Neuroimmunol.* 2002;125:59-65.
71. Lesnik P, Haskell CA, Charo IF. Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest.* 2003;111:333-340.
72. Teupser D, Pavlides S, Tan M, Gutierrez-Ramos JC, Kolbeck R, Breslow JL. Major reduction of atherosclerosis in fractalkine (CX3CL1)-deficient mice is at the brachiocephalic artery, not the aortic root. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:17795-17800.
73. Moatti D, Faure S, Fumeron F, et al. Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood.* 2001;97:1925-1928.
74. Shimaoka T, Nakayama T, Kume N, et al. Cutting edge: SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates bacterial phagocytosis by APCs through its chemokine domain. *J Immunol.* 2003;171:1647-1651.
75. Nakayama T, Hieshima K, Izawa D, Tatsumi Y, Kanamaru A, Yoshie O. Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues. *J Immunol.* 2003;170:1136-1140.
76. Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE, Cyster JG. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol.* 2000;1:298-304.
77. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* 1997;385:729-733.
78. Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, et al. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science.* 1998;282:1281-1284.
79. Hafezi-Moghadam A, Ley K. Relevance of L-selectin shedding for leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med.* 1999;189:939-948.
80. Mullberg J, Schooltink H, Stoyan T, et al. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol.* 1993;23:473-480.
81. Althoff K, Reddy P, Voltz N, Rose-John S, Mullberg J. Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur J Biochem.* 2000;267:2624-2631.
82. Mullberg J, Althoff K, Jostock T, Rose-John S. The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *Eur Cytokine Netw.* 2000;11:27-38.
83. Rose-John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J.* 1994;300 (Pt 2):281-290.
84. Hooper NM, Karran EH, Turner AJ. Membrane protein secretases. *Biochem J.* 1997;321 (Pt 2):265-279.

85. Fernandez-Botran R. Soluble cytokine receptors: their role in immunoregulation. *Faseb J.* 1991;5:2567-2574.
86. Fernandez-Botran R, Vitetta ES. Evidence that natural murine soluble interleukin 4 receptors may act as transport proteins. *J Exp Med.* 1991;174:673-681.
87. Kahn J, Walcheck B, Migaki GI, Jutila MA, Kishimoto TK. Calmodulin regulates L-selectin adhesion molecule expression and function through a protease-dependent mechanism. *Cell.* 1998;92:809-818.
88. Walcheck B, Kahn J, Fisher JM, et al. Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro. *Nature.* 1996;380:720-723.
89. Nunan J, Small DH. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett.* 2000;483:6-10.
90. Bode W, Grams F, Reinemer P, et al. The metzincin-superfamily of zinc-peptidases. *Adv Exp Med Biol.* 1996;389:1-11.
91. Killar L, White J, Black R, Peschon J. Adamalysins. A family of metzincins including TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Ann N Y Acad Sci.* 1999;878:442-452.
92. Gould RJ, Polokoff MA, Friedman PA, et al. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1990;195:168-171.
93. Schlondorff J, Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci.* 1999;112 (Pt 21):3603-3617.
94. Moss ML, White JM, Lambert MH, Andrews RC. TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. *Drug Discov Today.* 2001;6:417-426.
95. Moss ML, Lambert MH. Shedding of membrane proteins by ADAM family proteases. *Essays Biochem.* 2002;38:141-153.
96. Zheng Y, Saftig P, Hartmann D, Blobel C. Evaluation of the contribution of different ADAMs to tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) shedding and of the function of the TNFalpha ectodomain in ensuring selective stimulated shedding by the TNFalpha convertase (TACE/ADAM17). *J Biol Chem.* 2004;279:42898-42906.
97. Howard L, Zheng Y, Horrocks M, Maciewicz RA, Blobel C. Catalytic activity of ADAM28. *FEBS Lett.* 2001;498:82-86.
98. Black RA. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34:1-5.
99. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, et al. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature.* 1994;370:555-557.

100. Arribas J, Coodly L, Vollmer P, Kishimoto TK, Rose-John S, Massague J. Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J Biol Chem*. 1996;271:11376-11382.
101. Solomon KA, Pesti N, Wu G, Newton RC. Cutting edge: a dominant negative form of TNF-alpha converting enzyme inhibits proTNF and TNFRII secretion. *J Immunol*. 1999;163:4105-4108.
102. Althoff K, Mullberg J, Aasland D, et al. Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins. *Biochem J*. 2001;353:663-672.
103. Brou C, Logeat F, Gupta N, et al. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell*. 2000;5:207-216.
104. Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, et al. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem*. 1998;273:27765-27767.
105. Rio C, Buxbaum JD, Peschon JJ, Corfas G. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *J Biol Chem*. 2000;275:10379-10387.
106. Vincent B, Paitel E, Saftig P, et al. The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J Biol Chem*. 2001;276:37743-37746.
107. Chantry A, Gregson NA, Glynn P. A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J Biol Chem*. 1989;264:21603-21607.
108. Howard L, Lu X, Mitchell S, Griffiths S, Glynn P. Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem J*. 1996;317 (Pt 1):45-50.
109. Lunn CA, Fan X, Dalie B, et al. Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNFalpha convertase. *FEBS Lett*. 1997;400:333-335.
110. Fahrenholz F, Gilbert S, Kojro E, Lammich S, Postina R. Alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10. Influences of domain structure. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;920:215-222.
111. Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:5815-5820.
112. Lammich S, Kojro E, Postina R, et al. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:3922-3927.

113. Matthews V, Schuster B, Schutze S, et al. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem.* 2003;278:38829-38839.
114. Hartmann D, de Strooper B, Serneels L, et al. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet.* 2002;11:2615-2624.
115. Tsou CL, Haskell CA, Charo IF. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine. *J Biol Chem.* 2001;276:44622-44626.
116. Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, et al. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem.* 2001;276:37993-38001.
117. Chapman GA, Moores K, Harrison D, Campbell CA, Stewart BR, Strijbos PJ. Fractalkine cleavage from neuronal membranes represents an acute event in the inflammatory response to excitotoxic brain damage. *J Neurosci.* 2000;20:RC87.
118. Chapman GA, Moores KE, Gohil J, et al. The role of fractalkine in the recruitment of monocytes to the endothelium. *Eur J Pharmacol.* 2000;392:189-195.
119. Takahashi K, Sawasaki Y, Hata J, Mukai K, Goto T. Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1990;26:265-274.
120. Suda K, Rothen-Rutishauser B, Gunthert M, Wunderli-Allenspach H. Phenotypic characterization of human umbilical vein endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial versus epithelial features. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2001;37:505-514.
121. Amour A, Knight CG, Webster A, et al. The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett.* 2000;473:275-279.
122. Amour A, Knight CG, English WR, et al. The enzymatic activity of ADAM8 and ADAM9 is not regulated by TIMPs. *FEBS Lett.* 2002;524:154-158.
123. Ludwig A, Hundhausen C, Lambert MH, et al. Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2005;8:161-171.
124. Rabinowitz MH, Andrews RC, Becherer JD, et al. Design of selective and soluble inhibitors of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE). *J Med Chem.* 2001;44:4252-4267.
125. Reiss K, Maretzky T, Ludwig A, et al. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *Embo J.* 2005;24:742-752.

126. Sahin U, Weskamp G, Kelly K, et al. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol.* 2004;164:769-779.
127. Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood.* 2005.
128. Haskell CA, Cleary MD, Charo IF. Unique role of the chemokine domain of fractalkine in cell capture. Kinetics of receptor dissociation correlate with cell adhesion. *J Biol Chem.* 2000;275:34183-34189.
129. Duggal P, An P, Beaty TH, et al. Genetic influence of CXCR6 chemokine receptor alleles on PCP-mediated AIDS progression among African Americans. *Genes Immun.* 2003;4:245-250.
130. Harrison JK, Jiang Y, Chen S, et al. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:10896-10901.
131. Geissmann F, Cameron TO, Sidobre S, et al. Intravascular immune surveillance by CXCR6⁺ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS Biol.* 2005;3:e113.
132. Salmaggi A, Gelati M, Pollo B, et al. CXCL12 in malignant glial tumors: a possible role in angiogenesis and cross-talk between endothelial and tumoral cells. *J Neurooncol.* 2004;67:305-317.
133. Desbaillets I, Diserens AC, Tribolet N, Hamou MF, Van Meir EG. Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis. *J Exp Med.* 1997;186:1201-1212.
134. Platten M, Kretz A, Naumann U, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas. *Ann Neurol.* 2003;54:388-392.
135. Chandrasekar B, Bysani S, Mummidi S. CXCL16 signals via Gi, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, I kappa B kinase, and nuclear factor-kappa B and induces cell-cell adhesion and aortic smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem.* 2004;279:3188-3196.

8. Veröffentlichungen

Veröffentlichung 1

Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K, Hartmann D, Fahrenholz F, Postina R, Matthews V, Kallen KJ, Rose-John S, Ludwig A.

The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. Blood. 2003 Aug 15;102(4):1186-95.

Veröffentlichung 2

Abel S, Hundhausen C, Mentlein R, Schulte A, Berkhout TA, Broadway N, Hartmann D, Sedlacek R, Dietrich S, Muetze B, Schuster B, Kallen KJ, Saftig P, Rose-John S, Ludwig A.

The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. J Immunol. 2004 May 15;172(10):6362-72.

Veröffentlichung 3

Ludwig A, Schulte A, Schnack C, Hundhausen C, Reiss K, Broadway N, Held-Feindt J, Mentlein R.

Enhanced expression and shedding of the transmembrane chemokine CXCL16 by reactive astrocytes and glioma cells. Akzeptiert von Journal of Neurochemistry, Januar 2005.

The Transmembrane CXC-Chemokine Ligand 16 Is Induced by IFN- γ and TNF- α and Shed by the Activity of the Disintegrin-Like Metalloproteinase ADAM10¹

Soeren Abel,^{2*} Christian Hundhausen,^{2*} Rolf Mentlein,[†] Alexander Schulte,*
 Theo A. Berkhout,^{3‡} Neil Broadway,^{3‡} Dieter Hartmann,[§] Radek Sedlacek,*
 Sebastian Dietrich,* Barbara Muetze,* Bjoern Schuster,* Karl-Josef Kallen,* Paul Saftig,*
 Stefan Rose-John,* and Andreas Ludwig^{4*}

The novel CXC-chemokine ligand 16 (CXCL16) functions as transmembrane adhesion molecule on the surface of APCs and as a soluble chemoattractant for activated T cells. In this study, we elucidate the mechanism responsible for the conversion of the transmembrane molecule into a soluble chemokine and provide evidence for the expression and shedding of CXCL16 by fibroblasts and vascular cells. By transfection of human and murine CXCL16 in different cell lines, we show that soluble CXCL16 is constitutively generated by proteolytic cleavage of transmembrane CXCL16 resulting in reduced surface expression of the transmembrane molecule. Inhibition experiments with selective hydroxamate inhibitors against the disintegrin-like metalloproteinases a disintegrin and metalloproteinase domain (ADAM)10 and ADAM17 suggest that ADAM10, but not ADAM17, is involved in constitutive CXCL16 cleavage. In addition, the constitutive cleavage of transfected human CXCL16 was markedly reduced in embryonic fibroblasts generated from ADAM10-deficient mice. By induction of murine CXCL16 in ADAM10-deficient fibroblasts with IFN- γ and TNF- α , we show that endogenous ADAM10 is indeed involved in the release of endogenous CXCL16. Finally, the shedding of endogenous CXCL16 could be reconstituted by retransfection of ADAM10-deficient cells with ADAM10. Analyzing the expression and release of CXCL16 by cultured vascular cells, we found that IFN- γ and TNF- α synergize to induce CXCL16 mRNA. The constitutive shedding of CXCL16 from the endothelial cell surface is blocked by inhibitors of ADAM10 and is independent of additional inhibition of ADAM17. Hence, during inflammation in the vasculature, ADAM10 may act as a CXCL16 sheddase and thereby finely control the expression and function of CXCL16 in the inflamed tissue. *The Journal of Immunology*, 2004, 172: 6362–6372.

Chemokines are key mediators of cell migration. Most of the over 40 members of the chemokine family are synthesized and released as small soluble molecules building up chemotactic concentration gradients for responsive cells (reviewed in Ref. 1). Cell surface-expressed glycosaminoglycans are

thought to play an important role in the immobilization of soluble chemokines for presenting them to responsive cells (reviewed in Ref. 2). On endothelial cells (ECs),⁵ immobilized chemokines induce cell adhesion and transmigration of leukocytes. There are two exceptional chemokines that are already synthesized as surface-expressed molecules: CX3C ligand 1 (CX3CL1) (1) (also termed fractalkine or neurotactin) (3, 4) and CXC-chemokine ligand 16 (CXCL16). CXCL16 was discovered recently as a ligand for the CXC-chemokine receptor CXCR6 (5) and, independently, it was described as scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein (LDL) and therefore was also termed as SR-PSOX (6). Both, CX3CL1 and CXCL16 are expressed on the cell membrane as multidomain molecules consisting of a chemokine domain followed by a glycosylated mucin-like stalk and a single transmembrane helix followed by a short cytoplasmic tail. CX3CL1 has been described on a number of different cell types, either constitutively expressed or inducible by proinflammatory mediators (3, 7, 8). To date, CXCL16 protein expression has been reported for APCs only (5, 9). CX3CL1 as well as CXCL16 also occur as soluble molecules lacking the transmembrane domain. They then function as chemoattractants, but activate different target cells. Although CX3CL1 acts through its specific receptor CX3CR1 which is expressed on monocyte subsets, NK and T cells (10–12), CXCL16 induces chemotaxis of activated T cells and bone marrow plasma cells via its receptor CXCR6 (5, 13). Transmembrane CX3CL1 also functions as adhesion molecule by establishing shear-resistant physical contact to its receptor CX3CR1 on monocytes and NK cells (10, 11). Likewise, transmembrane CXCL16 is thought to act

Institutes for *Biochemistry and [†]Anatomy, Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany; [‡]Departments of Atherosclerosis and Gene Expression and Protein Chemistry, GlaxoSmithKline, Stevenage, United Kingdom; and [§]Center for Human Genetics, Leuven and Flanders Interuniversity, Leuven, Belgium

Received for publication December 18, 2003. Accepted for publication March 12, 2004.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported in part by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant LU 869/1-2 (to A.L.), the Federal Office for Scientific, Technical, and Cultural Affairs, Belgium (UIAP P5/19), the Fonds der Chemischen Industrie (to P.S.), and Deutsche Forschungsgemeinschaft Grants Ro 632/12-1 and 12-2 and the Sonderforschungsbereich 415 project B5 (to S.R.-J.).

² S.A. and C.H. contributed equally to this work.

³ T.A.B. and N.B. are employed by GlaxoSmithKline whose potential product was studied in the present work.

⁴ Address correspondence and reprint requests to Dr. Andreas Ludwig, Institute for Biochemistry, Christian-Albrechts-University, Olshausenstrasse 40, D-24098 Kiel, Germany. E-mail address: aludwig@biochem.uni-kiel.de

⁵ Abbreviations used in this paper: EC, endothelial cell; CX3CL1, CX3C-chemokine ligand 1; CXCL16, CXC-chemokine ligand 16; ADAM, a disintegrin and metalloproteinase domain; LDL, low density lipoprotein; MEF, mouse embryonic fibroblast; HA, hemagglutinin; SMC, smooth muscle cell; GFP, green fluorescent protein; MFI, mean fluorescence intensity.

as adhesion molecule for CXCR6-expressing leukocytes as suggested by a recent report that CXCL16 immobilized to plastic surfaces is able to capture bone marrow plasma cells under physiologic flow conditions (13).

The two closely related disintegrin-like metalloproteinases a disintegrin and metalloproteinase domain (ADAM)17, also known as TNF- α -converting enzyme, and ADAM10/Kuzbanian have been implicated in a number of cleavage (shedding) processes leading to the conversion of transmembrane molecules into soluble mediators (for reference see Refs. 14 and 15). Mice with targeted disruption in the *ADAM17* or *ADAM10* gene have been generated (16, 17). The general importance of both proteases is underlined by the fact that the ADAM17-deficient mice die in utero or soon after birth and that the ADAM10-deficient embryos die at day 9.5 of embryogenesis. From ADAM17- or ADAM10-deficient embryos, cell lines of murine embryonic fibroblasts (MEF) have been generated to study the effect of ADAM10 or ADAM17 deficiency on the cleavage of transmembrane cytokines and adhesion molecules. Under normal cell culture conditions, ectodomain shedding may occur spontaneously, but in many cases it is enhanced by stimulation with phorbol esters such as PMA. ADAM17 is a key player in the PMA-induced shedding of a number of cell surface molecules involved in cell adhesion or cellular communication such as TNF- α (18), IL-6R (19), or L-selectin (16).

The existence of either transmembrane or soluble variants of CXCL16 and CX3CL1 with distinct biological functions raised the question of how the generation of either form could be regulated. For CX3CL1, it has been demonstrated that the release from neuronal cells and smooth muscle cells is sensitive to broad spectrum inhibitors of metalloproteinases (7, 8). Using a series of different inhibitors against metalloproteinases, we have shown that potent inhibitors of ADAM10 effectively block CX3CL1 release. This was further supported by our finding that ADAM10^{-/-} MEFs display a considerably reduced potential to shed CX3CL1 (20). Two other groups had previously reported that CX3CL1 release from ECs can be rapidly enhanced by PMA and that this release is to a large extent mediated by ADAM17 (21, 22). The view that disintegrin-like metalloproteinases could play a role in cell adhesion mediated by transmembrane chemokines is supported by our recent finding that CX3CL1 cleavage by ADAM10 results in the detachment of leukocytes bound to a CX3CL1-expressing cell layer (20).

To date the mechanism involved in the release of soluble CXCL16 remains unknown. In this study, we show that cell-expressed CXCL16 is released from the cell membrane by proteolytic cleavage. Using inhibitors of metalloproteinases with defined potency for distinct members of the disintegrin-like metalloproteinase family and with embryonic fibroblasts from ADAM10^{-/-} mice, we provide several lines of evidence that the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is relevant for the majority of the constitutive, but not for the PMA-inducible, cleavage of cell-expressed murine or human CXCL16. We demonstrate that the expression of endogenous CXCL16 is induced by IFN- γ and TNF- α in ECs, vascular smooth muscle cells, and in embryonic fibroblasts. Using ADAM10-deficient fibroblasts, we show that endogenous ADAM10 is indeed the most relevant sheddase of endogenous CXCL16.

Materials and Methods

Cytokines, Abs, and inhibitors

Recombinant human extracellular domain and chemokine domain CXCL16, recombinant human IFN- γ , TNF- α , and IL-4 as well as unconjugated goat anti-human CXCL16 Ab were obtained from R&D Systems (Wiesbaden, Germany). Unconjugated and biotinylated rabbit anti-human CXCL16 Ab and goat anti-murine CXCL16 Ab were from PeproTech

(London, U.K.). The rabbit antiserum B 42.1 against murine ADAM10 was characterized previously (17). The rabbit anti-human ADAM10 Ab was from Chemicon International (Hofheim, Germany).

The metalloproteinase inhibitors GW280264X ((2R,3S)-3-(formyl-hydroxyamino)-2-(2-methyl-1-propyl) hexanoic acid [(1S)-5-benzyloxycarbonylamino-1-(1,3-thiazol-2-ylcarbamoyl)-1-pentyl] amide) and GI254023X ((2R,3S)-3-(formyl-hydroxyamino)-2-(3-phenyl-1-propyl) butanoic acid [(1S)-2,2-dimethyl-1-methylcarbamoyl-1-propyl] amide) were synthesized as described in U.S. Patents US 6 172 064, US 6 191 150, and US 6 329 400. Batimastat (BB94) was synthesized at GlaxoSmithKline (7). The compounds were assayed for inhibition of recombinant human ADAM17 and ADAM10 ectodomains as described (20). Cycloheximide was from Sigma-Aldrich (Munich, Germany).

Generation of CXCL16 vectors

Human CXCL16 (GenBank accession number AF275260) was amplified by PCR from cDNA generated by reverse transcription of mRNA isolated from PMA-stimulated THP-1 cells that were reported to express CXCL16 (6). The forward primers included a restriction site for *EcoRI*, followed by a Kozak consensus sequence and the start codon (5'-CCG GAA TTC CGG AGC ATG TCT GGG AGT CAG AGC GAG G-3'). The reverse primer included a sequence coding for a hemagglutinin (HA) tag inserted in front of the CXCL16 stop codon and a restriction site for *XhoI* (5'-T CCG CTC GAG TCA AGC GTA ATC TGG AAC ATC GTA TGG GTA GGT ATT AGA GTC AGG TGC CAC AGG TAT ATA ATG AAC CG-3'). The PCR product was first cloned into pCR4blunt-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). The correct sequence was then inserted in the expression vector pcDNA3.1 (Invitrogen) using *EcoRI* and *XhoI*.

Murine CXCL16 (GenBank accession number AF301017) was amplified by PCR from cDNA generated from RNA of murine spleen using primers 5'-CC GGA ATT CGG CCG GAG ATG AGG CGG GG-3' and 5'-T CCG CTC GAG CTA GGG TCT TGG TTC AAC AGG AGT GTA CC-3' with restriction sites for *BamHI* and *XhoI*, respectively. The PCR product was ligated into pCR4blunt-TOPO and sequenced. Subsequently, it was inserted into the gateway vector pENTR2b (Invitrogen) and finally into the bicistronic expression vector pBS-IRES-GFP that was kindly donated by Dr. H. Gascan (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Angers, France) and that was supplemented with an additional gateway cassette for the clonase reaction (Invitrogen).

Cell culture and transfection

Cryopreserved ECs from human umbilical vein and smooth muscle cells (SMC) from human aorta were obtained from BioWhittaker (Berkshire, U.K.). Cells were cultured in six-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) in complete medium as supplied by BioWhittaker. SMCs were made quiescent by starvation in basal medium in the absence of FCS and growth factors for 24 h before stimulation. ECs and quiescent SMCs were stimulated with IFN- γ and TNF- α (both 20 ng/ml) for different periods of time. The primate kidney fibroblast cell line COS-7 was cultured and transfected essentially as described previously (20).

The ADAM10^{-/-} murine embryonic fibroblast cell line ADAM10 40^{-/-} and the wild-type fibroblast cell line PS1^{+/+} were generated from ADAM10^{-/-} mice and respective wild-type animals as described elsewhere (17, 23). Cells were cultured in DMEM containing 10% FCS (all cell culture media and reagents were from PAA (Coelbe, Germany) if not otherwise stated). For retransfection of ADAM10 in ADAM10-deficient MEFs, cDNA of bovine HA-tagged ADAM10 (20) was inserted into a retroviral expression vector based on pCXbsr (accession number AB041927). Ecotropic BOSC23 packaging cells were transfected with the retroviral vector using FuGENE (Roche, Mannheim, Germany). At day 2 after transfection, supernatants were collected, cleared by centrifugation, and added to ADAM10^{-/-} MEFs in the presence of 10 ng/ml sebacarene (Sigma-Aldrich). After 6 days, transfected cells were subcloned by limiting dilution and positive colonies were selected by the expression of green fluorescent protein (GFP) encoded by the vector. For transient transfection with CXCL16, MEFs were seeded at 1×10^4 cells/cm² in six-well dishes (Costar/Corning, Koolhaven, The Netherlands) and incubated for 24 h to 70% confluence. The medium was replaced with 1 ml of fresh medium. Each well received 100 μ l of serum-free medium containing 2 μ g of CXCL16 pcDNA3.1 and 3 μ l of FuGENE (Roche). Cells were cultured for 48 h and subsequently assayed for their capacity to cleave membrane-bound CXCL16. All transient transfections were performed in triplicates for each stimulatory condition. In all experiments, efficiency of transient transfections was controlled in parallel by transfection with GFP in pcDNA3.1 and subsequent detection of expressed GFP by fluorescence microscopy.

The adherent human cell line ECV-304 was transfected with CXCL16 (CXCL16-ECV-304) using the same protocol. CXCL16-ECV-304 cells were cultured in M199 medium supplemented with 10% FCS and antibiotics up to 90% confluence before subculture. Stably transfected ECV cells were generated by selection with 600 $\mu\text{g/ml}$ geneticin and made monoclonal 6 days after transfection by subculture of the growing colonies.

Relative quantification of CXCL16 mRNA by TaqMan RT-PCR

RNA was isolated from cultured ECs or SMCs using TRIzol reagent (Life Technologies, Grand Island, NY). Total RNA (1 μg) was treated with DNaseI (Life Technologies) and reverse transcribed to cDNA using Superscript II polymerase (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. For each sample, a control without Superscript II was run parallel to allow assessment of genomic DNA contamination. Each cDNA sample was analyzed for expression of CXCL16 and GAPDH by real-time quantitative RT-PCR using the fluorescent TaqMan 5'-nuclease assay as previously described (8). Oligonucleotide primers and probes were designed using Primer Express software version 1.0 (PE Biosystems, Warrington, U.K.) and synthesized by PE Biosystems. Sequences of forward primer, reverse primer, and probe for CXCL16 were 5'-GAG CTC ACT CGT CCC AAT GAA-3', 5'-TCA GGC CCA ACT GCC AGA C-3', and 5'-FAM CAC CAT TCA CAC TGC GGG CCA C TAMRA-3'. Levels of CXCL16 and GAPDH mRNA were quantified by comparison of the fluorescence of each sample with that of a serially diluted standard of human genomic DNA (Promega, Southampton, U.K.).

CXCL16 cleavage assays

CXCL16-expressing cells were grown to 70–90% confluence in complete medium in six-well dishes (Nunc) for 24 h before stimulation. The cells were washed with PBS and 0.75 ml of FCS-free medium with or without metalloproteinase inhibitors was added. After 10 min, the cells were stimulated with PMA (200 ng/ml) for various periods of time. The conditioned media were harvested, and 0.75 ml of protease inhibitor mixture (Complete; Roche) was added according to the instructions of the manufacturer. The supernatants were centrifuged to remove nonadherent cells and, if necessary, concentrated 10-fold using 10-kDa cut-off filtration units (Vivaspin; Vivascience, Hannover, Germany). The presence of released CXCL16 in the conditioned media was demonstrated by Western blotting and quantified by ELISA (see below). The cells were washed with 2 ml of PBS and removed from the vessel by scraping in 1 ml of ice-cold PBS. CXCL16 surface expression of intact cells was determined by flow cytometry. To quantify cell-associated CXCL16 by ELISA, the cells were centrifuged and resuspended in 0.75 ml of PBS containing 0.1% Triton X-100 and a protease inhibitor mixture (Complete; Roche). After 30 min of incubation on ice under agitation, lysates were centrifuged at 12,000 $\times g$ for 10 min. The presence of equal amounts of protein in the lysates of differently treated cells was controlled by a bicinchoninic acid-based protein assay (Pierce, Rockford, IL).

CXCL16-specific ELISA

The ELISA for human CXCL16 was conducted in Microton 96-well plates (Greiner, Nurtigen, Germany) at room temperature, the reaction volume was 50 μl . The plate was coated overnight with 2 mg/ml goat anti-human CXCL16 in 50 mM Na_2CO_3 (pH9.3), washed three times with 0.05% Tween in PBS (PBS-T), and blocked with PBS-T containing 2% BSA for 2 h. The plate was dried and the samples were added for 2 h. A standard prepared as nine serial 1/2 dilutions of 1.25 nM recombinant human CXCL16 in either PBS-T with 1% BSA, serum-free medium, or cell lysis buffer was run in parallel. Following washing, 200 ng/ml biotinylated rabbit anti-human CXCL16 in PBS-T/1% BSA were added to each well and the plate incubated at room temperature for 1 h. After washing, 100 mU/ml streptavidin-peroxidase conjugate (Roche) in PBS-T/1% BSA was added for 1 h. After washing, chromogenic peroxidase substrate (BM blue; Roche) was added. The reaction was stopped after a 20-min incubation by addition of 1.8 M H_2SO_4 before the OD was determined at 450 nm. The specificity of the ELISA was demonstrated by its positive reaction with lysates and conditioned media of CXCL16-transfected COS-7 cells or ECV-304 cells without showing any reaction with that of the respective wild-type cells or that of cells that were transfected to express murine CXCL16 or human CX3CL1 (20). The detection limit of the ELISA was 12 pM of either the extracellular domains or only the chemokine domain of CXCL16. The ELISA specific for murine CXCL16 was purchased from R&D Systems and performed following the manufacturer's instructions. The ELISA reacted with lysates of COS-7 cells transfected with murine CXCL16 but not with that of cells transfected with human CXCL16 or empty vector.

Western blot analysis of CXCL16 and ADAM10

Western analysis was performed as described previously (20). In brief, concentrated media samples were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions using 10 or 7.5% Tris-glycine gels for subsequent detection of CXCL16 or ADAM10, respectively. Proteins were then transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Hybond-P; Amersham, Piscataway, NJ) that were probed with dilutions of rabbit anti-HA-tag (0.4 $\mu\text{g/ml}$), rabbit anti-human CXCL16 (0.2 $\mu\text{g/ml}$), goat anti-murine CXCL16 Ab (0.2 $\mu\text{g/ml}$), or rabbit antiserum to murine ADAM10 (1/10,000). Bound Ig was detected with either goat anti-rabbit Ig or pork anti-goat Ig, (both from Pierce, coupled with HRP, diluted 1/10,000) and subsequent addition of ECL substrate (ECLplus; Amersham). Signals were recorded using a luminescent image analyzer (Fujifilm Image reader, LAS1000; Fuji, Tokyo, Japan).

Analysis of CXCL16 surface expression by flow cytometry

Cells were resuspended in ice-cold PBS containing 0.1% BSA and 0.01% NaN_3 at 3×10^5 cells/ml and incubated with purified rabbit anti-human CXCL16 or rabbit IgG control (both at 2 $\mu\text{g/ml}$ in PBS with 0.1% BSA and 0.01% NaN_3) for 1 h on ice. Following 2-fold washing, cells were incubated with secondary fluorescein-conjugated goat anti-rabbit IgG (DK; DAKO, Carpinteria, CA) for 1 h on ice. Cells were washed twice and suspended in ice-cold PBS containing 2% paraformaldehyde. The fluorescence signal of the labeled cells was then analyzed by flow cytometry (FACScan; BD Biosciences, Heidelberg, Germany) and calculated as median fluorescence intensity (MFI) of the cell population.

Statistical analysis

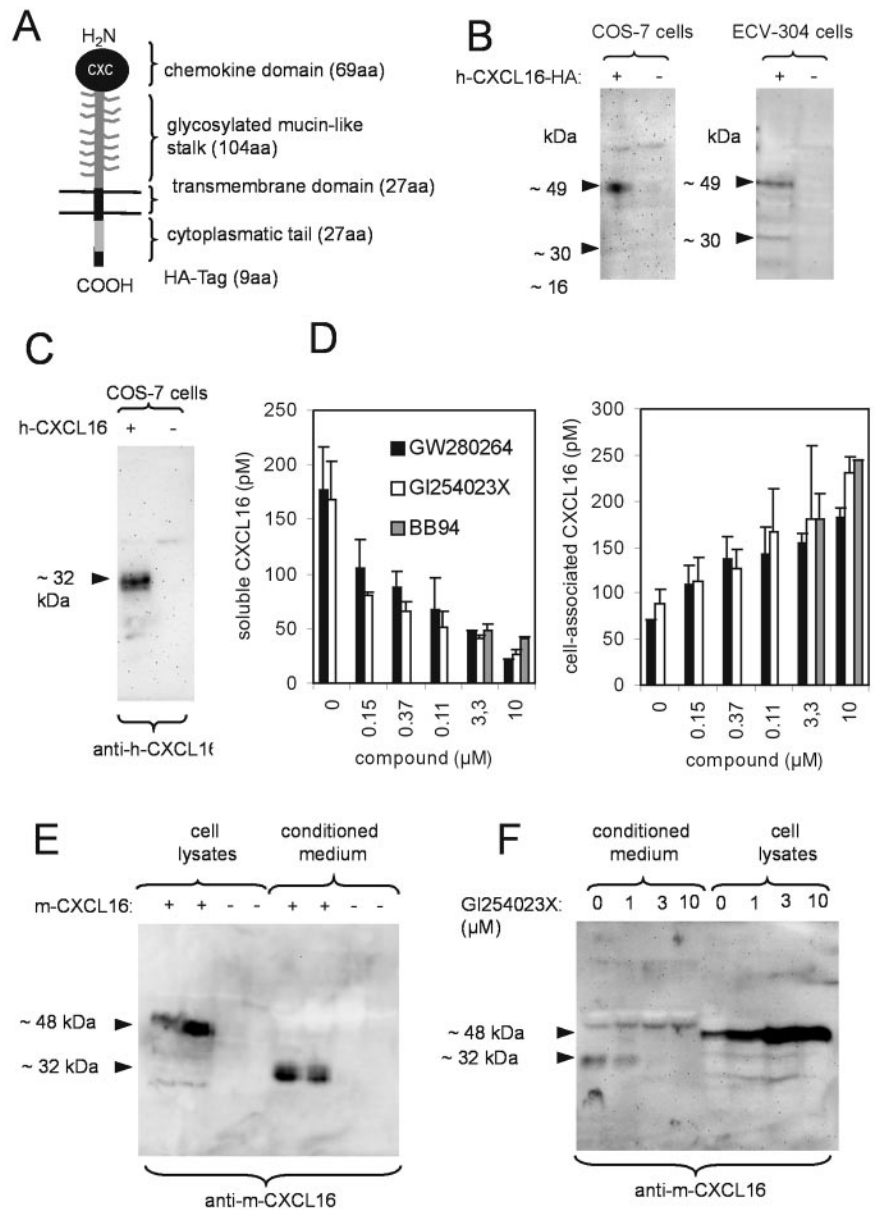
Data were statistically analyzed using the unpaired two tailed *t* test. Two populations of data significantly different at *p* values smaller than 0.05 or 0.01 were indicated by one or two asterisks, respectively.

Results

Soluble CXCL16 is generated by proteolytic cleavage of a cell-expressed precursor

To examine the mechanism of CXCL16 cleavage, CXCL16 cDNA was generated from PMA-stimulated THP-1 cells and C-terminally tagged with an HA tag (Fig. 1A). Human CXCL16-HA cDNA was transiently transfected into COS-7 cells followed by Western blot analysis of the cell lysates. An HA-specific Ab revealed the presence of a broad band migrating at 49 kDa and a faint band of ~ 16 kDa (Fig. 1B). None of the bands was detected in nontransfected cells suggesting that they represent CXCL16 proteins of different size but with an intact C terminus. ECV-304 cells that were stably transfected with human CXCL16-HA consistently produced one major protein band at 48 kDa and two faint bands at 30 and 16 kDa (Fig. 1B). Concentrated media of CXCL16-transfected COS-7 cells were then analyzed for the presence of soluble CXCL16 with an Ab directed against the chemokine domain of CXCL16. The Ab recognized a 32-kDa protein in the supernatant that was not present in untransfected cells and therefore most likely represents soluble CXCL16 (Fig. 1C). To obtain first information about the mechanism of CXCL16 release, cells were treated with inhibitors of metalloproteinases that differed in their ability to block the two disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 which have both been implicated in the shedding of other transmembrane cytokines or receptors such as IL-6R and CX3CL1 (20, 21, 24). A sandwich ELISA using anti-CXCL16 Abs from goat and rabbit was used to quantify the amount of released and cell-associated CXCL16 in the conditioned media and cell lysates of CXCL16-transfected COS-7 cells, respectively. The ELISA was specific for CXCL16 because it did not cross-react with supernatants or cell lysates of untransfected COS-7 cells (data not shown). As shown in Fig. 1D, the release of soluble CXCL16 was effectively blocked by the broad spectrum inhibitor of metalloproteinases batimastat (BB94) which was associated with an increase in cellular CXCL16 detectable in the cell lysates. The two hydroxamates GW280264X and

FIGURE 1. Transient expression and release of human and murine CXCL16. **A**, Schematic structure of the human CXCL16 construct used for transfection. The transmembrane molecule consists of an N-terminal chemokine domain on a highly glycosylated mucin-like stalk, a transmembrane domain, and a short cytoplasmic tail. Human CXCL16 was C-terminally fused with an HA tag for detection of the transmembrane molecule in the cell lysates. The number of amino acids encompassed by each single domain is given in parentheses. **B**, Human HA-tagged CXCL16 or empty vector were transiently transfected into COS-7 cells or into ECV-304 cells. Cell extracts were analyzed by Western blotting with an anti-HA Ab. **C**, COS-7 cells were transiently transfected with human CXCL16 or treated with empty vector. Subsequently, cells were incubated for 8 h in serum-free medium. The conditioned media were concentrated 30-fold and analyzed by Western blotting using a rabbit Ab to the chemokine domain of CXCL16. **D**, COS-7 cells transfected with CXCL16 were incubated for 8 h in serum-free medium with 10 or 3.3 μ M batimastat (BB94); 10, 3.3, 1.1, 0.37, 0.15, or 0 μ M GW280264X (mixed ADAM10/ADAM17 inhibitor); or 10, 3.3, 1.1, 0.37, 0.15, or 0 μ M GI254023X (preferential ADAM10 inhibitor). The conditioned media and cell lysates (both 0.75 ml per dish) were then analyzed for the presence of CXCL16 by ELISA and results were calculated as mean and SD of one representative experiment performed in triplicates. **E**, COS-7 cells were transiently transfected with murine CXCL16 or control vector, washed, and incubated for 8 h in serum-free medium. Subsequently, murine CXCL16 was detected in the cell extracts and 10-fold concentrated media samples using a goat Ab against the chemokine domain of murine CXCL16. **F**, COS-7 cells transfected with murine CXCL16 were incubated in serum-free medium in the absence or presence of GI254023X for 8 h and assayed for the expression and release of CXCL16 in the cell lysates and conditioned media, respectively. Results are representative of three independent experiments.



GI254023X that both inhibit ADAM10, but of which only the former blocks ADAM17 (20), showed a very similar concentration-dependent inhibition of CXCL16 release. Therefore, ADAM17 inhibition does not seem to be required for blocking constitutive CXCL16 shedding.

We then thought to determine whether the murine CXCL16 sharing 49% of its amino acid sequence with that of its human homologue would also be subject to metalloproteinase-mediated cleavage. Generation of murine CXCL16 cDNA from spleen and transfection in COS-7 cells resulted in a prominent broad band migrating at 48 kDa as detected by a polyclonal Ab against murine CXCL16 (Fig. 1E). This murine 48-kDa protein most likely corresponds to the human 49-kDa form of HA-tagged CXCL16. Moreover, analysis of concentrated media samples from COS-7 cells transfected with murine CXCL16 revealed a dominant protein band with a very similar molecular size as that found for the soluble form of human CXCL16 (both 32 kDa). As shown in Fig. 1F, the release of the soluble 32-kDa variant of murine CXCL16 was completely suppressed by the inhibitor GI254023X, preferentially blocking ADAM10 but not ADAM17, and instead, the 48-

kDa form of CXCL16 was accumulated in the cell lysates (Fig. 1F). Taken together, these data strongly suggest that the soluble 32-kDa forms of human as well as murine CXCL16 were generated by metalloproteinase-mediated proteolytic cleavage of cell-associated proteins.

Ectodomain cleavage of surface-expressed CXCL16

We next determined whether CXCL16 cleavage would in fact modulate the surface expression of the transmembrane chemokine. We first examined whether anti-CXCL16 Abs from rabbit or goat could be used to analyze CXCL16 surface expression by flow cytometry. As shown in Fig. 2A, the rabbit Ab to CXCL16 reacted with CXCL16-transfected ECV-304 but not with the nontransfected cells. A very similar Ab reactivity was seen with the goat Ab against CXCL16 (data not shown), indicating that both Abs were indeed suitable to detect CXCL16 on the cell surface. Flow cytometry was then used to study the effect of CXCL16 shedding on the surface expression of the chemokine on CXCL16-ECV-304 cells. Inhibition of CXCL16 cleavage by the ADAM10 inhibitor

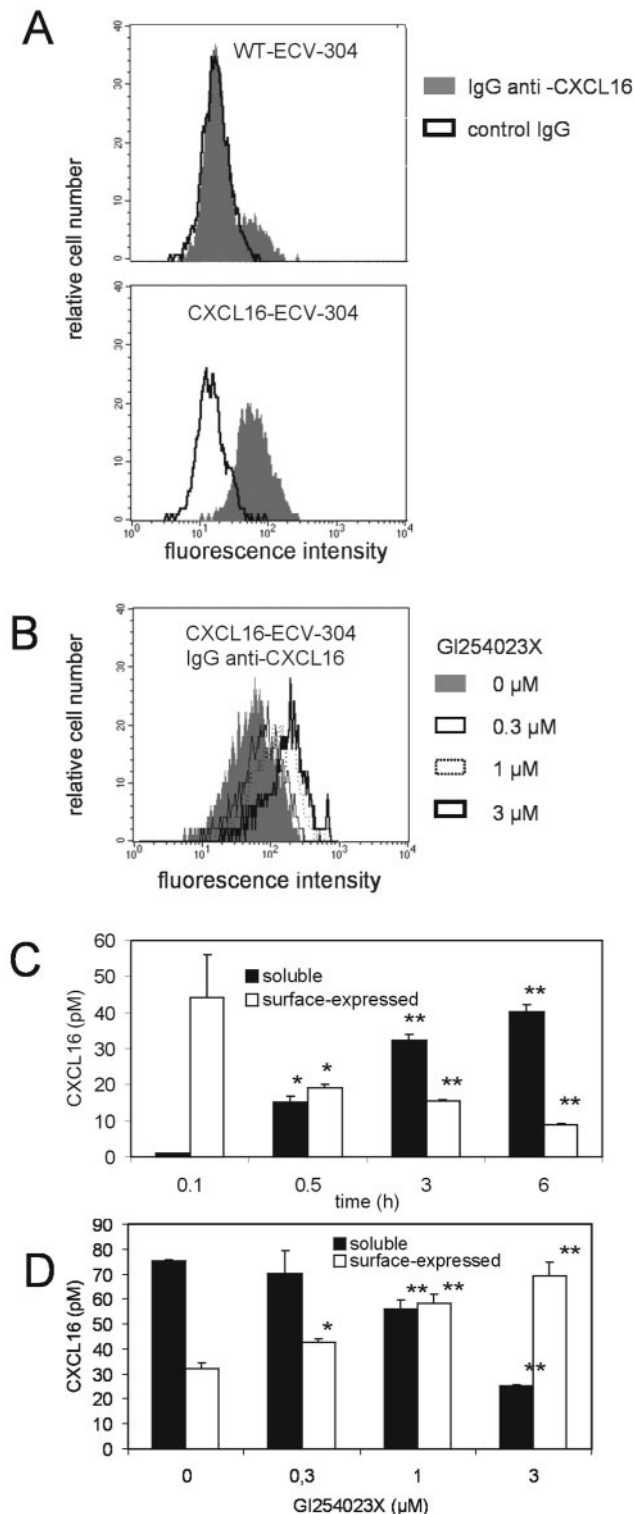


FIGURE 2. Flow cytometry analysis of human CXCL16 surface expression and shedding of surface-labeled CXCL16 from stably transfected ECV-304 cells. *A*, WT-ECV-304 and CXCL16-ECV-304 cells were incubated with a rabbit anti-human CXCL16 Ab or an IgG control on ice. Subsequently, cell-bound Abs were detected by a fluorescein-conjugated secondary Ab and fluorescence was recorded by flow cytometry. *B*, CXCL16-ECV-304 cells were incubated for 4 h in serum-free medium in the presence of various concentrations of the ADAM10 inhibitor GI254023X. Subsequently, CXCL16 expression was analyzed by flow cytometry. Inhibition of CXCL16 release by the inhibitor was controlled in parallel by quantification of released CXCL16 in the conditioned media. Histograms shown in *A* and *B* were representative of three separate experiments. *C* and *D*, CXCL16-ECV-304 cells were labeled with biotinylated

GI254023X dose dependently increased CXCL16 surface expression (Fig. 2*B*), which was associated with a reduced release of soluble CXCL16 (data not shown). To analyze whether surface-expressed CXCL16 is subject to proteolytic shedding, CXCL16-ECV cells were labeled with a biotinylated Ab to CXCL16. Subsequently, cells were washed and incubated for different periods of time at 37°C. The complex of biotinylated Ab and shed CXCL16 in the conditioned medium was captured by an anti-CXCL16 Ab immobilized to a microtiter plate. A similar procedure was followed with the cell lysates containing the cell-associated CXCL16. Subsequently, the amount of the bound chemokine Ab complex was determined by quantification of its biotin conjugate. As shown in Fig. 2*C*, Ab-labeled CXCL16 was released into the media in a time-dependent fashion that was associated with a reduction of surface-expressed CXCL16. In the presence of the ADAM10 inhibitor GI254023X, however, the majority of labeled CXCL16 remained on the cell surface (Fig. 2*D*). These data indicate that a metalloproteinase activity is responsible for the down-regulation of surface-expressed CXCL16.

Constitutive cleavage of CXCL16 involves the activity of ADAM10

To further investigate the role of ADAM10 in the CXCL16 cleavage, we used MEFs that were generated from ADAM10-deficient mice (17). As shown by Western blotting with an antiserum against murine ADAM10 (Fig. 3*A*, left panel) these cells completely lack ADAM10 because neither the 85-kDa proform nor the 64-kDa mature form, which are both present in wild-type MEFs of the same genetic background, can be detected. To restore ADAM10 expression, ADAM10^{-/-} MEFs were stably transfected with bovine HA-tagged ADAM10. As seen with an anti-HA-tag Ab, both the processed and immature forms of bovine ADAM10-HA were present in the retransfected cells (Fig. 3*A*, right panel). Following transfection with human CXCL16, MEFs were cultured for 4 h in fresh serum-free medium and subsequently, the shedding of CXCL16 was analyzed by quantification of the chemokine in the media and in the cell lysates using ELISA. As shown in Table I, the ADAM10^{-/-} MEFs released reduced levels of CXCL16 but contained increased amounts of the chemokine in their cell lysates compared with the ADAM10^{+/+} MEFs. The amount of released CXCL16 expressed as percentage of the total chemokine content was reduced from 51% in the ADAM10^{+/+} cells to 13% in the ADAM10^{-/-} cells. To exclude that differences between the two cell lines independent from ADAM10 may account for their different shedding activity, CXCL16 shedding was also quantified in the same ADAM10^{-/-} cell line that was retransfected with ADAM10. As expected, the shedding activity was completely restored upon retransfection of ADAM10 (Fig. 3*B*).

To investigate the shedding of CXCL16 under more physiological conditions endogenous expression of CXCL16 was induced in MEFs by cytokine stimulation. Costimulation with IFN- γ and TNF- α led to a profound time-dependent up-regulation of cell-associated CXCL16 and the release of soluble protein as detected

anti-CXCL16 Ab and repeatedly washed to remove free Ab. Cells were either incubated for various periods of time (*C*) or incubated for 4 h in the presence of increasing dosages of the ADAM10 inhibitor GI254023X (*D*). Subsequently, the labeled chemokine was quantified in the lysates and conditioned media (both 0.75 ml per dish) by capturing and detecting the biotinylated Ab/CXCL16 complex with a CXCL16-specific ELISA. Data in *C* and *D* are given as mean and SD of triplicates of one representative of three separate experiments and statistically significant differences in CXCL16 shedding caused by the inhibitor are indicated by asterisks (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

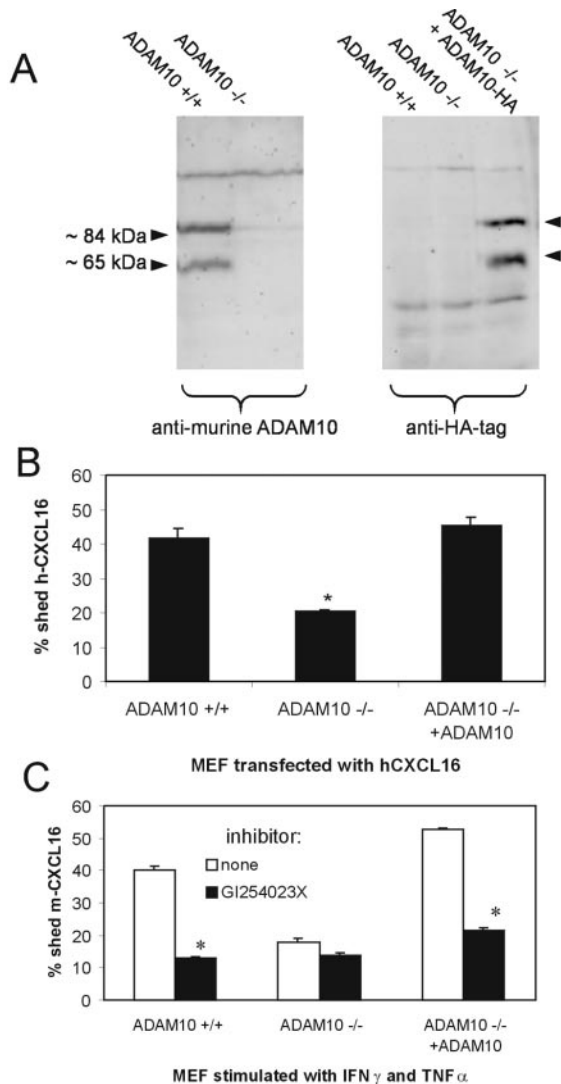


FIGURE 3. CXCL16 shedding in ADAM10-deficient MEFs. *A*, SDS-lysates of ADAM10^{+/+} MEFs, ADAM10^{-/-} MEFs, and ADAM10^{-/-} MEFs retransfected with HA-tagged bovine ADAM10 were analyzed for the presence and absence of ADAM10 by Western blotting using Abs against the murine ADAM10 (*left*) or the HA tag, respectively (*right*). *B*, Human CXCL16 was transfected in ADAM10^{+/+}, ADAM10^{-/-}, and ADAM10-retransfected ADAM10^{-/-} MEFs. Shedding of CXCL16 was analyzed by incubation of cells for 4 h in serum-free medium and subsequent quantification of soluble and cell-associated CXCL16 by ELISA. The amount of shed soluble human CXCL16 is expressed as the percentage of the total CXCL16 content including soluble and cell-associated molecules. The statistically significant difference in CXCL16 shedding between the ADAM10^{-/-} MEFs and the ADAM10^{+/+} or ADAM10-retransfected ADAM10^{-/-} cells is indicated by an asterisk ($p < 0.05$). *C*, MEFs were costimulated with IFN- γ and TNF- α (both 20 ng/ml) to express endogenous murine CXCL16. The cells were incubated in serum-free medium for 4 h in the absence or presence of the preferential ADAM10 inhibitor GI254023X and shedding of murine CXCL16 was analyzed by an ELISA specific for murine CXCL16 and calculated as described for *B*. Data in *B* and *C* are given as mean and SD of one representative experiment performed in triplicates. Statistically significant differences in CXCL16 shedding caused by deletion of ADAM10 (*B*) or by the inhibitor (*C*) are indicated by asterisks ($p < 0.05$). Results are representative for at least three independent experiments.

by the ELISA specific for murine CXCL16 (data not shown). The level of total induced CXCL16 protein was not influenced by the absence or presence of ADAM10 (data not shown). Quantification

of shed CXCL16 in relation to the total protein revealed that the ADAM10^{-/-} cells released less CXCL16 (18%) compared with the wild-type cells (40%, Fig. 3*C*). Moreover, the CXCL16 shedding was restored in the cells retransfected with ADAM10 (52% shed CXCL16). As expected, the ADAM10 inhibitor GI254023X (3 μ M) markedly reduced CXCL16 cleavage in the wild type and the ADAM10 retransfected cells, but not in the ADAM10^{-/-} cells (Fig. 3*C*), confirming that the inhibition of CXCL16 shedding in wild-type fibroblasts by the inhibitor is indeed due to inhibition of ADAM10. Notably, in the presence of the broad spectrum inhibitor batimastat (BB94) or GW280264X (both 3 μ M), the residual CXCL16 release from ADAM10^{-/-} cells was almost completely reduced (data not shown) suggesting that other metalloproteinases contribute to the residual CXCL16 cleavage in ADAM10^{-/-} cells. To investigate the possibility that stimulation with IFN- γ and TNF- α might have altered the expression or the activity of endogenous ADAM10 in murine fibroblasts, the cells were transfected with human CXCL16 and subsequently stimulated with a combination of the two cytokines (both 20 ng/ml) for 24 h. As expected, stimulation with IFN- γ and TNF- α increased the expression of murine CXCL16 in the conditioned medium as well as in the cell lysate and did not interfere with the expression of transfected human CXCL16 (Table II). Because the percentage of shed human CXCL16 was not modulated by the two cytokines (Table II) ADAM10 does not appear to be regulated by IFN- γ and TNF- α .

Enhancement of CXCL16 release by PMA does not involve ADAM10

As described for other substrates of disintegrin-like metalloproteinases including TNF- α , L-selectin, IL-6R, and CX3CL1, shedding can be rapidly enhanced by cell stimulation with PMA (16, 21, 25). To investigate whether PMA would have a similar effect on CXCL16 shedding, CXCL16-transfected COS-7 cells were stimulated with PMA (200 ng/ml) and subsequently assayed for the release of soluble CXCL16. One-hour treatment with PMA was sufficient to increase the CXCL16 release. This PMA-induced increase was maximal after 2 h and not further enhanced during longer treatment (Fig. 4*A*). Because this PMA response is very rapid it does not seem to be due to enhanced biosynthesis of CXCL16 or metalloproteinases. Indeed, the increased release of CXCL16 during 2 h of treatment with PMA was associated with an equivalent reduction of the protein concentration in the cell lysate (Fig. 4*B*), showing that PMA did not alter the amount of totally expressed CXCL16 (shed plus cell-associated molecules). Western blot analysis of the 50-fold concentrated conditioned media revealed that stimulation of CXCL16-transfected COS-7 cells with PMA for 2 h enhanced the release of 32-kDa CXCL16 protein and did not generate additional CXCL16 variants (Fig. 4*C*). To investigate the role of metalloproteinases in the PMA-induced increase in CXCL16 release, CXCL16-transfected COS-7 cells were pretreated with different metalloproteinase inhibitors and subsequently stimulated with PMA for 2 h (Fig. 4*D*). The broad spectrum inhibitor batimastat (BB94) and the combined ADAM17/ADAM10 inhibitor (GW280264X) both blocked both the constitutive and the PMA-induced shedding. The preferential ADAM10 inhibitor (GI254023X) also reduced the constitutive CXCL16 release; however, the PMA-induced increase of CXCL16 shedding in the inhibitor-treated cells remained similar to that in the untreated cells. The latter finding may indicate that ADAM10 does not contribute to the PMA-inducible shedding. Indeed, when CXCL16 transfected ADAM10^{-/-} MEFs were assayed for their response to PMA, CXCL16 shedding was increased upon PMA stimulation and this increase was even more pronounced than that found in ADAM10^{-/-} MEFs retransfected with ADAM10 (Fig.

Table I. Expression and release of human CXCL16 in ADAM10^{-/-} and ADAM10^{+/+} MEFs

	Soluble CXCL16 (pM)		Cell-Associated CXCL16 (pM)		Total CXCL16 (fmol/dish) ^a		Shed CXCL16 (% of total) ^b	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
ADAM10 ^{+/+} ^c	310 ^d	11	271	12	581	19	51.2	1.0
ADAM10 ^{-/-}	140 ^e	21	928 ^e	85	1068 ^e	102	13.5 ^e	0.6

^a The amount of total CXCL16 molecules per dish was calculated as the soluble plus cell-associated CXCL16.

^b Shed CXCL16 was expressed as percent soluble of the total CXCL16.

^c ADAM10^{+/+} and ADAM10^{-/-} MEFs (150,000 cells per dish) were transfected with human CXCL16 for 48 h, followed by 4 h incubation in serum-free medium. Subsequently, the concentration of soluble and cell-associated CXCL16 was determined in the media and cell lysates (both 0.75 ml per dish) by ELISA.

^d Data are given as mean and SD of one representative of three experiments each performed in triplicates.

^e Statistically significant differences in CXCL16 shedding in ADAM10^{+/+} vs ADAM10^{-/-} cells ($p < 0.05$).

4E). In summary, our data provide several lines of evidence that CXCL16 shedding predominantly involves ADAM10. By contrast, ADAM10 does not seem to be responsible for the increase in CXCL16 shedding seen in response to PMA.

CXCL16 is expressed and shed by cytokine-stimulated vascular cells

Because the other transmembrane chemokine CX3CL1 is profoundly up-regulated in cultured ECs and vascular SMCs by co-stimulation with the proinflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α (8, 26), we investigated these cells for the expression of CXCL16 mRNA by quantitative TaqMan RT-PCR. To study possible up-regulation of the chemokine, cells were stimulated with IFN- γ or TNF- α or a combination of both. In nonstimulated ECs and SMCs, the level of CXCL16 mRNA was very low and stimulation for 24 h with either TNF- α or IFN- γ alone led to a slight up-regulation (Fig. 5, A and B). However, CXCL16 mRNA was profoundly increased in cells costimulated with IFN- γ and TNF- α . By ELISA, only minute amounts of CXCL16 protein could be detected in the cell lysates and conditioned media of nonstimulated ECs and SMCs. However, after 24 h of stimulation with IFN- γ and TNF- α , CXCL16 protein was profoundly up-regulated (Fig. 5C). In ECs, even more CXCL16 was released than remained associated with the cells. Because IL-4 is a possible negative regulator for IFN- γ - or TNF- α -induced responses in ECs such as the induction of CX3CL1 (26), we next stimulated ECs with IFN- γ /TNF- α (both 10 ng/ml) for 24 h in the presence or absence of IL-4 (20 ng/ml). As described for CX3CL1, the generation of soluble and cell-associated CXCL16 in IFN- γ /TNF- α -stimulated cells was markedly suppressed by IL-4 (Fig. 5D).

We then addressed the question of whether ADAM10 protein would be present in ECs and could therefore be a candidate en-

zyme for CXCL16 cleavage. Indeed, as seen by Western blotting with an Ab against human ADAM10, two immunoreactive proteins of 85 and 64 kDa are expressed in unstimulated as well as in IFN- γ /TNF- α -stimulated ECs matching the size of the immature and the processed form of ADAM10 (Fig. 6A). Inhibition experiments were then performed with the mixed ADAM10/ADAM17 inhibitor (GW280264X) and the preferential ADAM10 inhibitor (GI254023X). As shown in Fig. 6B, both inhibitors profoundly reduced the release of CXCL16 from IFN- γ /TNF- α -stimulated ECs. The inhibition was concentration dependent and very similar for both inhibitors suggesting that they are both equally capable of blocking a protease activity that is involved in the constitutive cleavage of CXCL16 in IFN- γ /TNF- α -stimulated ECs and very likely represents ADAM10 but not ADAM17. We then studied the up-regulation of CXCL16 on the surface of IFN- γ /TNF- α -stimulated ECs by flow cytometry. As expected, the inhibition of constitutive CXCL16 shedding by GI254023X or GW280264X further increased the surface expression of the transmembrane chemokine (Fig. 6, C and D). In addition, the ADAM10/ADAM17 inhibitor GW280264X fully prevented the down-regulation of CXCL16 surface expression in response to PMA (Fig. 6D), whereas the ADAM10 inhibitor GI254023X had no effect (data not shown), suggesting that the metalloproteinase involved in the PMA-inducible shedding is not ADAM10 and may represent ADAM17.

Discussion

The recently discovered CXC-chemokine CXCL16 is one of the two known chemokines that are linked to the plasma membrane via a mucin-like stalk and a transmembrane domain. It is found as a membrane-bound and soluble form with completely different biological functions. Although soluble CXCL16 functions as a

Table II. Effect of IFN- γ and TNF- α on the shedding of transfected human CXCL16 in MEFs

	Transfected Human CXCL16 ^a						Endogenous Murine CXCL16 ^b					
	Soluble (pM)		Cell-associated (pM)		Shed (% of total) ^c		Soluble (pM)		Cell-associated (pM)		Shed (% of total) ^c	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
None	203 ^c	21.6	152.4	7.6	57.0 ^d	1.4	2.9	0.1	3.3	0.1	46.4	1.3
IFN- γ /TNF- α	186.2	11.9	139.2	1.9	57.1 ^d	1.5	11.5	1.3	11.6	1	49.9	1.9

^a ADAM10^{+/+} MEFs (150,000 cells per dish) were transfected with human CXCL16 for 24 h, followed by 24 h incubation in the presence or absence of IFN- γ and TNF- α (both 20 ng/ml), thereafter, cells were incubated for 4 h in serum-free medium and the concentration of soluble and cell-associated human CXCL16 was determined as explained in Table I.

^b As a control, the up-regulation of endogenous murine CXCL16 by IFN- γ and TNF- α was determined in parallel.

^c The amount of total CXCL16 molecules per dish was calculated as the soluble plus cell-associated CXCL16 and shed CXCL16 was expressed as percent soluble of the total CXCL16.

^d The shedding of human CXCL16 in untreated and IFN- γ /TNF- α -stimulated MEFs was not significantly different ($p < 0.01$).

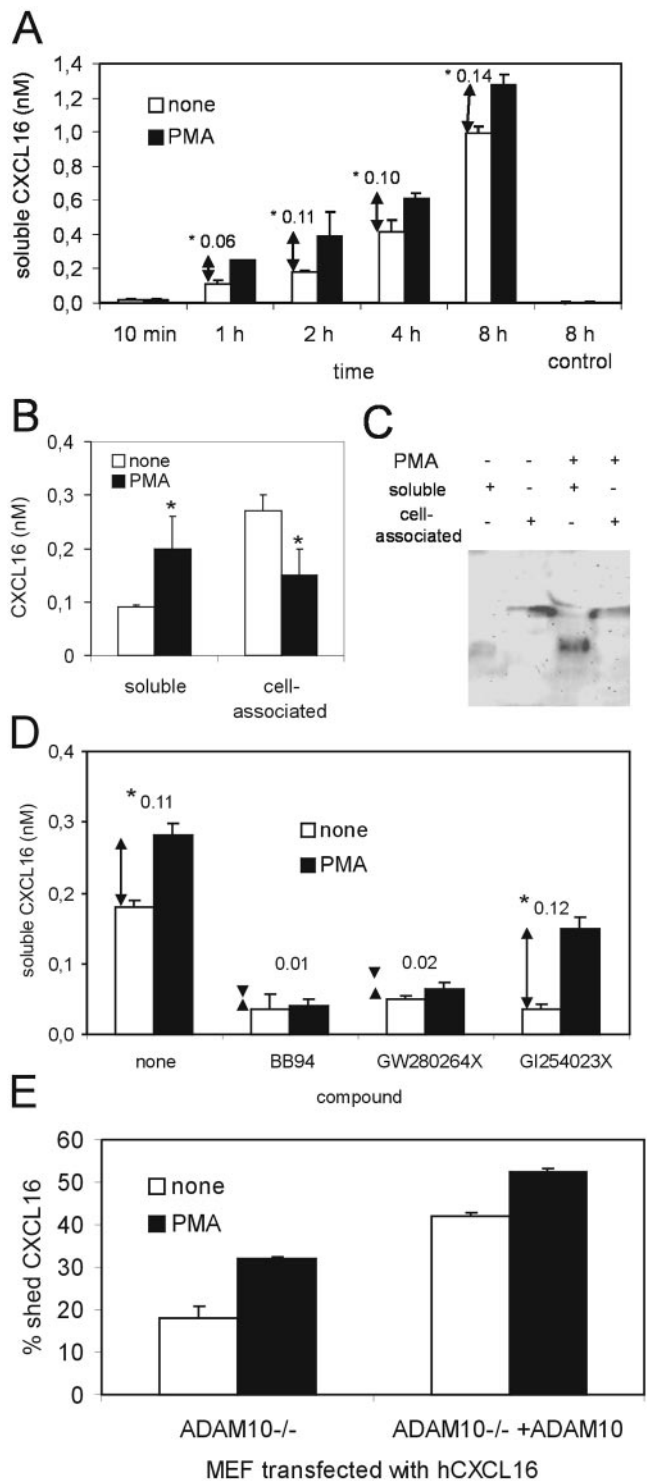


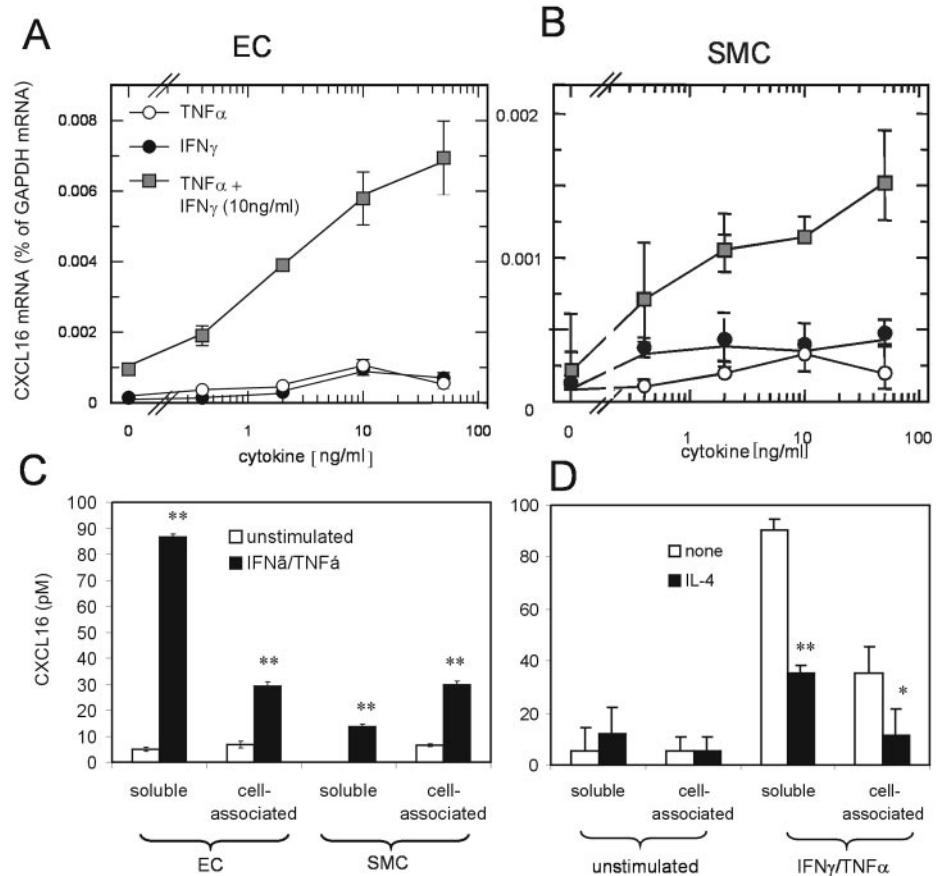
FIGURE 4. Effect of PMA on CXCL16 shedding. *A*, COS-7 cells were transiently transfected with human CXCL16 and subsequently incubated in serum-free medium in the absence or presence of PMA (200 ng/ml) for various periods of time and shed CXCL16 was quantified by ELISA. As a control, mock-transfected COS-7 cells were stimulated with PMA for 8 h which did not lead to the expression of endogenous CXCL16. In *A* and *D*, the increase of soluble CXCL16 in response to PMA is indicated by arrows and given as concentration value in nanomoles per liter. *B*, CXCL16-expressing COS-7 cells were stimulated with PMA for 2 h or left nonstimulated. Subsequently, cell-associated CXCL16 in the cell lysates and released CXCL16 in the conditioned media (both 0.75 ml per dish) were quantified by ELISA. *C*, Cell-associated and released CXCL16 from CXCL16-expressing COS-7 cells that were left unstimulated or treated with PMA for 2 h were analyzed by Western blotting with an anti-CXCL16 Ab. *D*,

classical chemoattractant, the transmembrane molecule promotes binding and adhesion of lymphocytes, oxidized LDL particles, or bacteria (5, 6, 9, 27). It is therefore of immediate interest to understand how the two forms are generated and whether their expression is differentially regulated. In this report, we present in vivo and in vitro evidence for the expression of CXCL16 in vascular cells. We demonstrate that IFN- γ and TNF- α synergize to induce CXCL16 expression in vascular cells and that these cells spontaneously release considerable amounts of CXCL16. We provide evidence that soluble CXCL16 is generated by cleavage of the transmembrane molecule via metalloproteinase activity. By transfection of exogenous CXCL16 in different cell lines as well as by up-regulation of endogenous CXCL16 in murine fibroblasts with IFN- γ and TNF- α , we show that this cleavage regulates the cell surface expression of the transmembrane molecule and that the majority of the cleavage is mediated by the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. This report demonstrates that CXCL16 is a novel substrate for ADAM10-mediated ectodomain shedding and therefore implies a role of ADAM10 in the regulation of this chemokine's biological activity.

In the present study, we provide the first piece of direct evidence that the soluble 32-kDa variant of murine CXCL16 is generated from a 48-kDa transmembrane molecule by a metalloproteinase-mediated cleavage event. We demonstrate that the release of soluble 32-kDa CXCL16 is markedly reduced in the presence of metalloproteinase inhibitors leading to profound accumulation of the 48-kDa molecule in the cell lysates. The size of released murine CXCL16 estimated in our study matches quite well with the data reported by Matloubian et al. (5) (34 kDa), considering that the latter authors fused the murine CXCL16 with an additional N-terminal flag tag. The molecular mass is almost twice the size of the predicted protein backbone (19 kDa) which is due to heavy glycosylation of the soluble molecule as demonstrated by Wilbanks et al. (9). Notably, besides a 48-kDa protein we have found additional CXCL16 molecules of reduced molecular mass in the cell lysates. Similar observations were made by Matloubian et al. (5) and Shimaoka et al. (6), reporting the identification of cell-associated CXCL16 variants of 34 kDa (murine CXCL16) or 30 and 27 kDa (human CXCL16), respectively, which could represent the complete CXCL16 protein, but bearing different glycosylation. Different cell types and protocols used for expression could account for such a differential glycosylation. In fact, tissue-specific variations in the molecular size of CXCL16 proteins expressed in spleen and lymph node have been observed (5). However, the existence of a CXCL16-specific 16 kDa-protein band in the cell lysates, as seen in our present study, cannot be explained by the differential glycosylation. This band could rather represent the

CXCL16 expressing COS-7 cells were treated with the metalloproteinase inhibitors batimastat (BB94), GW280264X, and GI254023X and subsequently stimulated with PMA for 2 h or left nonstimulated. Released CXCL16 in the conditioned media was quantified by ELISA. ADAM10^{+/+}, ADAM10^{-/-}, and ADAM10-retransfected ADAM10^{-/-} MEFs were transiently transfected with human CXCL16 and subsequently incubated in serum-free medium in the presence or absence of PMA (200 ng/ml) for 4 h. To normalize variations in the transfection efficiency for each single transfection of the different MEF cell lines, CXCL16 shedding was expressed as the percentage of soluble CXCL16 in the media in relation to the total CXCL16 including soluble and cell-associated molecules. Data shown in *A*, *B*, *D*, and *E*, represent means and SD of one experiment performed in triplicates. All results were reproduced at least three times. Statistically significant differences in CXCL16 shedding between untreated and PMA-treated cells are indicated by asterisks ($p < 0.05$).

FIGURE 5. Induction of CXCL16 mRNA and protein in vascular cells. Isolated human ECs from umbilical vein (A) and serum-starved human SMCs from aorta (B) were stimulated for 24 h with either increasing concentrations of IFN- γ or TNF- α alone or a combination of 10 ng/ml IFN- γ and increasing concentrations of TNF- α . CXCL16 mRNA expression was quantified by TaqMan RT-PCR and expressed as the percentage of that determined for GAPDH. C, ECs and serum-starved SMCs were stimulated with a combination of IFN- γ and TNF- α (each 10 ng/ml) for 24 h or left unstimulated. CXCL16 protein expression in the conditioned media and cell lysates was determined by the ELISA. Statistically significant differences in CXCL16 protein expression between untreated and cytokine-treated cells are indicated by asterisks ($p < 0.05$). D, ECs were left unstimulated or stimulated with a combination of IFN- γ and TNF- α (both 10 ng/ml) for 24 h in the presence or absence of IL-4 (20 ng/ml). Subsequently, soluble and cell-associated CXCL16 was quantified by ELISA. Statistically significant differences in CXCL16 protein expression induced by IL-4 are indicated by asterisks ($p < 0.05$).



trunk of the cleaved protein residing in the cell membrane. In fact, its molecular mass exactly matches the difference in size between the major forms of soluble and cell-expressed CXCL16 and, moreover, it appears to be N-terminally truncated and C-terminally intact as it was detectable by its N-terminal HA tag but not via its C-terminal chemokine domain. However, compared with the full-size molecule this trunk was represented by only a faint protein band, suggesting that it has been subject to further degradation as it is reported for other substrates of ADAM10 such as the Notch or its ligand Delta1 (28) or the β -amyloid precursor protein (29).

Our findings indicate that ADAM10 mediates the major proportion of CXCL16 shedding under physiological conditions. The role of ADAM10 in CXCL16 cleavage was consistently demonstrated by different experimental approaches, by the use of specific inhibitors, with fibroblasts generated from mice with targeted disruption of the ADAM10 gene, and by retransfection of ADAM10. Inhibition studies were conducted with hydroxamate metalloproteinase inhibitors that had been characterized and validated for the inhibition of ADAM10 and ADAM17 (20). The release of CXCL16 was profoundly blocked by inhibition of ADAM10 and additional inhibition of ADAM17 did not modulate the effect. The ability of the compounds to block CXCL16 cleavage was the same in human ECs, murine fibroblasts, and ECV-304 and COS-7 cells, suggesting that the underlying mechanism is very similar. Nevertheless, our studies do not fully exclude any effects of the inhibitors on CXCL16 cleavage that are unrelated to ADAM10. Strong evidence for the involvement of ADAM10 in the cleavage of CXCL16 was provided by our finding that ADAM10-deficient MEFs display a considerably reduced potential to shed CXCL16 and that the loss in shedding activity was completely rescued upon retransfection of ADAM10. Even more importantly, shedding of endogenous CXCL16 in cyto-

kine-stimulated MEFs was profoundly reduced in the absence of endogenous ADAM10 and completely reconstituted by retransfection of ADAM10 cDNA providing strong evidence that ADAM10 is a physiological sheddase for CXCL16.

ADAM10 has been implicated in a number of shedding events that occur spontaneously in unstimulated cells. ADAM10 was found to cleave the amyloid precursor protein β -amyloid precursor protein (17), the cellular prion protein PrP (23), the Notch ligand Delta1 (28), the IL-6R (24), and the L1 adhesion molecule (30) under normal cell culture conditions. We have recently demonstrated that ADAM10 is also involved in the spontaneous cleavage of CX3CL1 which is so far the only other known transmembrane chemokine besides CXCL16 (20). Notably, in our recent study and in our present work, deletion of ADAM10 in MEFs did not completely abrogate CX3CL1 or CXCL16 shedding. As shown here for CXCL16, the residual shedding in ADAM10^{-/-} MEFs was sensitive to broad spectrum inhibitors of metalloproteinases but not to the preferential ADAM10 inhibitor, although all compounds were potent inhibitors of the constitutive cleavage in ADAM10^{+/+} MEFs, COS-7 cells, and human ECs. This suggests that in the ADAM10-deficient MEFs, other as yet undefined metalloproteinases could partially compensate for the cleavage of CXCL16 and possibly also for that of other shedding substrates such as CX3CL1. For CX3CL1, others have demonstrated that PMA enhances the shedding and that this up-regulation is mediated to a large extent by the activity of ADAM17 (21, 22). Our observation that the combined ADAM17/ADAM10 inhibitor was capable of blocking the PMA-induced shedding in COS-7 cells may suggest that ADAM17 is also involved in the PMA-inducible cleavage of CXCL16. However, we did not observe enhanced CXCL16 shedding in PMA-stimulated ECV-304 cells (A. Ludwig, unpublished data) although these cells expressed ADAM17 and exhibited a

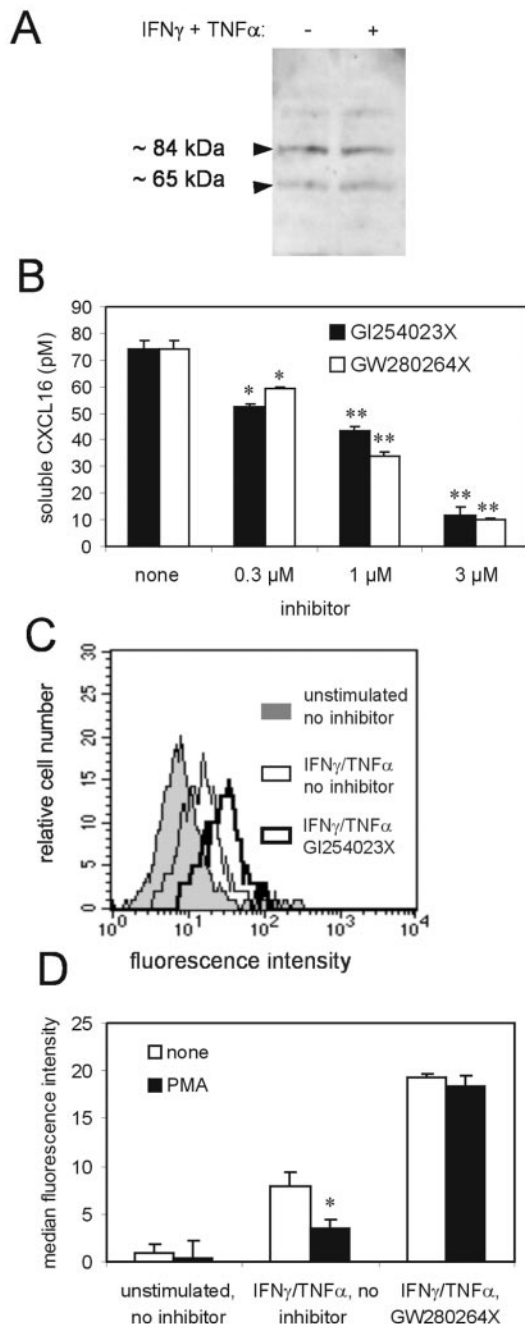


FIGURE 6. CXCL16 shedding by ECs. ECs were costimulated with IFN- γ and TNF- α (both 10 ng/ml) for 24 h or left unstimulated. *A*, SDS cell lysates were subjected to Western blot analysis with a rabbit anti-human ADAM10 Ab. *B*, Cytokine-stimulated ECs were incubated for 4 h in fresh medium in the absence or presence of increasing dosages of the metalloproteinase inhibitors GW280264X and GI254023X. The inhibition of the CXCL16 release by the inhibitors was quantified by ELISA. Statistically significant differences in CXCL16 shedding in the inhibitor-treated vs the untreated cells are indicated by asterisks (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). *C* and *D*, Unstimulated or IFN- γ /TNF- α -stimulated ECs were treated with the metalloproteinase inhibitors GI254023X (*C*) or GW280264X (*D*) and incubated in the presence or absence of PMA for 4 h (*D*). Subsequently, CXCL16 surface expression was analyzed by flow cytometry using the rabbit anti-human CXCL16 Ab. Results are given as histograms (*C*) or calculated as MFI from which unspecific fluorescence (MFI = 7.1 ± 0.5 , determined in parallel by labeling with an IgG control Ab) was subtracted (*D*). Statistically significant differences in CXCL16 shedding in response to PMA are indicated by asterisks ($p < 0.05$). Data in *A*, *B*, and *D* are given as mean and SD of one experiment performed in triplicates. All results shown are representative of three independent experiments.

clearly enhanced shedding activity for CX3CL1 (20). Therefore, despite major similarities in the cleavage mechanism of the two chemokines with respect to the involvement of ADAM10, the background of cell type-specific differences in the PMA-inducible cleavage of CXCL16 and CX3CL1 still remains to be resolved.

Not much is known about the functional role of CXCL16 under inflammatory conditions. To date, CXCL16 protein expression has been consistently demonstrated for APCs only (5, 6, 9, 31). In this study, we provide first evidence that the two proinflammatory cytokines TNF- α and IFN- γ synergistically induce CXCL16 in ECs, SMCs, and fibroblasts. Conversely, IL-4 down-regulates CXCL16 expression in EC. This pattern of induction is similar to that previously described for CX3CL1 in ECs (26) and in SMCs (8) which may indicate that both CX3CL1 and CXCL16 are induced in TH-1-dominated inflammatory responses controlled by master cytokines such as IFN- γ and TNF- α (26). Our data demonstrate that a considerable proportion of all CXCL16 expressed in ECs, SMCs, and fibroblasts is spontaneously released from these cells under normal culture conditions by a metalloproteinase activity. In fibroblasts, the most relevant metalloproteinase for CXCL16 shedding was identified as ADAM10. In ECs, ADAM10 could fulfil a similar function as suggested by the similar inhibition profile of the preferential ADAM10 inhibitor on CXCL16 shedding in fibroblasts and ECs. The shedding of CXCL16 is likely to have an impact on the chemokine's biological functions in the vascular tissue. During an inflammatory reaction in the vasculature the following situation can be envisaged: upon induction of CXCL16, the protein will first appear locally on the surface of vascular cells stimulated by inflammatory insult. Transmembrane CXCL16 would promote various adhesive events that have been described by a number of in vitro experiments such as binding of CXCR6-expressing leukocytes (13), scavenging ox-LDL (6) and mediating phagocytosis of bacteria (27). For the recruitment of leukocytes, CXCL16 expression would first be relevant in ECs where the molecule could capture CXCR6-expressing leukocytes in the blood flow. Due to continuous shedding of the chemokine, CXCL16 would not accumulate on the endothelium over time. Moreover, shedding of the molecule could facilitate detachment of cells bound via CXCL16, leading to more transient interaction similar to that we have previously reported for CX3CL1 (20). However, besides the endothelium, the underlying tissue consisting of SMCs, fibroblasts, and possibly macrophages would also express CXCL16 under inflammatory conditions as suggested by our present data and by previous work of others (6, 31). Underneath the endothelium, continuous shedding of the chemokine as well as enhanced shedding via yet undefined stimuli that act similar to PMA would lead to the accumulation of the soluble chemokine and the generation of a chemotactic gradient. Such a gradient could further direct the transmigrating leukocytes from the endothelium into the blood vessel wall and the underlying tissue. Thus, during leukocyte recruitment CXCL16 may initially function as an adhesion molecule on the endothelium and in a later phase rather as a T cell chemoattractant in the vascular tissue due to its shedding by ADAM10. Further studies are required to prove the importance of the role of CXCL16 in the vessel wall in health and disease.

Acknowledgments

We thank Ricky Joshi and Hilary Siddall (Department of Atherosclerosis, GlaxoSmithKline, Stevenage, U.K.) for kind support in the culture and stimulation of ECs. We acknowledge Dr. Rolf Postina and Prof. Falk Fahrholz (Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany) for providing bovine ADAM10 cDNA. We thank Dagmar Freier for expert technical assistance.

References

- Rossi, D., and A. Zlotnik. 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18:217.
- Middleton, J., A. M. Patterson, L. Gardner, C. Schmutz, and B. A. Ashton. 2002. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 100:3853.
- Bazan, J. F., K. B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D. R. Greaves, A. Zlotnik, and T. J. Schall. 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385:640.
- Pan, Y., C. Lloyd, H. Zhou, S. Dolich, J. Deeds, J. A. Gonzalo, J. Vath, M. Gosselin, J. Ma, B. Dussault, et al. 1997. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 387:611.
- Matloubian, M., A. David, S. Engel, J. E. Ryan, and J. G. Cyster. 2000. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat. Immunol.* 1:298.
- Shimaoka, T., N. Kume, M. Minami, K. Hayashida, H. Kataoka, T. Kita, and S. Yonehara. 2000. Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *J. Biol. Chem.* 275:40663.
- Chapman, G. A., K. Moores, D. Harrison, C. A. Campbell, B. R. Stewart, and P. J. Strijbos. 2000. Fractalkine cleavage from neuronal membranes represents an acute event in the inflammatory response to excitotoxic brain damage. *J. Neurosci.* 20:RC87.
- Ludwig, A., T. Berkhout, K. Moores, P. Groot, and G. Chapman. 2002. Fractalkine is expressed by smooth muscle cells in response to IFN- γ and TNF- α and is modulated by metalloproteinase activity. *J. Immunol.* 168:604.
- Wilbanks, A., S. C. Zondlo, K. Murphy, S. Mak, D. Soler, P. Langdon, D. P. Andrew, L. Wu, and M. Briskin. 2001. Expression cloning of the strl33/bonzo/tymstr ligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines. *J. Immunol.* 166:5145.
- Imai, T., K. Hieshima, C. Haskell, M. Baba, M. Nagira, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, H. Nomiyama, T. J. Schall, and O. Yoshie. 1997. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 91:521.
- Fong, A. M., L. A. Robinson, D. A. Steeber, T. F. Tedder, O. Yoshie, T. Imai, and D. D. Patel. 1998. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J. Exp. Med.* 188:1413.
- Ancuta, P., R. Rao, A. Moses, A. Mehle, S. K. Shaw, F. W. Luscinskas, and D. Gabuzda. 2003. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16⁺ monocytes. *J. Exp. Med.* 197:1701.
- Nakayama, T., K. Hieshima, D. Izawa, Y. Tatsumi, A. Kanamaru, and O. Yoshie. 2003. Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues. *J. Immunol.* 170:1136.
- Killar, L., J. White, R. Black, and J. Peschon. 1999. Adamalysins: a family of metzincins including TNF- α converting enzyme (TACE). *Ann. NY Acad. Sci.* 878:442.
- Schlondorff, J., and C. P. Blobel. 1999. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J. Cell Sci.* 112:3603.
- Peschon, J. J., J. L. Slack, P. Reddy, K. L. Stocking, S. W. Sunnarborg, D. C. Lee, W. E. Russell, B. J. Castner, R. S. Johnson, J. N. Fitzner, et al. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282:1281.
- Hartmann, D., B. De Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lubke, I. A. Lena, K. von Figura, and P. Saftig. 2002. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for α -secretase activity in fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* 11:2615.
- Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, et al. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 385:729.
- Althoff, K., P. Reddy, N. Voltz, S. Rose-John, and J. Mullberg. 2000. Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor α : contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur. J. Biochem.* 267:2624.
- Hundhausen, C., D. Misztela, T. A. Berkhout, N. Broadway, P. Saftig, K. Reiss, D. Hartmann, F. Fahrenholz, R. Postina, V. Matthews, et al. 2003. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 102:1186.
- Garton, K. J., P. J. Gough, C. P. Blobel, G. Murphy, D. R. Greaves, P. J. Dempsey, and E. W. Raines. 2001. Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J. Biol. Chem.* 276:37993.
- Tsou, C. L., C. A. Haskell, and I. F. Charo. 2001. Tumor necrosis factor- α -converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine. *J. Biol. Chem.* 276:44622.
- Vincent, B., E. Paitel, P. Saftig, Y. Frobert, D. Hartmann, B. De Strooper, J. Grassi, E. Lopez-Perez, and F. Checler. 2001. The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J. Biol. Chem.* 276:37743.
- Matthews, V., B. Schuster, S. Schutze, I. Bussmeyer, A. Ludwig, C. Hundhausen, T. Sadowski, P. Saftig, D. Hartmann, K. J. Kallen, and S. Rose-John. 2003. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J. Biol. Chem.* 278:38829.
- Mullberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Gunther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P. C. Heinrich, and S. Rose-John. 1993. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur. J. Immunol.* 23:473.
- Fraticelli, P., M. Sironi, G. Bianchi, D. D'Ambrosio, C. Albanesi, A. Stoppacciaro, M. Chieppa, P. Allavena, L. Ruco, G. Girolomoni, et al. 2001. Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. *J. Clin. Invest.* 107:1173.
- Shimaoka, T., T. Nakayama, N. Kume, S. Takahashi, J. Yamaguchi, M. Minami, K. Hayashida, T. Kita, J. Ohsumi, O. Yoshie, and S. Yonehara. 2003. Cutting edge: SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates bacterial phagocytosis by APCs through its chemokine domain. *J. Immunol.* 171:1647.
- Six, E., D. Ndiaye, Y. Laabi, C. Brou, N. Gupta-Rossi, A. Israel, and F. Logeat. 2003. The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and γ -secretase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:7638.
- Struhl, G., and A. Adachi. 2000. Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol. Cell.* 6:625.
- Mechtersheimer, S., P. Gutwein, N. Agmon-Levin, A. Stoeck, M. Oleszewski, S. Riedle, M. Fogel, V. Lemmon, and P. Altevogt. 2001. Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J. Cell Biol.* 155:661.
- Minami, M., N. Kume, T. Shimaoka, H. Kataoka, K. Hayashida, Y. Akiyama, I. Nagata, K. Ando, M. Nobuyoshi, M. Hanyuu, et al. 2001. Expression of SR-PSOX, a novel cell-surface scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized LDL in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:1796.

Enhanced expression and shedding of the transmembrane chemokine CXCL16 by reactive astrocytes and glioma cells

Andreas Ludwig,* Alexander Schulte,* Cathrin Schnack,† Christian Hundhausen,* Karina Reiss,* Neil Brodway,‡ Janka Held-Feindt§ and Rolf Mentlein†

*Institute of Biochemistry, Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany

†Department of Anatomy, Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany

‡Department of Gene Expression and Protein Chemistry, GlaxoSmithKline, Stevenage, United Kingdom

§Clinic of Neurosurgery, Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany

Abstract

The transmembrane chemokine CXCL16 is expressed by dendritic and vascular cells and mediates chemotaxis and adhesion of activated T cells via the chemokine receptor CXCR6/Bonzo. Here we describe the expression and shedding of this chemokine by glioma cells *in situ* and *in vitro*. By quantitative RT-PCR and immunohistochemistry, we show that CXCL16 is highly expressed in human gliomas, while expression in normal brain is low and mainly restricted to brain vascular endothelial cells. In cultivated human glioma cells as well as in activated mouse astroglial cells, CXCL16 mRNA and protein is constitutively expressed and further up-regulated by tumour necrosis factor α (TNF α) and interferon- γ (IFN γ). CXCL16 is continuously released from glial cells by proteolytic cleavage which is rapidly enhanced by stimulation with phorbol-12-myristate-13-acetate

(PMA). As shown by inhibitor studies, two distinct members of the disintegrin-like metalloproteinase family ADAM10 and 17 are involved in the constitutive and PMA-induced shedding of glial CXCL16. In addition to the chemokine, its receptor CXCR6 could be detected by quantitative RT-PCR in human glioma tissue, cultivated murine astrocytes and at a lower level in microglial cells. Functionally, recombinant soluble CXCL16 enhanced proliferation of CXCR6-positive murine astroglial and microglial cells. Thus, the transmembrane chemokine CXCL16 is expressed in the brain by malignant and inflamed astroglial cells, shed to a soluble form and targets not only activated T cells but also glial cells themselves.

Keywords: astrocytes, chemokines, cytokines, glioma, metalloproteinases, shedding.

J. Neurochem. (2005) 10.1111/j.1471-4159.2005.03123.x

Chemokines are a family of peptide mediators that play an essential role in cellular migration and intercellular communication. Although they were originally discovered as inducible cytokines facilitating the recruitment of specific leukocyte subsets, it is now clear that they serve not only in inflammatory reactions, but are also mandatory in various organs in the development, tissue homeostasis and pathological responses like angiogenesis or tumour progression. In the brain, chemokines are produced by astroglial, microglial, neuronal, meningeal and endothelial cells (Dorf *et al.* 2000; Biber 2002; Campbell and Asensio 2002; Ambrosini and Aloisi 2004). Some of the chemokines are constitutively expressed such as SDF-1/CXCL12 and fractalkine/CX3CL1 while others, e.g. IL8/CXCL8 and MCP1/CCL2, are inducible upon cell activation. Within the CNS, astroglial and microglial cells as well as neuronal cells and microvascular

Received October 29, 2004; revised manuscript received January 31, 2005; accepted January 31, 2005.

Address correspondence and reprint requests to Prof Dr Rolf Mentlein, Department of Anatomy, University of Kiel, Olshausenstraße 40, 24098 Kiel, Germany. E-mail: rment@anat.uni-kiel.de

Abbreviations used: ADAM, a disintegrin and metalloproteinase domain; APP, amyloid precursor protein; BSA, bovine serum albumin; CX3CL1, CX3C-chemokine ligand 1, CX3CR1 CX3C-chemokine receptor 1; CXCL16, CXC-chemokine ligand 16; CXCR6, CXC-chemokine receptor 6; EGF, epidermal growth factor; FCS, foetal calf serum; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GFP, green fluorescent protein; HA, hemagglutinin; H-IL6, IL6 coupled to its receptor (hyper IL6); HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; IFN γ , interferon- γ ; IL1, interleukin 1; IL6R, interleukin 6 receptor; LPS, lipopolysaccharide; MEF, mouse embryonic fibroblasts; PBS, phosphate buffered saline, pH 7.4; PMA, 4- β -phorbol 12-myristate 13-acetate; TACE, TNF α -converting enzyme; TGF β , transforming growth factor β ; TNF α , tumour necrosis factor α ; WHO, world health organization.

endothelial cells express distinct patterns of chemokine receptors. Besides their role in cell migration, chemokine receptors may also signal cell proliferation, cytokine production, apoptosis or survival of brain cells. Functionally, chemokines are implicated in neuronal patterning (Reiss *et al.* 2002), neuron-glia and glia-glia interactions, and under pathological conditions in infections, chronic inflammatory diseases (e.g. multiple sclerosis), neurodegenerative diseases (e.g. Alzheimer's disease), ischemia and in brain tumours.

Most chemokines are synthesized as small soluble peptides but there are two exceptional chemokines that are expressed as transmembrane multidomain molecules: the CX3CL1 (also termed fractalkine) (Bazan *et al.* 1997) and the CXCL16. The CXCL16 was discovered as a ligand for the CXC-chemokine receptor CXCR6 (Matloubian *et al.* 2000), and was independently described as scavenger receptor for oxidized LDL and therefore also termed SR-PSOX (Shimaoka *et al.* 2000). CXCL16 is expressed on the cell membrane as a multi domain molecule consisting of a chemokine domain followed by a glycosylated mucin-like stalk and a single transmembrane helix. Surface-expressed CXCL16 functions as an adhesion molecule by binding to its receptor CXCR6 expressed on activated T-cells and bone marrow plasma cells (Nakayama *et al.* 2003; Shimaoka *et al.* 2004). However, CXCL16 also exists as soluble molecule, inducing chemotaxis of CXCR6-expressing lymphocytes (Matloubian *et al.* 2000; Wilbanks *et al.* 2001; Nakayama *et al.* 2003). Soluble CXCL16 is generated by cleavage (shedding) from the cell membrane, either constitutively or enhanced by cell stimulation with phorbol esters (Abel *et al.* 2004). In transfected CO5-7 cells the most relevant protease for the constitutive CXCL16 shedding is the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. This was consistently demonstrated by two independent studies employing either ADAM10-deficient cell lines derived from murine embryos carrying a lethal disruption of the ADAM10 gene or by down-regulation of endogenous ADAM10 via the RNA interference technique (Abel *et al.* 2004; Gough *et al.* 2004).

To date CXCL16 protein expression has been reported for antigen presenting cells and vascular cells only (Matloubian *et al.* 2000; Wilbanks *et al.* 2001; Abel *et al.* 2004). In the present study we examined whether the transmembrane chemokine CXCL16 and its receptor CXCR6 are expressed in the brain under normal or pathological conditions. We demonstrate that CXCL16 is expressed by endothelial cells, astrocytes and glioma cells *in situ*. Quantitative analysis of CXCL16 mRNA expression as well as protein biochemistry revealed a constitutive expression of CXCL16 by cultured glioma cells which can be further up-regulated by proinflammatory cytokines. By the use of specific metalloproteinase inhibitors we demonstrate that glioma cells constitutively release soluble CXCL16 via the activity of two distinct metalloproteinases, most likely ADAM10 and ADAM17 (= TACE, TNF α -converting enzyme). Finally, we

provide first evidence that glial cells themselves may represent targets of increased CXCL16 within brain tumours.

Materials and methods

Cytokines, antibodies and inhibitors

Recombinant human CXCL16 extracellular domain and chemokine domain, recombinant human interferon- γ (IFN γ), recombinant human tumour necrosis factor- α (TNF α) as well as unconjugated goat antihuman CXCL16 antibody were obtained from R & D Systems (Wiesbaden, Germany). Recombinant human transforming growth factor- β 2 (TGF β 2) and human epidermal growth factor (EGF) were from Preprotech (Rocky Hill, NJ, USA), synthetic substance P (SP) from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Unconjugated and biotinylated rabbit antihuman CXCL16 antibody and goat anti-murine CXCL16 antibody were from PeprTech EC (London, UK). The rabbit antiserum B 42.1 against murine/human ADAM10 was kindly provided by Dieter Hartmann (Leuven and Flanders Interuniversity, BEL) and characterized previously (Hartmann *et al.* 2002). The purified rabbit antibody against human ADAM17 (= TACE) was from Chemicon (Temecula, CA, USA), and the rabbit antibody to HA (sc-805) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

The metalloproteinase inhibitors GW280264X ((2R,3S)-3-(Formyl-hydroxyamino)-2-2-methyl-1-propyl hexanoic acid [(1S)-5-benzyloxycarbonylamino-1-(1,3-thiazol-2-ylcarbonyl)-1-pentyl] amide) and GI254023X ((2R,3S)-3-(Formyl-hydroxyamino)-2-(3-phenyl-1-propyl) butanoic acid[(1S)-2,2-dimethyl-1-methyl-carbamoyl-1-propyl] amide) were synthesized as described in US Patents US 6172 064, US 6191 150 and US 6329 400. Batimastat (BB94) was synthesized at GlaxoSmithKline (Chapman *et al.* 2000). The compounds were assayed for inhibition of recombinant human ADAM17 and ADAM10 ectodomains as described (Hundhausen *et al.* 2003). CXCL16 cDNA was inserted into the expression vector pcDNA3.1 (Invitrogen) as described previously (Abel *et al.* 2004).

Tissue samples, cell culture and transfection

Human tissue and astrocytoma samples were from necessary surgical resections in accordance with the ethical standards and with the permission of the responsible committee of the University of Kiel and with the Helsinki Declaration of 1975. Astrocytomas were graded according to classification of the world health organization (WHO) classification directly after surgery into grade I ($n = 2$) grade II ($n = 3$) grade III ($n = 1$) and grade IV/glioma ($n = 6$) (Kleihues and Cavenee 2000). Control tissues ($n = 4$) were taken from surgical samples of excised haemorrhagic brain. Mouse tissues were from C57B6 J inbred mice (Charles River Laboratories, Les Oncins, France). Human glioma cell lines were obtained from the 'Deutsches Krebsforschungszentrum' (Heidelberg, Germany) and cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) plus 10% foetal calf serum, FCS (Mentlein and Held-Feindt 2002).

Human glioma cells were derived from surgical samples of human glioma and checked for purity by immunostaining as described (Mentlein and Held-Feindt 2002). Human endothelial cells (HUVECs) were prepared from human umbilical vein, activated T-cells were generated from human peripheral blood mononuclear

cells as described (Ludwig *et al.* 2002b), human fibroblasts and the monocytic cell line THP-1 were cultivated as described (Pufe *et al.* 2003). Primary murine astroglia and neuronal cells were prepared and analyzed for purity with cell-type specific antibodies as described (Lucius and Mentlein 1991; Mentlein *et al.* 1998); b.End3 mouse endothelioma cells and Neuro 2a mouse brain neuronal tumour cells were from the European Collection of Cell Cultures ECACC, Salisbury, UK; immortalized BV-2 murine microglial cells were kindly provided by Elisabetta Blasi, University of Perugia, Italy; SV-40 immortalized murine astroglial cells were obtained from Volkmar Gieselmann (University of Bonn, Germany). Primary cells were at least 95% immunocytochemically pure except neurons (about 50%). CO5-7 cells were cultured and transfected using the DEAE/dextran method as previously described (Hundhausen *et al.* 2003).

TaqMan RT-PCR analysis

RNA was isolated from cultured cells using Trizol reagent (Gibco BRL). Total RNA 1 µg was treated with DNaseI (Promega) and reverse transcription to cDNA was carried out using Revert Aid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase EXP 0451 (Fermentas, St Leon-Rot, Germany) according to the manufacturer's instructions. For each sample, a control without reverse transcriptase was run parallel to allow assessment of genomic DNA contamination. Each cDNA sample was analyzed for expression of CXCL16, CXCR6, ADAM10 or ADAM17 as well as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) by real-time quantitative RT-PCR using the fluorescent TaqMan 5'-nuclease assay as previously described (Ludwig *et al.* 2002a). The TaqMan real time-PCR was performed using 2x TaqMan Master Mix (Applied Biosystems) and 20x assay-on-demand TaqMan primers and probes (Applied Biosystems) in a total volume of 20 µL. The mRNA level for the gene of interest was quantified as the percentage of that determined for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). For this purpose CT values for the gene of interest and GAPDH were determined. From these delta CT values were calculated as $CT_{GAPDH} - CT_{\text{gene of interest}}$ and results were then expressed as $2^{\text{delta CT}} * 100$. The TaqMan assays had the following identification numbers and reporter sequences, respectively:

hCXCL16, Hs00222859_m1, TCTCAAAGAATGTGGACATGCTTAC;
 mCXCL16, Mm00469712_m1, AGCGCAAAGAGTGTGGAACTGGTCA;
 hCXCR6, Hs00174843_m1, AGCATCTCTGCTGGTGTTCATCAGA;
 mCXCR6, Mm00472858_m1, TTCTCTTCTGATGCCATGATGATG;
 hADAM 10, Hs00153853_m1, ACAGTGCAGTCCAAGTCAAGGTCCT;
 hADAM 17, Hs00234224_m1, TGTCAGTGCAGTGACAGGAAACAGT;
 hGAPDH, Hs99999905_m1, GGGCGCCTGGTCACCAGGGCTGCTT;
 mGAPDH, Mm99999915_g1, TGAACGGATTGGCCGTATTGGCG.

Amplification and sequencing of CXCR6

Murine CXCR6 was amplified from microglial cDNA using primers 5'-GAATTCACCATGGATGATGGGCATCAAGAG-3'

and 5'-CCGCTCGAGCGGCTACAATTGGAACATACTGGTGGT-3' and subsequently ligated into the expression vector pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) using EcoRI and XhoI (Fermentas). The sequence of the insert was then confirmed by sequencing (MWG Biotech, Munich, Germany).

CXCL16 release assays

CXCL16-expressing cells were grown to 70–90% confluence for 24 h before stimulation. The cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and 0.75 mL FCS-free medium with or without metalloproteinase inhibitors was added. After 10 min, the cells were stimulated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, Sigma; 200 ng/mL) for various periods of time. The conditioned media were harvested, cleared by centrifugation and a protease inhibitor cocktail (Complete, Roche) was added according to the instructions of the manufacturer. The presence of released CXCL16 in the conditioned media was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, see below). The expression of transmembrane CXCL16 was controlled by western blot analysis of the cell lysates (see below).

CXCL16 specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The ELISA for human CXCL16 was carried out as described in detail elsewhere (Abel *et al.* 2004). In brief, goat anti-human CXCL16 (2 mg/mL) was coated to the plate, followed by blocking with 0.05% Tween in phosphate-buffered saline (PBS-T) containing 2% bovine serum albumin (BSA) for two hours. The samples and a standard, prepared as nine serial 1 : 2 dilutions of 1.25 nM recombinant human CXCL16 in PBS-T/1% BSA, were added for 2 h, followed by 2 h incubation with 200 ng/mL biotinylated rabbit anti human CXCL16 in PBS-T/1% BSA. After 1 h incubation with 100 mU/mL streptavidin-peroxidase (POD) conjugate (Roche) in PBS-T/1% BSA, the bound enzymatic activity was quantified using chromogenic POD substrate (BM blue, Roche). The specificity of the ELISA was demonstrated by its positive reaction with lysates and conditioned media of CXCL16-transfected COS-7 cells or ECV-304 cells as described previously (Abel *et al.* 2004). The detection limit of the ELISA was 10 pM of either the extracellular domains or only the chemokine domain of CXCL16. The ELISA specific for murine CXCL16 was purchased from R & D Systems and performed following the manufacturer's instructions. The detection limit for the murine CXCL16 chemokine domain was 12 pM. The ELISA reacted with lysates and supernatants of COS-7 cells transfected with murine CXCL16 but not with that of cells transfected with human CXCL16 or empty vector (Abel *et al.* 2004).

Western blot analysis of CXCL16, ADAM10 and ADAM17

Western blot analysis of cell-expressed CXCL16, ADAM10 and ADAM17 was performed as described previously (Hundhausen *et al.* 2003). In brief, the cells were washed with PBS and removed from the vessel by scraping in ice-cold PBS containing 0.1% TritonX-100 and a protease inhibitor cocktail (Complete, Roche). After 30 min of incubation on ice under agitation, the lysates were centrifuged at 12 000 × g for 10 min. The presence of equal amounts of protein in the lysates of differently treated cells was controlled by a bicinchoninic acid (BCA)-based protein assay (Pierce). For western blot analysis of ADAM10 and

ADAM17, cells were either treated as described above or directly lysed in reducing SDS-sample buffer (Hundhausen *et al.* 2003). The samples were then subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions using 10% or 7.5% Tris-glycine gels. Proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Hybond-P, Amersham) that were probed with dilutions of rabbit anti-HA-tag (0.4 µg/mL), rabbit anti-CXCL16 (0.2 µg/mL), rabbit antiserum against ADAM10 (1 : 10 000) or rabbit antiserum against ADAM17 (1 : 1000). Bound Ig was detected with either goat anti rabbit Ig (Pierce, coupled with horseradish-peroxidase, diluted 1 : 10 000) and subsequent addition of enhanced chemiluminescence substrate (ECLplus, Amersham). Signals were recorded using a luminescent image analyzer (Fujifilm Image reader, LAS1000, Tokyo, Japan).

Immunohistochemistry

Frozen sections of human *glioblastoma multiforme* brain tumours or acetone-fixed cells (ice-cold acetone for 10 min) were used (Mentlein and Held-Feindt 2002). After rinsing with PBS, non-specific binding sites were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS (30 min) and incubated with 0.3% H₂O₂ for 5 min to quench endogenous peroxidase activity. Sections were then incubated with rabbit anti-CXCL16 antibody in PBS (1 µg/mL) overnight. After threefold washing, bound antibody was detected by the use of biotinylated secondary antibodies followed by avidin-peroxidase conjugates and chromogenic reagents (both from Immunotec Beckmann-Coulter, Marseille, France) following the instructions of the manufacturer. Nuclei were counterstained with hemalum, sections were cleared and mounted, and photographs were taken with a Zeiss Axiophot microscope.

Proliferation assays

Proliferation assays were performed with subconfluent immortalized murine astroglial and microglial cells which had been pre-cultivated for 2 days in medium with 10% FCS. Subsequently, cells were washed and then incubated with medium containing 0.5% FCS with or without stimulators added. After 24 h, DNA was measured fluorimetrically using the CyQuant-method (Mentlein *et al.* 2001) and proliferation was expressed as percentage of the non-stimulated control. Experiments were performed with 5 individual dishes for each stimulus. During 24 h of cell culture with medium containing 0.5% FCS, DNA content and cell number increased to about 160%.

Results

CXCL16 is expressed by reactive astrocytes and glioma cells

To address the potential role of CXCL16 in the brain, we first examined its occurrence in tissue sections of human brain and cultivated brain cells by immunohistochemistry and quantitative RT-PCR experiments. In human brain sections taken during surgery of haemorrhage, CXCL16 immunoreactivity was localized on endothelial cells of blood vessels and on few perivascular cells with the morphology of astrocytes (Fig. 1a). In human glioma sections, besides endothelial cells also glioma cells were highly immunoreactive (Fig. 1b). These findings *in situ* were corroborated by immunocytochemistry of cultured human glioma cells (Fig. 1c; U343 glioma cell line), which proved to be

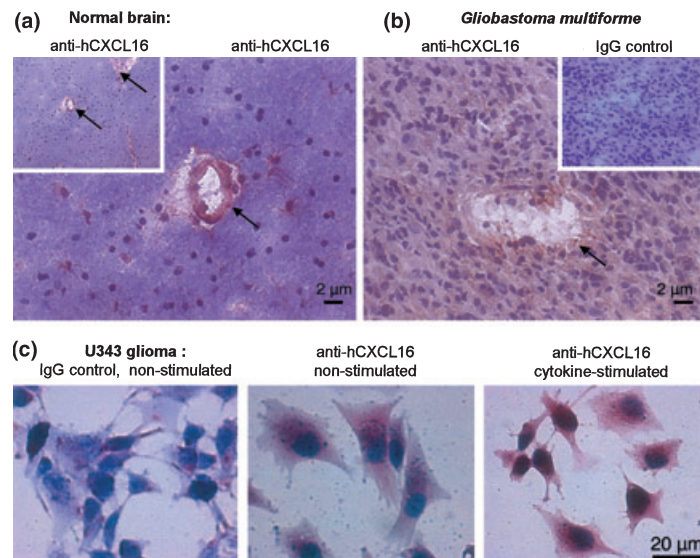


Fig. 1 Immunohistochemistry of CXCL16 in human brain (a) and glioma (b) *in situ* and cultured glioma cells (c) *in vitro*. Frozen tissue sections of human normal brain (a) and human *glioblastoma multiforme* tumours (b) were stained with a rabbit antibody against human CXCL16 or an isotype control (insert in b). Arrows indicate blood vessels in the overview (insert in a) and in the magnifications.

(c) Cultured U343 glioma cells were left untreated or co-stimulated with IFN γ and TNF α (each 10 ng/mL) for 24 h. Subsequently, cells were fixed with acetone and incubated with the anti CXCL16 antibody or a rabbit IgG isotype control. After chromogenic detection of the bound antibody (brown), nuclei were counterstained with hemalum (blue).

immunopositive with the anti-CXCL16 antibody but not with the isotype control.

CXCL16 mRNA is up-regulated in surgical glioma samples, in cultured glioma cell lines and isolated murine astrocytes

Using real-time RT-PCR we next determined the expression level of CXCL16 mRNA in samples of human healthy brain and astrocytomas of different WHO grades (Kleihues and Cavenee 2000). The average amount of CXCL16 mRNA in homogenates of normal human brain was very low, but more than 200-fold higher in the glioma tissues (Fig. 2a). No significant differences were found among samples from tumours of different WHO grades.

In accordance with their positive antibody staining for CXCL16, cultured glioma cells (U343 and U118 glioma cell lines) were found to express considerable amounts of CXCL16 mRNA (Fig. 2b). By contrast, human endothelial cells showed a lower expression, and almost no signal was obtained for the human T cell line Jurkat that was used as a negative control.

Using different types of murine cell lines and cultured cells prepared from murine brain, we could confirm that CXCL16 mRNA is highly expressed by primary and immortalized astroglial cells. We also observed a high expression of the chemokine in cultured microglia. Much lower expression was observed in immortalized BV2 microglial cells, mouse brain endothelioma cells and mouse fibroblasts. Neuro 2a cells completely lacked CXCL16 mRNA, while preparations of primary neurons turned out to be CXCL16 positive, most probably due to contaminations with astrocytes. CXCL16 expression in homogenates of healthy brain from adult mice and E18 embryos was very low but higher in postnatal P2 brain in which astroglial proliferation is known to occur (Fig. 2c).

Glial CXCL16 expression is further enhanced by interferon- γ and tumour necrosis factor- α

As the expression of many chemokines is regulated on the transcriptional level, we next examined whether proinflammatory or proliferative stimuli would further up-regulate the expression of CXCL16. In first experiments we tested the two proinflammatory cytokines IFN γ and TNF α that have been found to increase CXCL16 mRNA in endothelial cells (Abel *et al.* 2004). In human glioma cells both cytokines effectively enhanced the expression of CXCL16 mRNA (Fig. 3a). The expression level was even slightly higher when both cytokines were applied simultaneously. Up-regulation of CXCL16 was also seen with murine SV40 astrocytes but not with murine BV2 microglial cells: In astroglial cells the expression of CXCL16 mRNA was more than 20-fold increased upon activation of type 1 TNF receptors or IL-1 receptors using human 10 μ g/mL of TNF α or IL-1 β , respectively (data not shown).

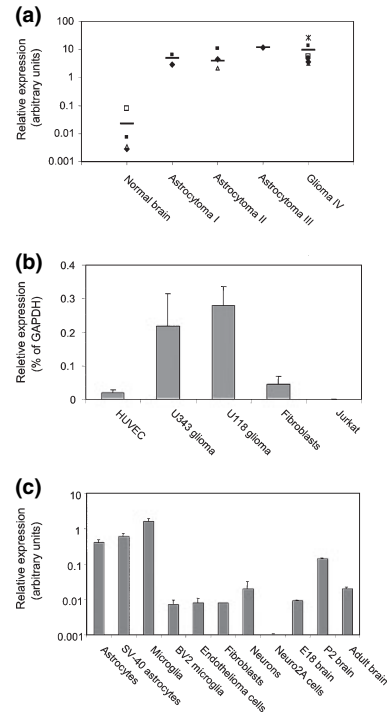


Fig. 2 CXCL16 mRNA expression in human tissue samples (a), cultivated human cells (b) and murine cells/tissues (c). (a) Preparations of mRNA from normal human brain ($n = 4$) and surgical samples of different astrocytomas of WHO grade I ($n = 2$) grade II ($n = 3$) grade III ($n = 1$) and grade IV/glioma ($n = 6$) were analyzed for the expression level of CXCL16 mRNA using TaqMan RT-PCR. The expression level of CXCL16 mRNA was normalised for GAPDH. Each symbol represents the average of triplicate determinations performed for each tumour sample. Mean expression values for samples of the same tumour grade are given as horizontal bars. The expression of CXCL16 in the tumours was significantly increased compared to that in normal brain but did not vary among the different tumour grades (two-tailed t -test for unpaired samples, $p < 0.05$). (b) Cultured human endothelial cells (HUVEC), different human glioma cell lines, fibroblasts and Jurkat T cells were analysed for the presence of human CXCL16 mRNA. (c) Murine primary astrocytes, microglial cells, neurons, fibroblasts, immortalized murine astro- and microglial cells (SV40 astrocytes and BV2 microglial cells, respectively), murine brain endothelioma, Neuro 2a cells as well as adult, postnatal (P2) and embryonic (E18) brain tissue samples were analysed for the expression level of murine CXCL16 mRNA. Data in (b) and (c) are shown as means and SD of one representative of three independent experiments each performed in triplicates.

On the protein level, the expression of transmembrane CXCL16 and its induction by IFN γ and TNF α were confirmed by western blot analysis of lysates prepared from U343 glioma cells and by immunocytochemistry. As positive control, CO5-7 cells were transfected with a vector encoding HA-tagged CXCL16. The CXCL16-HA protein was expressed as 49 kDa protein detectable by an antiserum against the HA-tag as well as by an antiserum against the chemokine domain of CXCL16 (Fig. 4a). The absence of any protein band in the lysates of

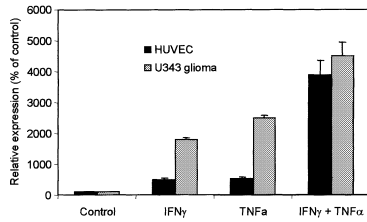


Fig. 3 Induction of CXCL16 mRNA expression by proinflammatory cytokines *in vitro*. Cultured human endothelial cells and U343 glioma cells were stimulated with either 10 ng/mL of IFN γ or TNF α alone or a combination of the two cytokines. After 24 h of incubation, the CXCL16 mRNA level was quantified by TaqMan RT-PCR and expressed as the percentage of that determined for the non-stimulated control. The expression of GAPDH mRNA was not affected by cell stimulation (not shown). Data are presented as means and SD of one representative of three independent experiments each performed in triplicates.

non-transfected COS-7 cells probed with the anti-CXCL16 antibody validated its use for the detection of transmembrane CXCL16. The antibody could then be employed to demonstrate the up-regulation of the 49 kDa CXCL16 protein in U343 cells upon costimulation with IFN γ and TNF α (Fig. 4a). As shown in Fig. 1(c), the up-regulation of cell-expressed CXCL16 could be confirmed by immunocytochemistry of IFN γ /TNF α -stimulated U343 glioma cells.

Release of soluble CXCL16 from cultured glial cells

The release of soluble CXCL16 from cultivated glial cells was assessed by means of a specific ELISA for human or murine CXCL16, respectively. The specificity of both ELISAs was controlled by their positive reactions with supernatants of COS-7 cells transfected with human or murine CXCL16, respectively, which was negative with supernatants from non-transfected control cells (data not shown). As reported previously for endothelial cells, CXCL16 was constitutively released into the supernatants of cultured human glioma cells and murine astrocytes (Fig. 4b). Upon stimulation with a combination of IFN γ and TNF α , the level of soluble CXCL16 increased more than two-fold. No such up-regulation was seen with other stimuli such as glutamate, transforming growth factor β 1 (TGF β 1), epidermal growth factor (EGF), substance P or IL6 linked to its soluble receptor (H-IL6) (Fig. 4b). In murine astroglial cells activation of TNF type 1 receptors by human TNF α caused a three-fold up-regulation of CXCL16 protein expression. By contrast, murine BV2 microglial cells (either left unstimulated or activated via type 1 TNF receptors) did not contain relevant amounts of CXCL16 protein (data not shown).

Glial CXCL16 is shed by at least two distinct metalloproteinases

To investigate whether the release of soluble CXCL16 would be due to metalloproteinase-mediated shedding, U343 and A761 glioma cells were treated with the hydroxamate

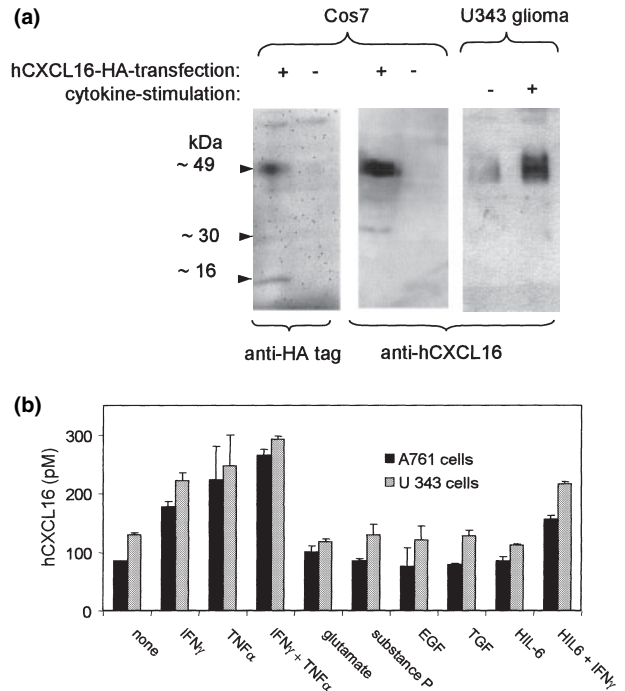


Fig. 4 Expression and release of CXCL16 protein. (a) Glioma cells were left untreated or stimulated with IFN γ and TNF α for 24 h. Subsequently, the cells were washed and cell extracts prepared with Triton-X100 were analysed by Western blotting with a rabbit antibody against human CXCL16. As a control, extracts of COS7 cells transfected with hemagglutinin (HA)-tagged CXCL16 were analysed in parallel. The transfected CXCL16 was detected by both, an anti-HA and the anti-CXCL16 antibody. Broad bands of the glycosylated transmembrane form of CXCL16 are visible at 49 kDa, the expression is stimulated by cytokine treatment. (b) The human glioma cell line (U343) and glioma cells cultivated from a grade IV surgical glioma (A761) were treated with IFN γ (10 ng/mL), TNF α (10 ng/mL), glutamate (10 mM), substance P (10 nM), EGF (10 ng/mL), TGF β 1 (10 ng/mL) and HIL-6 (10 ng/mL), for 24 h, and subsequently conditioned media were harvested and analysed for the presence of soluble CXCL16 by ELISA. Data are shown as means and SD of one representative of three independent experiments each performed in triplicates.

metalloproteinase inhibitor GW280264X. This inhibitor is known to block the two disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 (Hundhausen *et al.* 2003). Both proteases have been implicated in a number of shedding events in different cell types and are indeed present in glioma cells as shown by real time RT-PCR analysis with ADAM10 and ADAM17 specific primers (Fig. 5a) as well as by western blot detection of both proteins in their pro- and mature form using rabbit antibodies raised against ADAM10 and ADAM17, respectively (Fig. 5b). GW280264X dose dependently blocked the release of CXCL16 from unstimulated as well as that from IFN γ /TNF α -stimulated cells (Fig. 6a) whereas the serine protease inhibitor PMSF had no effect (data not shown).

Phorbol-12-acetate-13-myristate (PMA) reportedly up-regulates shedding of numerous surface proteins via the

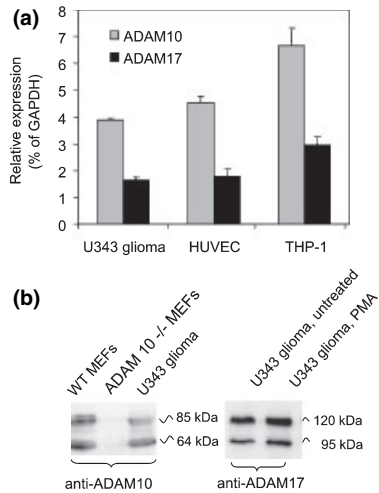


Fig. 5 Expression of ADAM10 and ADAM17 mRNA (a) and protein (b) by glioma cells. (a) Human U343 glioma cells, endothelial cells (HUVEC) and monocytic cells (THP-1 cells) were analysed for the mRNA expression of the two disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 using TaqMan RT-PCR. For each cell type the expression level of both proteases was calculated as the percentage of that determined for GAPDH in parallel. Comparable high expression was found in all cell types. (b) Western blot analysis of ADAM10 and ADAM17 in human U343 glioma cells: The bands at 85 kDa and 64 kDa detected by the antibody against ADAM10 represent the proform and the mature form of ADAM10, respectively, as demonstrated by the absence of these bands in fibroblasts from ADAM10^{-/-} mice. Correspondingly, 120 kDa and 95 kDa protein variants were detected by the antibody against ADAM17. The expression level of either protein variant was not affected when the cells were stimulated with PMA for 2 h.

activity of ADAM17 (Black *et al.* 2003) but this does not involve the up-regulation of ADAM17 protein. Indeed, treatment of glioma cells with PMA for 1 or 2 h enhanced CXCL16 shedding in the two glioma cell lines by a factor of three (Fig. 6b) without affecting the ADAM 17 protein level (Fig. 5b). The PMA-induced increase in CXCL16 release was not further enhanced during longer periods of treatment (8 h) suggesting that de novo protein synthesis was not enhanced. Both, the constitutive and the PMA-induced shedding were sensitive to the combined ADAM10/ADAM17 metalloproteinase inhibitor GW280264X. The related compound GI254023X blocking ADAM10 but not ADAM17 (Hundhausen *et al.* 2003) reduced the constitutive shedding to a similar degree as the combined ADAM10/ADAM17 inhibitor but could not effectively block the PMA-induced effect (Figs 6c and d). These data suggest that ADAM17 is not implicated in the constitutive shedding but is the major sheddase involved in the PMA-induced cleavage.

The CXCL16 receptor CXCR6 is up-regulated in glioma tissue and expressed by astrocytes and microglial cells

Soluble and transmembrane CXCL16 both target the chemokine receptor CXCR6 (Matloubian *et al.* 2000; Shimaoka

et al. 2004). Therefore, we investigated the receptor's mRNA expression by TaqMan real time RT-PCR in human and mouse brain tissue samples and cultivated cells (Fig. 7). In tissue samples from adult human brain CXCR6 mRNA was scarcely detectable, but more abundant in glioblastoma WHO grade IV (Fig. 7a). The expression level in the gliomas was slightly lower than in human spleen that served as a control for high CXCR6 expression as reported recently (Matloubian *et al.* 2000). Within the spleen, T cells are known to express CXCR6 protein and accordingly were found to contain high levels of CXCL16 mRNA.

In mouse tissue, high expression of CXCR6 mRNA was reported in spleen and lung (Matloubian *et al.* 2000) and could be confirmed by TaqMan RT-PCR (not shown). By contrast, CXCR6 mRNA was not detectable in normal adult or embryonic brain. A low level of CXCR6 mRNA was found in postnatal P2 brain that is characterized by high proliferation of astroglial cells (not shown). Cultured astroglial cells, especially immortalized astrocytes, showed a moderate receptor expression. Lower amounts were detected in primary and immortalized microglial cells, for which the correct size of the amplified CXCR6 mRNA (81 bp) was confirmed by gel electrophoresis (Fig. 7c). Final proof for the expression of CXCR6 mRNA was obtained by amplifying the entire receptor from microglial cDNA using primers comprising the full coding sequence yielding a DNA band of the expected size (1079 bp). The PCR product was identified as CXCR6 cDNA by cloning and sequencing (Fig. 7d). In contrast to the two glial cell lines, however, mouse neuronal and endothelial cell lines did not express relevant levels of CXCR6 mRNA (Fig. 7b).

To elucidate whether CXCR6 receptors on astroglial and microglial cells are functionally active, we measured the effect of recombinant soluble murine CXCL16 on the proliferation of immortalized and cultivated murine glial cells. As shown in Table 1, after 24 h of culture CXCL16 (10 nM) induced similar increase in DNA content as basic fibroblast growth factor (bFGF, 10 ng/mL) in astroglial cells, or as interleukin-3 (10 ng/mL) in microglial cells. In contrast, these cell type-specific positive controls did not yield effects in the non-responding cell type.

Taken together, these data suggest that the increased expression of CXCL16 in glioma tissue is associated with the increased presence of CXCL16 responsive cells, and that apart from infiltrating T cells also astrocytes and microglial cells may respond to the increased levels of CXCL16.

Discussion

In the present study we show that the transmembrane chemokine CXCL16 is expressed and shed by brain cells. In normal adult brain the chemokine is found at a low level only. In solid glioma tumours, however, CXCL16 is abundantly expressed by glial cells. We show that cultured

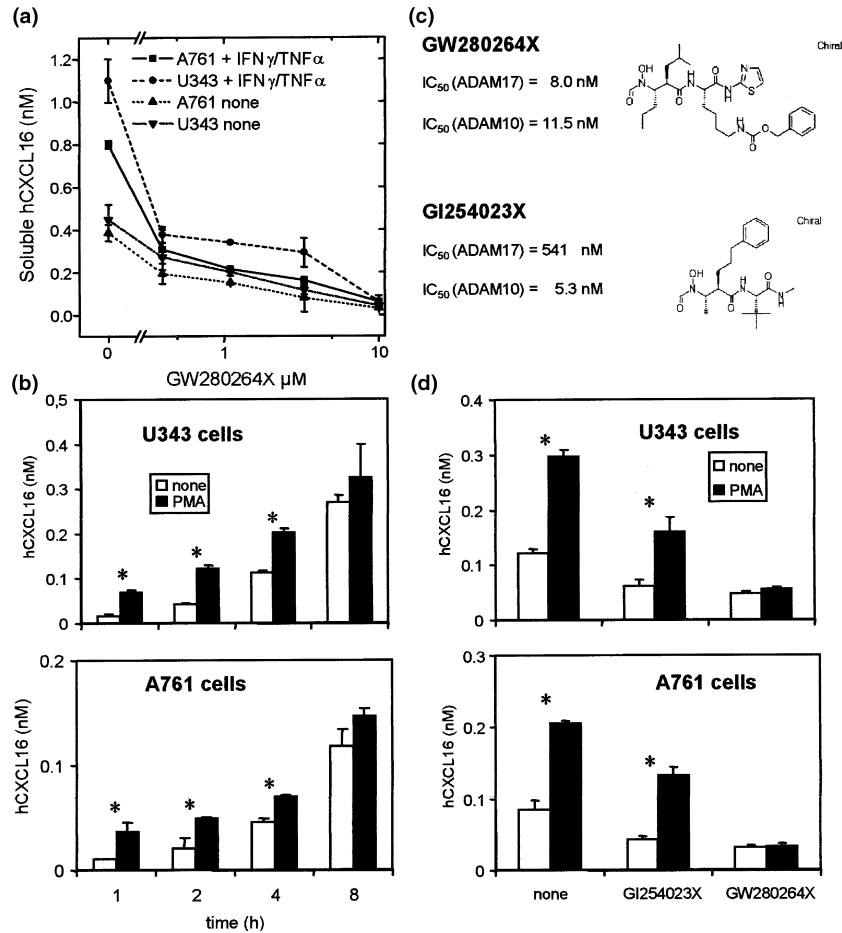


Fig. 6 Inhibition of constitutive and inducible CXCL16 shedding in human glioma cells by metalloproteinase inhibitors. (a) Dose-dependency: U343 and A761 glioma cells (untreated or stimulated with IFN γ and TNF α , each 10 ng/mL) were incubated for 24 h with increasing dosages of the metalloproteinase inhibitor GW280264X and subsequently conditioned media were analyzed for their content of released CXCL16 by ELISA. CXCL16-shedding is almost completely prevented by the inhibitor at a dosage of 10 μM (b) Time-dependency of PMA-induced shedding: Glioma cells were left untreated or treated with PMA for different periods of time. Subsequently, released CXCL16 was quantified by ELISA. Asterisks indicate the statistically significant increase in CXCL16 release induced by PMA (two-tailed *t*-test for paired samples, $p < 0.05$). (c) Structures and potencies of the metalloproteinase inhibitors GW280264X and GI254023X. The inhib-

itory potency to block human recombinant ADAM10 or ADAM17 is given as the inhibitor concentration leading to half maximal inhibition (IC₅₀) of the recombinant proteases. Whereas GW280264X is a potent inhibitor of both proteases, GI254023X is 100-fold more potent for ADAM10. (d) Differential inhibition of constitutive and PMA-induced shedding: Glioma cells were treated with or without PMA for 2 h in the absence or presence of 10 μM GW280264X or GI254023X. Released CXCL16 was then quantified by ELISA. As indicated by asterisks PMA still induced a significant increase in CXCL16 shedding in cells treated with GI254023X but not in cells treated with GW280264X (two-tailed *t*-test for paired samples, $p < 0.05$). Data are shown as means \pm SD of one representative of three independent experiments each performed in triplicates.

glioma cells constitutively express CXCL16 and that the expression is further augmented by stimulation with pro-inflammatory cytokines. Therefore, malignant transformation and cytokine-activation of astroglial cells appear to be important inducers of CXCL16 in glial cells. In activated astroglial and glioma cells, transmembrane CXCL16 is shed to a soluble form involving the activity of cell-surface metalloproteinases. Besides T cells and microglial cells, also activated astrocytes were found to express mRNA for the CXCL16 receptor CXCR6. Astroglial and microglial cells

may therefore constitute a target for autocrine or paracrine stimulation via CXCL16.

To date the regulation of CXCL16 expression under physiological and pathophysiological conditions is still unknown. Originally, expression of CXCL16 has been described on antigen-presenting cells (Matloubian *et al.* 2000; Wilbanks *et al.* 2001). We recently reported that CXCL16 is induced in endothelial cells *in vitro* upon costimulation with IFN γ and TNF α (Abel *et al.* 2004). We here provide multiple lines of evidence for the expression

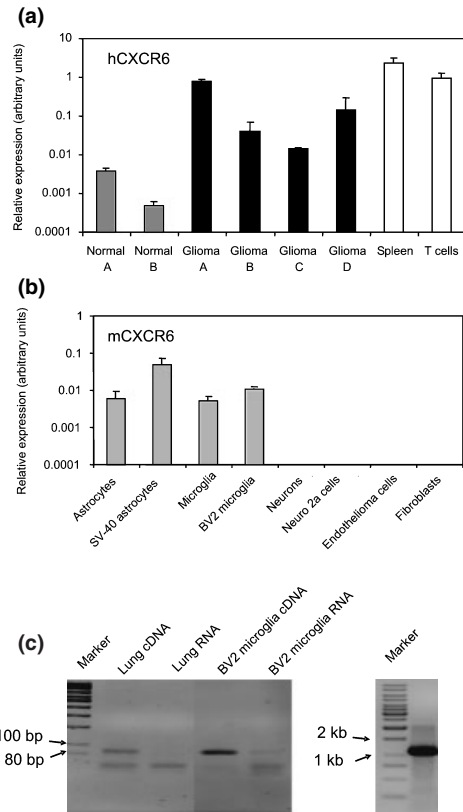


Fig. 7 Expression of CXCR6 mRNA in human tissues (a) and in murine cells, tissues (b–d). (a) Samples from human normal brain, glioblastoma grade IV tumours, spleen and purified circulating T cells were analysed for the presence of hCXCR6 mRNA by TaqMan RT-PCR. (b) Murine microglial, astroglial and neuronal cell lines, primary microglial, astroglial and neuronal cells were investigated for the expression of mCXCR6 mRNA by TaqMan RT-PCR. (c) cDNA and non-transcribed RNA of murine lung tissue and BV2 microglial cells were subjected to PCR using mCXCR6 TaqMan primers yielding an amplicon of 81 bp. The PCR products were analyzed by gel electrophoresis and were clearly distinguishable from the 32–36 bp primers. (d) For cloning and sequencing of microglial CXCR6, the receptor was amplified from microglial cDNA using primers comprising the entire coding sequence and subsequently subjected to gel electrophoresis. In (a) and (b) the expression level of CXCR6 mRNA was normalised to GAPDH. Data in (b) are shown as means \pm SD of one representative experiment performed in triplicates.

and induction of the chemokine in brain cells. We find that in glioma tumours, the chemokine is highly up-regulated at the message and protein level. We identify glial cells as the major producers of CXCL16 *in vivo* and *in vitro*. In cell culture, glioma cells express and release CXCL16 constitutively. Interestingly, the other transmembrane chemokine CX3CL1 is not expressed by unstimulated glioma cells, but induced by costimulation with IFN γ and TNF α (Yoshida *et al.* 2001). We find that the expression of glial CXCL16 is further up-regulated by IFN γ and TNF α , although the synergism of the two cytokines was not as pronounced

Table 1 Influence of CXCL16 on the proliferation of murine astroglial and microglial cells

Stimulus	Astroglial cells		Microglial cells
	Immortalized	Cultivated	Immortalized
None (control)	100 \pm 7.6	100 \pm 15.6	100 \pm 14.6
CXCL16, 10 nM	135.5** \pm 7.5	131.0* \pm 15.9	147.5** \pm 5.9
Interleukin-3, 10 ng/mL	103.0 \pm 11.2	n.d.	135.0** \pm 6.7
bFGF, 10 ng/mL	130.0** \pm 10.9	117.3* \pm 5.3	95.5 \pm 3.5

n.d., not done. * p < 0.1 and ** p < 0.05 for stimulators vs. non-stimulated controls.

24 h stimulation in 0.5% foetal calf serum, FCS, or 10% FCS for cultivated astrocytes with or without murine recombinant cytokines; means \pm SD for n = 5 individual samples.

as reported for the induction of CX3CL1 (Yoshida *et al.* 2001; Ludwig *et al.* 2002a). Taken together, malignant transformation and pro-inflammatory cytokines seem to be both potent inducers of CXCL16 in the brain.

The release of CXCL16 from astrocytes and glioma cells is further regulated by proteolytic shedding of the transmembrane molecule. We find that shedding of CXCL16 by astrocytes involves a mechanism similar to that described previously for CX3CL1 which is cleaved by the activity of the two disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 (Garton *et al.* 2001; Hundhausen *et al.* 2003). Both proteases are indeed expressed at the mRNA and protein level in glioma cells. PMA-treatment, which is known to rapidly up-regulate ADAM17-mediated shedding of numerous surface molecules (Black *et al.* 2003) including CX3CL1 (Garton *et al.* 2001), also enhanced CXCL16 cleavage in different glioma cell lines, suggesting that ADAM17 may be implicated in the shedding of CXCL16 as well. This view is supported by the differential inhibition profiles of the two hydroxamate inhibitors, of which only one is capable of blocking ADAM17 and the PMA-induced shedding, while the other is less effective on ADAM17 and does not prevent PMA-induced shedding. Taken together, our inhibition data suggest that ADAM17 is not implicated in the constitutive but rather in the PMA-induced release of CXCL16. It is very likely that ADAM10 is the key enzyme for the constitutive shedding of CXCL16, since the inhibition profiles of the two inhibitors are very similar to that seen with mouse embryonic fibroblasts for which an involvement of ADAM10 could be demonstrated by comparison of the CXCL16 shedding with that in fibroblasts prepared from embryonically lethal ADAM10 $-/-$ mice (Abel *et al.* 2004).

Gliomas reportedly express several soluble chemokines. CXCL12/SDF-1 and its receptor CXCR4 are present in glioma as well as in tumour endothelial cells (Salmaggi *et al.* 2004). CXCL12/SDF-1 stimulates glioma cell growth and increases the survival of endothelial cells (Barbero *et al.*

2003; Salmaggi *et al.* 2004). Glioma cells also secrete CXCL8/IL-8 which may in turn act as an autocrine growth factor (Desbaillets *et al.* 1997). Glial CCL2/MCP-1 is a critical chemoattractant for glioma-infiltrating microglial cells (Platten *et al.* 2003). We here report that CXCL16 is another member of the chemokine family that is up-regulated in brain tumours, especially in glioma cells. Interestingly, in human rectal cancer CXCL16 expression is restricted to macrophages and is rather down-regulated compared to control tissue (Wagsater *et al.* 2004). Therefore, the up-regulation of CXCL16 seen in brain tumours could constitute a more tumour specific event.

However, in contrast to the other soluble chemokines found in brain tumours, CXCL16 is expressed as a transmembrane molecule and therefore might have a different function and undergo additional post-translational control. As a transmembrane protein it may be relevant to establish physical contact to CXCR6-expressing target cells within the brain tissue, but as a soluble chemokine it would attract target cells over a longer distance. The balance between these functions appears to be regulated by constitutive and inducible shedding. CXCR6 mRNA was considerably up-regulated in the tissue of two glioma samples and therefore, paracrine or autocrine stimulation via CXCL16 may occur within these tumours. Since apart from activated T cells also astrocytes and to a lesser extent microglial cells were found to express CXCR6 mRNA, we speculate that CXCL16 may act as an auto- and paracrine chemoattractant and growth factor for glioma cells. Besides this potentially growth promoting effect, CXCL16 can attract activated T cells which are, however, rare in gliomas. It is well known that high grade glioma cells secrete immunosuppressive cytokines like transforming growth factor- β and destroy lymphocytes by Fas-ligand-mediated apoptosis (Held-Feindt *et al.* 2003; Strege *et al.* 2004). Therefore, attraction of activated T cells by CXCL16 is functionally a futile mechanism in gliomas, but may be more important after inflammatory activation of astrocytes, e.g. by IFN γ in infections or after neuro- or oligodegeneration. Accordingly, CXCL16 was recently reported to contribute to the pathology of experimentally induced encephalitis (Fukumoto *et al.* 2004).

CXCR6 receptor expression on brain cells and its functional impact was investigated only in initial experiments. In CXCR6-positive immortalized astroglial and microglial cells recombinant soluble CXCL16 induced proliferation under low serum condition that was comparable to positive controls. A corresponding mitogenic response to CXCL16 was recently also observed in vascular smooth muscle cells (Chandrasekar *et al.* 2004). Further studies elucidating the role of membrane-bound and soluble CXCL16 on normal/activated and malignant brain cells are in progress.

In conclusion, we have provided multiple evidences that CXCL16 is up-regulated in glioma cells and reactive astro-

cytes *in vivo* and *in vitro*, and we have defined possible target cells for CXCL16 in glioma tissue. Future work needs to address the biological functions of CXCL16 in the development of brain tumours. For this purpose, CXCR6 $^{-/-}$ mice that do not show obvious abnormalities during development (Unutmaz *et al.* 2000) may be suitable and could be now studied in models of brain tumorigenesis and inflammation.

Acknowledgements

We thank Martina Burmester, Dagmar Freier, Miriam Lemmer, Sonja Vollbehr and Barbara Mütze for expert technical assistance. This work was supported in part by the Hänsel Foundation of the Christian-Albrechts-Universität Kiel and the Deutsche Forschungsgemeinschaft, grant LU 869/1–2 to AL.

References

- Abel S., Hundhausen C., Mentlein R., Schulte A., Berkhout T. A., Broadway N., Hartmann D., Sedlacek R., Dietrich S., Muetze B., Schuster B., Kallen K. J., Saftig P., Rose-John S. and Ludwig A. (2004) The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J. Immunol.* **172**, 6362–6372.
- Ambrosini E. and Aloisi F. (2004) Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochem. Res.* **29**, 1017–1038.
- Barbero S., Bonavia R., Bajetto A., Porcile C., Pirani P., Ravetti J. L., Zona G. L., Spaziante R., Florio T. and Schettini G. (2003) Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer Res.* **63**, 1969–1974.
- Bazan J. F., Bacon K. B., Hardiman G., Wang W., Soo K., Rossi D., Greaves D. R., Zlotnik A. and Schall T. J. (1997) A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* **385**, 640–644.
- Biber K. (2002) Microglial chemokines and chemokines receptors. In: *Universes in Delicate Balance: Chemokines and the Nervous System* (Ransohoff, R. M., Suzuki, K., Proudfoot, A. E. and Harrison, J. K., eds), pp. 289–299. Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Black R. A., Doedens J. R., Mahimkar R., Johnson R., Guo L., Wallace A., Virca D., Eisenman J., Slack J., Castner B., Sunnarborg S. W., Lee D. C., Cowling R., Jin G., Charrier K., Peschon J. J. and Paxton R. (2003) Substrate specificity and inducibility of TACE (tumour necrosis factor alpha-converting enzyme) revisited: the Ala-Val preference, and induced intrinsic activity. *Biochem. Soc. Symposium* **70**, 39–52.
- Campbell I. L. and Asensio V. C. (2002) Insights from transgenic and knockout mice. In: *Universes in Delicate Balance: Chemokines and the Nervous System* (Ransohoff, R. M., Suzuki, K., Proudfoot, A. E. and Harrison, J. K., eds), pp. 225–233. Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Chandrasekar B., Bysani S. and Mummidi S. (2004) CXCL16 signals via Gi, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, I kappa B kinase, and nuclear factor-kappa B and induces cell-cell adhesion and aortic smooth muscle cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **279**, 3188–3196.
- Chapman G. A., Moores K., Harrison D., Campbell C. A., Stewart B. R. and Strijbos P. J. (2000) Fractalkine cleavage from neuronal membranes represents an acute event in the inflammatory response to excitotoxic brain damage. *J. Neurosci.* **20**, RC87 1–5.

- Desbaillets I., Diserens A. C., deTribolet N., Hamou M. F. and VanMeir E. G. (1997) Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis. *J. Exp. Med.* **186**, 1201–1212.
- Dorf M. E., Berman M. A., Tanabe S., Heesen M. and Luo Y. (2000) Astrocytes express functional chemokine receptors. *J. Neuroimmunol.* **111**, 109–121.
- Fukumoto N., Shimaoka T., Fujimura H., Sakoda S., Tanaka M., Kita T. and Yonehara S. (2004) Critical roles of CXC chemokine ligand 16/scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein in the pathogenesis of both acute and adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **173**, 1620–1627.
- Garton K. J., Gough P. J., Blobel C. P., Murphy G., Greaves D. R., Dempsey P. J. and Raines E. W. (2001) Tumour necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J. Biol. Chem.* **276**, 37 993–38 001.
- Gough P. J., Garton K. J., Wille P. T., Rychlewski M., Dempsey P. J. and Raines E. W. (2004) A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16. *J. Immunol.* **172**, 3678–3685.
- Hartmann D., De Strooper B., Serneels L., Craessaerts K., Herreman A., Annaert W., Umans L., Lubke T., Lena I. A., von Figura K. and Saftig P. (2002) The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for α -secretase activity in fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2615–2624.
- Held-Feindt J., Lütjohann B., Ungefroren H., Mehdorn H. M. and Mentlein R. (2003) Interaction of transforming growth factor- β (TGF- β) and epidermal growth factor (EGF) in human glioma cells. *J. Neuro-Oncology* **63**, 117–127.
- Hundhausen C., Misztela D., Berkhout T. A., Broadway N., Saftig P., Reiss K., Hartmann D., Fahrenholz F., Postina R., Matthews V., Kallen K. J., Rose-John S. and Ludwig A. (2003) The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* **102**, 1186–1195.
- Kleihues P. and Cavenee W. (2000) Tumors of the Nervous System: *Pathology and Genetics*, 2nd edn. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Lucius R. and Mentlein R. (1991) Degradation of the neuropeptide somatostatin by cultivated neuronal and glial-cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 18 907–18 913.
- Ludwig A., Berkhout T., Moores K., Groot P. and Chapman G. (2002a) Fractalkine is expressed by smooth muscle cells in response to IFN- γ and TNF- α and is modulated by metalloproteinase activity. *J. Immunol.* **168**, 604–612.
- Ludwig A., Schiemann F., Mentlein R., Lindner B. and Brandt E. (2002b) Dipeptidyl peptidase IV (CD26) on T cells cleaves the CXC chemokine CXCL11 (I-TAC) and abolishes the stimulating but not the desensitizing potential of the chemokine. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 183–191.
- Matloubian M., David A., Engel S., Ryan J. E. and Cyster J. G. (2000) A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat. Immunol.* **1**, 298–304.
- Mentlein R., Eichler O., Forstreuter F. and Held-Feindt J. (2001) Somatostatin inhibits the production of vascular endothelial growth factor in human glioma cells. *Int. J. Cancer* **92**, 545–550.
- Mentlein R. and Held-Feindt J. (2002) Pleiotrophin, an angiogenic and mitogenic growth factor, is expressed in human gliomas. *J. Neurochem.* **83**, 747–753.
- Mentlein R., Ludwig R. and Martensen I. (1998) Proteolytic degradation of Alzheimer's disease amyloid β -peptide by a metalloproteinase from microglia cells. *J. Neurochem.* **70**, 721–726.
- Nakayama T., Hieshima K., Izawa D., Tatsumi Y., Kanamaru A. and Yoshie O. (2003) Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues. *J. Immunol.* **170**, 1136–1140.
- Platten M., Kretz A., Naumann U., Aulwurm S., Egashira K., Isenmann S. and Weller M. (2003) Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas. *Ann. Neurol.* **54**, 388–392.
- Pufe T., Bartscher M., Petersen W., Tillmann B. and Mentlein R. (2003) Expression of pleiotrophin, an embryonic growth and differentiation factor, in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 660–667.
- Reiss K., Mentlein R., Sievers J. and Hartmann D. (2002) Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer. *Neuroscience* **115**, 295–305.
- Salmaggi A., Gelati M., Pollo B., Frigerio S., Eoli M., Silvani A., Broggi G., Ciusani E., Croci D., Boiardi A. and De Rossi M. (2004) CXCL12 in malignant glial tumours: a possible role in angiogenesis and cross-talk between endothelial and tumoral cells. *J. Neuro-Oncology* **67**, 305–317.
- Shimaoka T., Kume N., Minami M., Hayashida K., Kataoka H., Kita T. and Yonehara S. (2000) Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *J. Biol. Chem.* **275**, 40 663–40 666.
- Shimaoka T., Nakayama T., Fukumoto N., Kume N., Takahashi S., Yamaguchi J., Minami M., Hayashida K., Kita T., Ohsumi J., Yoshie O. and Yonehara S. (2004) Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 267–274.
- Strege R. J., Godt C., Stark A. M., Hugo H. H. and Mehdorn H. M. (2004) Protein expression of Fas, Fas ligand, Bcl-2 and TGF β 2 and correlation with survival in initial and recurrent human gliomas. *J. Neuro-Oncology* **67**, 29–39.
- Unutmaz D., Xiang W., Sunshine M. J., Campbell J., Butcher E. and Littman D. R. (2000) The primate lentiviral receptor Bonzo/STRL33 is coordinately regulated with CCR5 and its expression pattern is conserved between human and mouse. *J. Immunol.* **165**, 3284–3292.
- Wagsater D., Hugander A. and Dimberg J. (2004) Expression of CXCL16 in human rectal cancer. *Int. J. Mol. Med.* **14**, 65–69.
- Wilbanks A., Zondlo S. C., Murphy K., Mak S., Soler D., Langdon P., Andrew D. P., Wu L. and Briskin M. (2001) Expression cloning of the strl33/bonzo/tymstr ligand reveals elements of cc, cxc, and cx3c chemokines. *J. Immunol.* **166**, 5145–5154.
- Yoshida H., Imaizumi T., Fujimoto K., Matsuo N., Kimura K., Cui X., Matsumiya T., Tanji K., Shibata T., Tamo W., Kumagai M. and Satoh K. (2001) Synergistic stimulation, by tumour necrosis factor- α and interferon- γ , of fractalkine expression in human astrocytes. *Neurosci. Lett.* **303**, 132–136.

9. Lebenslauf

- 9.11.1971** geboren in Frankfurt/Hoechst; Staatsangehörigkeit: deutsch
- 1978-1982** Besuch der Grundschule in Mönkeberg/Kiel
- 1982-1991** Besuch des Heinrich-Heine-Gymnasiums in Heikendorf/Kiel; Abschluss: Abitur
- 1991-1992** Zivildienst bei der Naturschutzorganisation „Koordination Natur im Kreis“ in Raisdorf/Kiel
- 1992-1999** Student im Diplom-Studiengang Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- 1996** Drei Monate Student an der *Excel English Language School* in London/England; Abschlussprüfung im *International English Language Testing System (IELTS)*
- 1998** Diplomabschlussprüfung im Studiengang Biologie; Prüfungsfächer: Botanik, Zoologie und Organische Chemie
- 1998-1999** Diplomarbeit im Studiengang Biologie, durchgeführt am Institut für Phytopathologie der Agrarwissenschaftlichen Fakultät; Thema: *Synomon-Induktion bei Getreidepflanzen durch Blattlausbefall (Hemiptera: Aphididae) mittels Gaschromatographie sowie durch Attraktionsversuche mit Blattlausparasitoiden (Hymenoptera: Braconidae)*
- 1999-2000** Umzug nach London/England; Student am *International College of English and Computing*
- 2000-2001** Student an der *School of Medicine* des *Imperial College of Science, Technology and Medicine* in London; Abschluss: Master of Science (MSc) in *Molecular Biology and Pathology of Viruses*; Thema der Masterarbeit: *The preparation of a single-chain variable fragment (ScFv) from a monoclonal antibody specific for the NS3 protein of hepatitis C virus (HCV)*
- Seit März 2002** Doktorand am Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe Dr. Ludwig; Direktor: Prof. Rose-John

10. Danksagung

Ich danke ganz herzlich Herrn Prof. Stefan Rose-John für die freundliche Aufnahme in dem Institut, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, für viele Anregungen und Ratschläge in den Seminaren und die Übernahme des Koreferats.

Ich möchte Herrn Prof. Matthias Leippe herzlich danken für sein großes Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft, das Referat zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Andreas Ludwig, in dessen Arbeitsgruppe ich drei Jahre lang mitwirken durfte. Ich danke ihm sehr für seinen großen Einsatz, seine Hilfeleistungen sowie das ausgesprochene Vertrauen und die Fairness, die er mir von Anfang an entgegengebracht hat.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch allen meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe aussprechen. Insbesondere Alexander Schulte danke ich für eine Vielzahl nützlicher Tipps und das Korrekturlesen der Arbeit. Weiterhin danke ich Dr. Sigrid Lang, Sören Abel, Ulli Winter, Uli Klostermeier, Jana Achilles und Salvinia Mletzko für viele hilfreiche und interessante Gespräche. Vielen Dank auch an Barbara Mütze und Sonja Vollbehr für die große Unterstützung im Labor und in der Zellkultur.

Herrn Professor Paul Saftig, Dr. Karina Reiss und Thorsten Maretzky bin ich sehr dankbar für den lebhaften Gedankenaustausch und die gute Zusammenarbeit.

Ich danke PD Dr. Karl-Josef Kallen, Dr. Krzysztof Paliga, Dr. Radek Sedlacek und Dr. Björn Schuster für viele konstruktive Gespräche.

Schließlich möchte ich Dr. Marina Kovaleva von Herzen danken für ihre liebevolle Unterstützung zu jeder Zeit.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Christian Hundhausen, die vorliegende Dissertation, abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meinen Doktorvater, selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Auch wurde die Dissertation bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt.

Des Weiteren erkläre ich, bisher kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.
