

Aus dem Biochemischen Institut
(Direktor Prof. Dr. rer. nat. Stefan Rose-John)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

ENTSTEHUNG DES HUMANEN LÖSLICHEN
INTERLEUKIN-6 REZEPTORS WÄHREND DER
MAKROPHAGENDIFFERENZIERUNG

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von
ANDRÉ MAUERMANN
aus Zwönitz

2017

Referent: Prof. Dr. Stefan Rose-John, Biochemisches Institut
Koreferent: Prof. Dr. Dieter Adam, Institut für Immunologie
Tag der mündlichen Prüfung: 08. März 2018
Zum Druck genehmigt, Kiel den 08. März 2018

I. Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Abbildungsverzeichnis	IV
III.	Tabellenverzeichnis.....	V
IV.	Abkürzungsverzeichnis	V
1	Einleitung.....	1
1.1	Interleukin-6 und der Interleukin-6 Rezeptor	1
1.2	Vom Monozyt zum Makrophagen.....	5
1.3	Wichtige Proteasen der Zelloberfläche monozytärer Zellen.....	7
1.3.1	Metalloproteasen der <i>A Disintegrin And Metalloproteinase (ADAM)</i> - Klasse.....	7
1.3.2	Serinproteasen: Cathepsin G (CG), Proteinase3 (PR3), neutrophile Elastase (NE), Matriptase	10
1.4	Problemstellung	11
2	Material.....	12
2.1	Chemikalien	12
2.2	Puffer und Medien.....	13
2.3	Größenmarker, Enzyme und Enzympuffer	14
2.4	Antikörper.....	15
2.5	Zelllinien	15
2.6	Kits.....	15
2.7	Verbrauchsmaterialien	15
2.8	Geräte	16
3	Methoden	17
3.1	Isolation primärer humaner Monozyten aus Blut.....	17
3.1.1	Blutentnahme.....	17

3.1.2	Isolation der mononukleären Zellfraktion mittels eines Ficoll® Gradienten	17
3.1.3	Magnetic Activated Cell Sorting - MACS®.....	18
3.2	Zellkultur.....	19
3.2.1	Kultivierung der Zellen	19
3.2.2	Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen.....	19
3.2.3	Kryokonservierung der Zellen	20
3.2.4	Stimulation der Zellen	20
3.2.5	Ernte der Zellen und Herstellen von Lysaten.....	22
3.3	qRT-PCR	22
3.4	SDS-PAGE.....	23
3.5	Western Blot.....	24
3.6	ELISA.....	25
3.7	Durchflusszytometrie.....	26
3.8	Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten	27
4	Ergebnisse	28
4.1	Untersuchungen zur Expression von ADAM-17 in Monozyten und Makrophagen.....	28
4.1.1	Differenzierung der monozytären Zelllinien THP-1 und U937 zu Makrophagen-ähnlichen Zellen	28
4.1.2	Isolation der primären Monozyten und deren Differenzierung.....	29
4.1.3	ADAM-17-Expression in Monozyten und Makrophagen der Zelllinien U937 und THP-1	30
4.1.4	ADAM-17-Expression in primären humanen Monozyten und Makrophagen	31
4.2	Die Entstehung des humanen löslichen Interleukin-6 Rezeptors	33
4.2.1	Stimulationsversuche mit Monozyten und Makrophagen der humanen Zelllinie THP-1	33
4.2.2	Stimulationsversuche mit Monozyten und Makrophagen der humanen Zelllinie U937	41
4.2.3	Stimulationsversuche mit primären CD14 ⁺ Monozyten und Makrophagen.....	47
5	Diskussion.....	60

5.1	ADAM-17 unterliegt einer Expressionssteigerung während der Makrophagen- differenzierung	60
5.2	Die konstitutive Freisetzung des humanen sIL-6R durch monozytäre Zellen.....	60
5.3	Die Freisetzung des sIL-6R durch monozytäre Zellen nach Stimulation	62
6	Zusammenfassung	65
7	Ausblick	67
8	Literaturverzeichnis	68
9	Anhang	78

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Interleukin-6 Signalwege	2
Abbildung 3.1 Der Ficoll® Gradient vor und nach Zentrifugation.....	18
Abbildung 4.1 Differenzierungsprozess der Zelllinien THP-1 und U937.....	29
Abbildung 4.2 Nachweis der Isolation CD14 ⁺ Zellen.....	29
Abbildung 4.3 Differenzierung der primären Monozyten.....	30
Abbildung 4.4 ADAM-17-Expression in Monozyten und Makrophagen der Zelllinien THP-1 und U937.....	31
Abbildung 4.5 Die Expression von ADAM-17 in primären Monozyten und Makrophagen.....	32
Abbildung 4.6 ADAM-17-mRNA Expression primärer Monozyten und Makrophagen.....	32
Abbildung 4.7 Die konstitutive Freisetzung des sIL-6R durch monozytäre THP-1 Zellen.....	34
Abbildung 4.8 Konstitutive sIL-6R-Freisetzung durch THP-1-Makrophagen.....	35
Abbildung 4.9 sIL-6R-Freisetzung nach Stimulation der THP-1 Monozyten mit 100nM PMA...37	
Abbildung 4.10 Oberflächenexpression des IL-6R der THP-1 Monozyten nach 100 nM PMA Stimulation	38
Abbildung 4.11 Oberflächenexpression von ADAM-17 der THP-1 Monozyten nach 100 nM PMA Stimulation.....	39
Abbildung 4.12 sIL-6R-Freisetzung nach Stimulation der THP-1 Makrophagen mit 100 nM PMA.....	40
Abbildung 4.13 Die konstitutive Freisetzung des sIL-6R durch U937 Zellen.....	42
Abbildung 4.14 sIL-6R-Freisetzung nach Stimulation der U937 Zellen mit 100 nM PMA	44
Abbildung 4.15 Oberflächenexpression des IL-6R der U937 Monozyten nach 100 nM PMA Stimulation	46
Abbildung 4.16 Oberflächenexpression von ADAM-17 der U937 Monozyten Stimulation mit PMA und LPS.....	47
Abbildung 4.17 Konstitutive Freisetzung des sIL-6R durch primäre Monozyten.....	48
Abbildung 4.18 Konstitutive Freisetzung des sIL-6R durch primäre Makrophagen.....	49
Abbildung 4.19 PMA-induzierte Freisetzung des sIL-6R in primären Monozyten	50
Abbildung 4.20 Oberflächenexpression des IL-6R vor und nach PMA-Stimulation.....	51
Abbildung 4.21 Oberflächenexpression von ADAM-10 und ADAM-17 primärer Monozyten unter PMA-Stimulation	52
Abbildung 4.22 PMA-induzierte Freisetzung des sIL-6R durch primäre Makrophagen.....	53
Abbildung 4.23 Vergleich des PMA induzierten IL-6R- <i>Sheddings</i> durch Monozyten und Makrophagen unterschiedlicher Spender.....	54

Abbildung 4.24 LPS-abhängige Produktion des sIL-6R durch primäre monozytäre Zellen.....	55
Abbildung 4.25 BzATP-abhängige Produktion des sIL-6R durch primäre monozytäre Zellen....	57
Abbildung 4.26 LPS induzierte Freisetzung von TNF α in primären Monozyten und Makrophagen.....	59

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Stimuli und Inhibitoren.....	21
Tabelle 2 PCR Zyklusprogramm.....	23
Tabelle 3 Western Blot Antikörper.....	25
Tabelle 4 ELISA Protokoll.....	25
Tabelle 5 FACS Antikörper.....	27

IV. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
μg	Mikrogramm
μM	mikromolar
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
ADAM-TS	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
AEBSF	4-(2-AminoEthyl)BenzenSulfonylFluorid
AK	Antikörper
AOM	Azoxymethan
APC	allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
BzATP	3'-O-(4-benzoyl)benzoyl adenosin 5'-triphosphat
C/EBP β	CCAAT/-enhancer binding protein β
CCL	CC chemokine ligand
CCR	CC chemokine receptor
CD	cluster of differentiation
CG	Cathepsin G
CLC	cardiotrophin like cytokine
CNTF	ciliary neurotrophic factor
ConA	Concanavalin A
CT-1	Cardiotrophin-1
CX3CR1	Fraktalkin-Rezeptor
d	Tag
DEPC	Diethylkarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dextransulfat

EGF-R	epidermal-growth-factor
ELISA	Eng. Enzyme linked immunosorbent assay
Erk	extracellular-signal-related kinase
FACS	fluorescence-activated cell sorting
Fc	fragment crystallizable
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluoreszin Isothiozyanat
FSC	forward scatter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GI254023X; GI	(2R)-N-[(1S)-2,2-Dimethyl-1-[(methylamino)carbonyl]-propyl]-2-[(1S)-1-[formyl(hydroxy)amino]ethyl]-5-phenylpentanamid
GMP	Granulozyten-Makrophagen Progenitor
Gp	Glykoprotein
GW208264X; GW	(2R,3S)-3-(formyl-hydroxyamino)-2-(2-methyl-1-propyl) hexanoic acid [(1S)-5-benzyloxycarbamoylamino-1-(1,3-thiazol-2-ylcarbamoyl)-1-pentyl] amid
h	Stunde
HAI	Hepatozyten Wachstumsfaktor-Aktivator Inhibitor
hM-CSF	human macrophage - colony stimulating factor
ICAM	intracellular adhaesion molecule
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iRhom	inactive rhomboid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LIF	leukemia inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	magnetic activated cell sorting
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP	monocyte chemoattractant protein
mg	Milligramm
min	Minute
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MPS	mononukleäre Phagozyten System
NE	neutrophile Elastase
NF α B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
Ng	Nanogramm
nM	nanomolar
NP-1	neuropoetin-1
OSM	Oncostatin M
P2X7	purinergic receptor P2X, ligand gated ion channel-7
PBMC	(periphery blood mononuclear cell, PBMC)
PBS	phosphate buffered saline
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PMA	4 β -Phorbol-12-Myristate-13-Acetat
PR3	Proteinase 3
PVDF	Polyvinylidenfluorid

qRT-PCR	real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RA	Rheumatoide Arthritis
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SD	standard deviation
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sgp130Fc	Designerprotein aus zwei über den Fc-Teil eines IgG1 verbundenen gp130 Einheiten
SHP-2	Src homology 2 domain-containing phosphatase
sIL-6R	soluble interleukin 6 receptor
SLPI	sekretorischer Leukozyten-Proteinase Inhibitor
SSC	side scatter
STAT	signal transducer and activator of transcription
TBS-T	Tris-buffered saline, 0,1% Tween 20
TGF	tissue growth factor
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TLR	toll like receptor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
Tspan	Tetraspanin
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	vascular endothelial growth factor
α_1 -AGP	α_1 -acid Glykoprotein
$\Delta\Delta$ cP	delta delta crossing points

1 Einleitung

1.1 Interleukin-6 und der Interleukin-6 Rezeptor

IL-6 (Interleukin-6) gehört neben IL-11, IL-27, IL-30, IL-31, OSM, CT-1, CNTF, CLC, LIF, NP-1 zur Familie der Interleukin-6-artigen Zytokine und wird von vielen Zelltypen, wie T- und B-Lymphozyten, Monozyten, Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, aber auch von einigen Tumorzellen produziert (Kishimoto et al., 1995). Daraus resultiert eine physiologische Konzentration von IL-6 im Blut um etwa 5 pg/ml, die unter pathologischen Umständen um das mehrere tausendfache gesteigert sein kann (Robak et al., 1999; Scambia et al., 1994; Wierzbowska et al., 1999). Es besteht aus 184 Aminosäuren und hat – je nach Glykosylierung – ein Molekulargewicht von 20-28 kDa (Rose-John et al., 1993). Es wirkt über Homodimere des β -Rezeptors Glykoprotein 130 (gp130), welcher ubiquitär auf nahezu allen Zellen des Körpers exprimiert wird. IL-6 bindet an einen membranständigen α -Rezeptor (IL-6R), der auf einigen Leukozyten-Subpopulationen, wie z.B. Monozyten, neutrophilen Granulozyten, T- und B-Lymphozyten und Hepatozyten vorkommt (Chalaris et al., 2011). Der IL-6R kommt aber auch in löslicher Form (sIL-6R) im Blut in einer Konzentration von ca. 50 ng/ml unter physiologischen- und bis zu 170 ng/ml unter pathologischen Bedingungen vor (Mitsuyama et al., 1995; Montero-Julian, 2001). In einem Versuch mit konditionalen IL-6R-*knock-out* Mäusen wurde festgestellt, dass der im Serum enthaltene sIL-6R vor allem von Hepatozyten und myeloiden Zellen stammt (McFarland-Mancini et al., 2010). Die Entstehung des sIL-6R begründet sich hauptsächlich durch limitierte Proteolyse des membranständigen Proteins durch Proteasen der ADAM (A Disintegrin and Metalloproteinase)-Familie (Matthews et al., 2003; Mullberg et al., 1993). Dieser Vorgang wird als *ectodomain shedding*, kurz *Shedding* bezeichnet. Auch alternatives Spleißen der mRNA des IL-6R mit Verlust der Transmembranregion und verkürztem C-Terminus führt zu einer Form des sIL-6R (Muller-Newen et al., 1996). Beide Formen dieses sIL-6R sind in der Lage, IL-6 zu binden und als IL-6/sIL6R-Komplex über den membranständigen β -Rezeptor gp130 nahezu alle Zellen des Körpers zu stimulieren. Diese Form der alternativen Signalübertragung wird *trans-signaling* genannt (Rose-John and Heinrich, 1994) und erweitert das Wirkspektrum von IL-6 erheblich. Im Allgemeinen kann die Wirkweise des *trans-signaling* eher als pathophysiologisch und die des *classic-signaling* eher als regenerativ bezeichnet werden (Rose-John, 2012).

Die Wirkung von IL-6 unterliegt einer natürlichen Antagonisierung durch natürliches lösliches gp130 (sgp130). Es liegt in einer Konzentration von 100-400 ng/ml im Blut vor und ist in der Lage, unter physiologischen Bedingungen alles freie IL-6 in IL-6/sIL-6R/sgp130-Komplexen zu

binden und somit vor allem systemisches IL-6-*trans-signaling* zu unterdrücken (Garbers et al., 2011b; Jostock et al., 2001; Muller-Newen et al., 1998). Anhand des Designerproteins sgp130Fc, welches aus zwei über den Fc-Teil eines IgG1 verbundenen sgp130 Einheiten besteht, konnte gezeigt werden, dass sgp130 nur einen Komplex aus IL-6/sIL-6R binden kann und somit das klassische IL-6-*signaling* unberührt lässt (Jostock et al., 2001). Dabei bindet sgp130Fc mit 10-fach höherer Affinität als monomeres sgp130 und hat sich als ein wichtiges Werkzeug zur Erforschung der Rolle des IL-6-*trans-signaling* in Modellen humaner Krankheiten in Mäusen erwiesen.

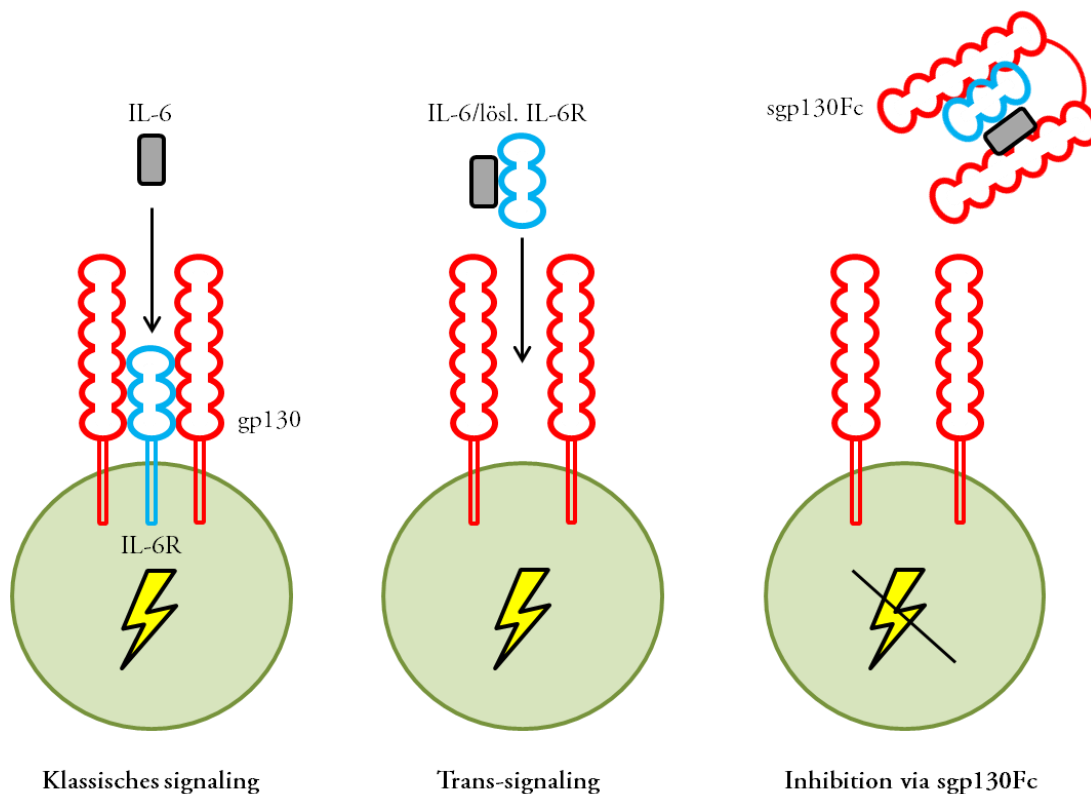


Abbildung 1.1 Interleukin-6 Signalwege

Sowohl beim *trans-signaling*, als auch beim *classic-signaling* wird der Komplex aus IL-6 und membranständigen/sIL-6R hochaffin von zwei gp130 Proteinen gebunden, welche schon als Dimer auf der Zelloberfläche vorkommen (Tenhumberg et al., 2006). Dies führt zur Annäherung und Aktivierung von Janus-Kinasen, welche nicht-kovalent mit den zytoplasmatischen Regionen von gp130 assoziiert sind. Durch diese findet eine Phosphorylierung mehrerer Tyrosinreste an gp130 statt (Hirano et al., 1997). Dieses Ereignis ist die Grundvoraussetzung für die Haupt-Signaltransduktionswege. Der eine führt über Rekrutierung von SHP-2 (*Src homology 2 domain-containing phosphatase*) zum Tyr⁷⁵⁹ und deren Aktivierung durch die Janus-Kinasen über mehrere Zwischenschritte zur Aktivierung des Erk (*extracellular-signal-related kinase*)/MAPK (*mitogen-activated*

protein kinase) Signalweges. Dieser mündet in die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) oder C/EBP β (*CCAAT/-enhancer binding protein β*). Der andere führt über Rekrutierung von STAT-1 und 3 (*signal transducer and activator of transcription*) und Aktivierung durch die Janus-Kinasen zu deren Homo- oder Heterodimerisierung mit folgender Translokation in den Nukleus, wo sie direkt die Transkription bestimmter Zielgene steuern (Eulenfeld et al., 2012; Heinrich et al., 2003). Ein dritter Signalweg führt zur Janus-Kinase-abhängigen Aktivierung des PI3K-Signalweges. Über diese Signalwege steuert IL-6 die Expression einer Vielzahl von Proteinen in einer breiten Anzahl von Zellen, aus deren Summe sich die biologische Wirkung des IL-6/IL-6R-Systems ergibt.

IL-6 ist an der Entstehung von Fieber beteiligt und induziert viele Akut-Phase-Proteine in der Leber, wie Amyloid A, C-Reaktives Protein, α_1 -AGP (*α_1 -acid glykoprotein*), α_1 -Antichymotrypsin, Fibrinogen, oder Caeruloplasmin (Banks et al., 1995; Chen et al., 2006). Unter Fieber induziert es auch ICAM (*intracellular adhesion molecule*)-1 und CCL2 (*CC chemokine ligand*) in Endothelzellen und L-Selectin in Lymphozyten via *trans-signaling*. Es fördert somit den Austritt von Leukozyten aus der Blutbahn (Chen et al., 2006; Chen et al., 2004). Auch steuert IL-6 die Proliferation und Differenzierung von Leukozyten, wie Lymphozyten, Neutrophile und Makrophagen (Chomarat et al., 2000; Dominitzki et al., 2007; Walker et al., 2008). Apoptotische neutrophile Granulozyten in entzündetem Gewebe *shedden* ADAM-17- vermittelt ihren IL-6R, der zusammen mit IL-6 aus den neutrophilen Granulozyten und Monozyten via *trans-signaling* in umliegenden Endothelzellen die Produktion Monozyten-chemotaktischer Stoffe, wie z.B. MCP (*monocyte chemoattractant protein*)-1 anregt. Gleichzeitig kommt es zu einer Unterdrückung neutrophiler Chemokine (Chalaris et al., 2007; Rabe et al., 2008) und zu einer IL-6-*trans-signaling* gesteuerten Induktion des M-CSF-Rezeptors auf Monozyten (Chomarat et al., 2000). Somit vermittelt IL-6 die Resolution der initialen Infiltration durch Neutrophile, indem es deren Elimination durch Makrophagen einleitet. Es wirkt dabei einer übermäßigen Gewebeschädigung durch sezernierte Proteasen und radikaler Sauerstoffspezies entgegen.

IL-6 ist ebenfalls an der Kontrolle des Glukagon-Spiegels und damit des Glucose-Haushaltes beteiligt, indem es die Zellmasse der α -Zellen des Pankreas beeinflusst (Ellingsgaard et al., 2008). Auch steuert IL-6 die Leberregeneration. So wurden stark erhöhte IL-6-Werte bei Patienten nach partieller Hepatektomie festgestellt (Trautwein et al., 1996). IL-6-*knock-out* Mäuse (IL6^{-/-}) sind zu keiner Leberregeneration fähig (Cressman et al., 1996), wobei interessanterweise unter Verwendung IL-6/sIL-6R transgener Mäuse gezeigt wurde, dass die effektive Regeneration der Hepatozyten einen durch IL-6-*trans-signaling* gesteuerten Prozess darstellt (Peters et al., 1997). Es konnte auch ein Einfluss von IL-6-*trans-signaling* auf den Knochenstoffwechsel beobachtet

werden. IL-6 induzierte RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) -abhängige Osteoklastogenese kann nur bei Vorhandensein von sIL-6R stattfinden, indem es im Osteoblasten die Expression des RANK-Liganden steuert (Hashizume et al., 2008). Auch hier sind weibliche- IL6^{-/-} Mäuse in einem murinen Osteoporose-Modell vor Knochenschwund geschützt (Poli et al., 1994).

Veränderungen in der Konzentration von IL-6 und des sIL-6R konnten in zahlreichen Krebs-assoziierten- und entzündlichen Erkrankungen festgestellt werden. So spielt IL-6-*trans-signaling* eine wichtige Rolle im Verlauf der Rheumatoiden Arthritis (RA) und es besteht eine Korrelation zwischen der Schwere der Gelenkschäden und der Konzentration an IL-6 und des sIL-6R in der Synovialflüssigkeit (Robak et al., 1998). Für den Pathomechanismus der RA und einiger anderer Autoimmunerkrankungen zeigen sich vornehmlich sogenannte proinflammatorische TH₁₇ Zellen verantwortlich, eine Effektor T-Zell-Subpopulation, die normalerweise in Schleimhäuten zur Abwehr pathogener Bakterien und Pilze vorkommt (Weaver et al., 2007). Ihre Rekrutierung, ihr Überleben und ihre Differenzierung aus naiven CD4⁺ T-Zellen ist abhängig von TGF- β (*transforming growth factor* β) und IL-6 (Bettelli et al., 2006), wobei die Exposition gegenüber IL-6/sIL-6R darüber entscheidet, wieviel Prozent der naiven T-Zellen sich zu antiinflammatorisch regulierenden T-Zellen oder zu proinflammatorischen TH₁₇ Zellen entwickeln (Dominitzki et al., 2007). Die STAT3 Phosphorylierung in den aktivierten TH₁₇ Zellen via IL-6-*trans-signaling* bestimmt dabei deren Aktivität (Nowell et al., 2009). IL-6^{-/-} Mäuse, oder Mäuse, bei welchen IL-6-*trans-signaling* durch sgp130Fc-Injektion unterbunden ist, sind in Krankheitsmodellen mit künstlich induzierter Arthritis gegen diese geschützt (Nowell et al., 2003). Auch in anderen TH₁₇ abhängigen Autoimmunerkrankungen wie z.B. MOG (Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein) induzierte experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis - ein Krankheitsmodell für humane Multiple Sklerose - zeigen sich IL6^{-/-} Mäuse geschützt (Okuda et al., 1998).

Pro- und antientzündliche Wirkweisen des IL-6-Systems werden in Modellen von entzündlichen Darmerkrankungen besonders deutlich. So wurden bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn pathologisch veränderte Konzentrationen verschiedener Zytokine, darunter auch erhöhte IL-6 und sIL-6R-Spiegel, nachgewiesen (Atreya et al., 2000). In SAMP1/Yit Mäusen, welche spontan eine Morbus Crohn-ähnliche Ileitis entwickeln, konnte nachgewiesen werden, dass IL-6-*trans-signaling* und die folgende STAT3 Aktivierung für diesen Prozess unabdingbar sind. Mäuse, bei denen das IL-6-*trans-signaling* durch Injektion von rekombinanten sgp130Fc unterbunden wurde, zeigten sich hierbei gegenüber der Entwicklung der Ileitis geschützt (Mitsuyama et al., 2006). Auch in Modellen von AOM (Azoxymethan)/DSS(Dextransulfat)- induziertem entzündlichen Darmkrebs konnte mit

Hilfe von rekombinantem sgp130Fc und anti-sIL-6R-Antikörpern gezeigt werden, dass die Entstehung entzündlicher Colon-Karzinome IL-6-*trans-signaling* bedarf (Becker et al., 2004; Matsumoto et al., 2010). Erstaunlicherweise zeigen IL-6^{-/-} Mäuse, welche mit DSS behandelt wurden, mehr Schäden des Verdauungstrakts als Wildtyp-Tiere. Grund ist die regenerative und antientzündliche Wirkung des klassischen IL-6-*signaling* auf Darmepithelzellen, die den membranständigen IL-6R exprimieren (Grivennikov et al., 2009). Sehr deutlich wird die Wichtigkeit dieser proliferativen Wirkweise auch in gentechnisch veränderten Mäusen, die extrem wenig ADAM-17 exprimieren. Hier führt der Verlust von wichtigen Faktoren, z.B. der Liganden für den EGF-R (*epidermal-growth-factor*) nach DSS-Behandlung zum Zusammenbruch der Darmbarriere mit massiver Infiltration von Immunzellen, und schließlich zu starkem Gewichtsverlust und Tod (Chalaris et al., 2010).

Diese Ergebnisse zeigen, wie vielversprechend die selektive Blockade des sIL-6R und damit des IL-6-*trans-signaling* zur Behandlung vieler entzündlicher Erkrankungen ist. Ein tieferes Verständnis für die Entstehung des sIL-6R ist notwendig und es gilt zu klären, von welchen Zelltypen und von welchen Proteasen die Freisetzung des sIL-6R abhängig ist.

1.2 Vom Monozyt zum Makrophagen

Am Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts gelang es Ilja Iljitsch Metschnikow erstmals, Phagozytose im Darmgewebe der Seeanemone zu beobachten und zu beschreiben (Karnovsky, 1981; Metschnikoff, 1891). Er prägte die Begriffe Makro- und Mikrophenen und erkannte die Bedeutung dieser Zellen für die Immunabwehr. Für diese richtungsweisenden Arbeiten wurde er 1908 zusammen mit Paul Ehrlich mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin gewürdigt und gilt als „Vater der natürlichen Immunität“ (Gordon, 2008).

Monozyten repräsentieren etwa 10% der im humanen Blut zirkulierenden Leukozyten. Sie können sowohl von natürlichen Killerzellen und neutrophilen Granulozyten als Zellen des angeborenen Immunsystems, als auch von den Vertretern des adaptiven Immunsystems - den T- und B-Lymphozyten - unterschieden werden. Sie stellen eine weit verbreitete heterogene Zellpopulation dar, deren Aufenthaltszeit im Blut durchschnittlich drei Tage beträgt (van Furth and Cohn, 1968). Nach Verlassen des Blutkreislaufs ersetzen sie dann nach spezifischen Differenzierungsprozessen einen Großteil der gewebsständigen Makrophagen und einigen dendritischen Zellen, besonders unter entzündlichen Bedingungen (Hume, 2006; Randolph et al., 1999). Im Menschen sind drei unterschiedliche Subpopulationen von Monozyten bekannt, welche anhand der Expression von CD14 und CD16 (FcγR-III) identifiziert werden können und unterschiedliche physiologische Funktionen aufweisen (Shen et al., 1983; Ziegler-Heitbrock et al.,

1991). Etwa 90% der im Blut zirkulierenden Monozyten sind positiv für CD14, aber CD16 negativ. Diese „klassischen“ Monozyten exprimieren darüber hinaus hohe Mengen des Chemokin-Rezeptors CCR2 und sind stark phagozytotisch aktiv. Nach LPS Stimulation werden von diesen eher antientzündliche Zytokine wie IL-10 produziert (Ziegler-Heitbrock et al., 1992). Die CD14⁺ und CD16⁺ Monozyten zeichnen sich durch hohe Expression des Fraktalkin-Rezeptors CX3CR1 aus, wirken entzündungsfördernd und wurden als Hauptquelle für TNF α identifiziert (Ancuta et al., 2003; Belge et al., 2002). Ihre Zahl ist bei Patienten mit akuten Infektionen und Infektionskrankheiten erhöht (Ancuta et al., 2004; Horelt et al., 2002). Eine kleine Population von Monozyten ist ebenfalls CD16⁺, exprimiert jedoch sehr geringe Mengen CD14. Wachstum und Differenzierung der Monozyten und Makrophagen wird vor allem durch das Zytokin hM-CSF (*macrophage - colony stimulating factor*) gesteuert (Bonifer and Hume, 2008). Dieses kommt ubiquitär im Organismus vor und wird von Endothel, Fibrozyten und Osteoblasten gebildet. Monozyten besitzen nicht nur auf Grund unterschiedlicher Subpopulationen ein sehr mannigfaltiges Differenzierungspotenzial und zeigen eine hohe Plastizität gegenüber der Umgebung, in der sie sich befinden. Die hohe Anzahl an verschiedenen Oberflächenrezeptoren ermöglicht es ihnen, Mikroorganismen, Lipide oder sterbende Zellen zu erkennen und zu phagozytieren (Mosser, 2003). So spielen sie eine wichtige Rolle in Wachstum und Homöostase des Organismus, räumen sie doch apoptotische Zellen ab und neutralisieren toxische Verbindungen (Nathan et al., 1983). Monozyten stellen einen großen Pool potenzieller Effektorzellen im Blutkreislauf dar und sind unter entzündlichen Bedingungen die Quelle einer großen Anzahl unterschiedlicher Zytokine und Effektormoleküle, wie TNF α (Tumor Nekrose Faktor), Prostaglandine, VEGF (*vascular endothelial growth factor*), IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, Stickstoffmonoxid und anderer reaktiver Sauerstoffspezies. Dabei ist die Produktion dieser Moleküle, von manchmal sogar gegensätzlicher Funktion, abhängig von unterschiedlichen stimulierenden Faktoren und der Ausdruck der Komplexität dieser Zellspezies (Mantovani et al., 2002). Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen stellen als Antigen-präsentierende Zellen das Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität dar und steuern die Immunantwort (Cao et al., 1989). Doch so effizient und wertvoll die Bedeutung der durch Monozyten und Makrophagen gesteuerten Immunabwehr ist, bergen entzündliche Prozesse ein hohes Risiko der Schädigung und Alterung betroffener Gewebe. Funktionsstörungen und alternative Aktivierungswege monozytärer Zellen sind an der Entstehung und Unterhaltung vieler Erkrankungen beteiligt. Dazu gehören u.a. entzündliche Erkrankungen, wie Atherosklerose, Rheumatoide Arthritis und entzündliche Darmerkrankungen (Auffray et al., 2009). Tumor-assoziierte Makrophagen infiltrieren Tumorgewebe und produzieren antientzündliche Botenstoffe, wie IL-10, TGF- β und andererseits angiogenetische Wachstumsfaktoren, wie VEGF

und FGF (*fibroblast growth factor*). Damit tragen sie zu einem Milieu bei, dass Tumorprogression fördert (Mantovani et al., 2002).

Die Funktionen von Monozyten und Makrophagen zu erforschen ist daher nützlich, um die Anfälligkeit des Organismus gegenüber Entzündungen zu verstehen und wichtiger noch, um einen Zugang und Kontrolle über die unerwünschten schadhaften Nebenwirkungen entzündlicher Prozesse zu erlangen.

1.3 Wichtige Proteasen der Zelloberfläche monozytärer Zellen

Umsatz der extrazellulären Matrix, Immunabwehr, Entzündung, Wundheilung, Blutgerinnung und Fibrinolyse sind einige der wichtigsten Funktionen von Leukozyten und gewebsständigen Zellen. Um diese Funktionen zu erfüllen, produzieren diese Zellen eine ganze Reihe von spezifischen Proteasen. Die Mechanismen der Regulation dieser Proteasen sind Gegenstand aktueller Forschung. Um Einfluss auf die unmittelbare Umgebung zu nehmen, z.B. durch Modifizierung der extrazellulären Matrix oder um Zellmembranrezeptoren wie den IL-6-Rezeptor zu spalten, sind viele dieser Proteasen auf der Zelloberfläche oder in Zelloberflächen-nahen Kompartimenten lokalisiert. Monozyten und Makrophagen in unterschiedlichen Differenzierungs- und Aktivierungszuständen unterscheiden sich teilweise erheblich in der Expression spezifischer Oberflächenproteasen (Mantovani et al., 2002; Martinez et al., 2006). So exprimieren Makrophagen beispielsweise unter physiologischen Bedingungen keine Serinproteasen (Dollery et al., 2003). Frisch isolierte Monozyten produzieren dagegen große Mengen an Matriptase und anderen Serinproteasen, wie neutrophile Elastase (NE), Cathepsin G (CG) oder Proteinase 3 (PR3) (Kilpatrick et al., 2006; Owen et al., 1994). Für die Freisetzung von IL-1 β und TNF α von THP-1 Zellen konnte bereits nachgewiesen werden, dass neben den „klassischen“ Konvertierungs-Enzymen auch die von neutrophilen Granulozyten freigegebenen Serinproteasen PR3 und NE einen signifikanten Anteil an der proteolytischen Umwandlung der membrangebundenen Vorgängermoleküle besitzen können (Coeshott et al., 1999). Nichtsdestotrotz ist die Freisetzung des sIL-6R und von TNF α hauptsächlich abhängig von der limitierten Proteolyse ihrer membrangebundenen Vorgängermoleküle durch ADAM-Proteasen, namentlich ADAM-17 und ADAM-10 (Matthews et al., 2003). Diese werden im Folgenden näher beleuchtet.

1.3.1 Metalloproteasen der *A Disintegrin And Metalloproteinase (ADAM)*- Klasse

Die Gruppe der ADAM-Proteasen umfasst im humanen Erbgut 21 Gene, wobei 13 dieser Gene für funktionelle Proteasen kodieren (Edwards et al., 2008). Zusammen mit den ADAM-TS-

Proteasen (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) gehören sie zur Metalloproteinase-Untergruppe der Adamalysine. Während die ADAM-TS-Proteasen extrazelluläre, lösliche Proteinasen darstellen, handelt es sich bei den ADAM-Proteinasen um Typ-1 Transmembranproteine (Seals and Courtneidge, 2003). Wie Matrix-Metalloproteasen besitzen auch ADAM-Proteinasen eine Multi-Domänen-Struktur bestehend aus einer Prodomäne, einer katalytischen (Metalloproteinase-) Domäne, einer Disintegrin-Domäne, einer Zystein-reichen Domäne, welche eine EGF-ähnliche Domäne enthält, einer Transmembran-Domäne und einer intrazellulär gelegenen zytoplasmatischen Domäne. ADAM-10 und -17 weichen in ihrer Struktur leicht von diesem Schema ab und besitzen anstatt einer Zystein-reichen Domäne eine sogenannte membranproximale Domäne (Dusterhoft et al., 2013). Obwohl alle ADAM-Proteinasen über eine Metalloproteinase-Domäne verfügen, besitzen nur ca. 50% das Zn^{2+} -Ion im katalytischen Zentrum (Seals and Courtneidge, 2003), für die letztlich auch eine proteolytische Aktivität vorausgesagt werden kann. Die Expression der ADAM-Proteasen in Säugetieren erstreckt sich über nahezu alle Gewebetypen, wobei in Leukozyten ADAM-8, -10, -15, -17 und -28 nachgewiesen werden können. Andere Vertreter der ADAM-Proteinasen nehmen Funktionen bei der Spermatogenese wahr (z.B. ADAM-2, -7, -18, -20, -21, -29, -30) oder kommen nur in Geweben des zentralen und peripheren Nervensystems vor (z.B. ADAM-11, -22, -23) (Edwards et al., 2008; Reiss and Saftig, 2009).

Für ADAM-10 und -17, wie auch für einige andere ADAM-Proteasen gilt, dass sie als Zymogene synthetisiert werden und die Prodomäne das Zn^{2+} -Ion im aktiven Zentrum über einen Zystein-Rest inaktiviert. Während des Transports zur Zelloberfläche wird die Prodomäne durch die Proprotein-Konvertase Furin im Trans-Golgi-Netzwerk entfernt und somit das aktive Zentrum der katalytischen Domäne freigegeben (Schlondorff et al., 2000). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Prodomäne als isoliertes Peptid als Inhibitor einiger ADAM-Proteasen wirken kann (so z.B. für ADAM-10 und -17) (Gonzales et al., 2004; Moss et al., 2007). Auch für andere Proteine, wie z.B. Rhomboide (z.B. iRhom2) oder Tetraspanine (z.B. Tspan15, Tspan29), konnten essenzielle Funktionen bei der Reifung und Kontrolle von ADAM-10 und -17 nachgewiesen werden (Gutierrez-Lopez et al., 2011; McIlwain et al., 2012; Prox et al., 2012). Die letztendliche Lokalisation der ADAM-Proteasen ist zum Großteil in intrazellulären Kompartimenten, während sich ein geringerer Teil maturer Proteine auf der Zellmembran befindet (Schlondorff et al., 2000).

Die biologische Aktivität der ADAM-Proteasen umfasst u.a. Funktionen in der Immunität, Zellteilung, Zellzyklus, Zellmigration, Angiogenese, des Herzens und des Nervensystems sowie der Befruchtung. Betont werden muss die Fähigkeit, Transmembranproteine proteolytisch zu

verarbeiten und deren Ektodomäne von der Zelloberfläche freizusetzen - ein Vorgang, der als *ectodomain shedding*, kurz *Shedding* bezeichnet wird. Dabei unterliegt eine große Bandbreite verschiedener Transmembranproteine dem *Shedding* durch ADAM-Proteasen, wobei es aber auch weitreichende Überlappungen in der Substratspezifität gibt (Reiss and Saftig, 2009).

Speziell für ADAM-17 sind bis heute weit über 70 Substrate entdeckt worden, darunter verschiedene Zytokine und Rezeptoren, sowie Zelladhäsionsmoleküle. Wichtige Substrate stellen z.B. TNF α , TGF α und andere EGF-R Agonisten oder der IL-6R dar (Reiss and Saftig, 2009). ADAM-17 wird in nahezu allen Geweben des Körpers exprimiert und ADAM-17-defiziente Mäuse sind nicht lebensfähig (Scheller et al., 2011). In der Vergangenheit konnten durch Maus-Modelle, in denen ADAM-17 gewebsspezifisch oder gesamtsystemisch herabreguliert war, wichtige Rückschlüsse auf die biologische Funktion von ADAM-17 gezogen werden. So ist z.B. die Regeneration des Darmepithels stark gestört in hypomorphen ADAM-17-Mäusen, in denen die ADAM-17-Expression artifiziell verändert wurde. Durch fehlende Stimulation des EGF-R sind diese Mäuse in Modellen entzündlicher Darmerkrankungen einer verstärkten Entzündungsantwort ausgesetzt (Chalaris et al., 2010). ADAM-17 schützt Hepatozyten vor Liganden-induzierter Apoptose; es schützt vor Osteoporose und seine erhöhte Aktivität ist in vielen Tumoren und chronisch entzündeten Geweben nachweisbar. Mäuse, deren Leukozyten kein ADAM-17 exprimieren, sind vor einer experimentellen Sepsis geschützt, was mit der fehlenden TNF α -Aktivität erklärt wird (Scheller et al., 2011). Diese Erkenntnisse spiegeln die außerordentliche Wichtigkeit von ADAM-17 einerseits für entzündliche Prozesse und andererseits für die Regulation von Zellüberleben, Differenzierung und Regeneration wieder.

Wichtige bekannte Aktivatoren von ADAM-17 sind u.a. PMA (*4 β -Phorbol-12-Myristate-13-Acetat*) und bakterielle Toxine. Induktion von Apoptose und der Entzug von Cholesterin aus der Zelle führen zu einer verstärkten ADAM-17-Aktivität. Stimulation von purinergen Rezeptoren, wie P2X7 und folgender Ca²⁺ Einstrom hat ebenfalls eine starke Aktivierung von ADAM-17 zur Folge (Chalaris et al., 2007; Chanthaphavong et al., 2012; Jones et al., 1998; Matthews et al., 2003; Qu and Dubyak, 2009). Insgesamt ist über die Regulation von ADAM-17 jedoch wenig bekannt. Es wird angenommen, dass ADAM-17 auf unstimulierten Zellen überwiegend dimerisiert vorliegt, wobei es effizient durch TIMP3 (*tissue inhibitor of metalloproteinase*) gehemmt wird. Nach Phosphorylierung des Threonin735-Rests von ADAM-17 durch MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinasen wie z.B. p38 und ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) mit folgender Monomerisierung wird die Bindung von TIMP3 aufgehoben und die Aktivität erhöht (Xu et al., 2012). Diese Phosphorylierung soll auch unabdingbar bei dem Transport von ADAM-17 gen Zelloberfläche sein (Soond et al., 2005).

Inhibiert wird ADAM-17 wie beschrieben natürlicherweise von TIMP3. Weitere, besonders im Folgenden wichtige spezifische und unspezifische Inhibitoren sind der Breitspektrum-Metalloproteaseinhibitor Marimastat, GW208264X, GI254023X (wobei ADAM-10 ca. 100-fach effizienter inhibiert wird) oder der rekombinante inhibitorische AK D1(A12) (2003; Ludwig et al., 2005; Tape et al., 2011).

1.3.2 Serinproteasen: Cathepsin G (CG), Proteinase3 (PR3), neutrophile Elastase (NE), Matriptase

Bei CG, PR3 und NE handelt es sich um stark kationische Glykoproteine von ca. 200 AS Länge (Pham, 2006). Sie befinden sich sowohl löslich in azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten und Monozyten, als auch in geringeren Mengen membrangebunden auf deren Zelloberfläche. Bei neutrophilen Granulozyten können bakterielle Toxine, Zytokine und andere Stimulanzen eine Steigerung dieser Zelloberflächen-gebundenen Serinproteasen um das 6 bis 20-fache bewirken (Owen et al., 1995). Eine genaue Charakterisierung der Oberflächenexpression von Serinproteasen von unterschiedlichen Monozyten-Subpopulationen und in unterschiedlichen Aktivierungszuständen hat noch nicht stattgefunden. In ihrem löslichen Zustand sind PR3, CG und NE in der Lage, Bakterien zu eliminieren, einige Zelltypen mit entsprechenden Oberflächenrezeptoren zu aktivieren und diverse Proteine zu spalten, wie z.B. Komponenten der extrazellulären Matrix, Entzündungsmediatoren (z.B. IL1 β und TNF α) und Zelloberflächen-Rezeptoren (Pham, 2006). Das Wirkspektrum der membrangebundenen Formen ist sehr ähnlich. Auf Monozyten spielen NE und CG eine wichtige Rolle bei Koagulationsprozessen. Ihre Aktivität führt zu Becherzell-Degranulation. Außerdem ist membrangebundenes CG in der Lage, Angiotensin I zu Angiotensin II zu konvertieren (Owen, 2008). Der wichtigste Unterschied jedoch besteht darin, dass die membrangebundenen Formen dieser Serinproteasen nicht durch ubiquitär vorkommende physiologische Inhibitoren, wie α 1-Proteinaseinhibitor und α 1-Antichymotrypsin, inhibiert werden können (Owen, 2008). Weitere wichtige physiologische Inhibitoren dieser Serinproteasen sind das von Epithelzellen gebildete Elafin und SLPI (sekretorischer Leukozyten-Proteinase Inhibitor) sowie α 2-Makroglobulin (Kramps et al., 1991; Wiedow et al., 1990) und das synthetische Sulfonylfluorid AEBSF (4-(2-Aminoethyl)BenzenSulfonylFluorid).

Bei Matriptase handelt es sich um eine membrangebundene Serinprotease, bestehend aus zwei Ketten von einer Größe von 80-90 kDa. Mittlerweile konnte es außer in malignen Epithelzellen auch in Monozyten und B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Es wird in frisch isolierten Monozyten und THP-1 Zellen hochgradig exprimiert, während es in U937 Zellen nicht

nachgewiesen werden kann (Kilpatrick et al., 2006). Über seine biologische Funktion ist noch wenig bekannt, jedoch soll es eine Rolle bei der Entstehung von Plasmin auf der Zelloberfläche von Monozyten spielen. In atherosklerotischen Läsionen wird es in hohem Maße von Monozyten gebildet und trägt über die gesteigerte Freisetzung von Entzündungsmediatoren zur Aufrechterhaltung dieser Läsionen bei. Sein Haupt-Inhibitor ist HAI (Hepatozyten Wachstumsfaktor-Aktivator Inhibitor), ein Kunitz-Typ Inhibitor (Owen, 2008).

1.4 Problemstellung

IL-6-*trans-signaling* spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf häufiger entzündlicher Erkrankungen, wie z.B. Rheumatoider Arthritis oder den entzündlichen Darmerkrankungen. Auch in einigen Krebsformen konnte eine Beteiligung dieses Signalwegs an Tumorbildung und -wachstum nachgewiesen werden (Chalaris et al., 2011). Im Zentrum dieser Vorgänge steht die Entstehung des sIL-6R. Das Verständnis dafür, was zu seiner Freisetzung führt und wie diese funktioniert, ist unerlässlich. Es gilt, therapeutische Ansätze zu finden und zu realisieren, die es ermöglichen, eine ganze Reihe an Erkrankungen zu behandeln, die zu den häufigsten unserer Gesellschaft gehören. Dabei liegt es nahe, jene Zelltypen zu untersuchen, welche ebenfalls enorme Bedeutung bei der Entstehung und dem Verlauf der genannten Erkrankungen besitzen. Frühere Untersuchungen hatten häufig Systeme zur Grundlage, in denen entweder der humane IL-6R und/oder bekannte proteolytische Enzyme wie ADAM-10 und ADAM-17 künstlich in die zu untersuchenden Zellen eingebracht wurden.

In dieser Arbeit soll gezeigt werden, welche Proteinasen natürlicherweise an der Freisetzung des sIL-6R durch humane monozytäre Zellen beteiligt sind. Darüber hinaus soll festgestellt werden, ob und inwiefern der Differenzierungsprozess, dem diese Zellen unterliegen, Einfluss auf die Fähigkeit der Monozyten und Makrophagen hat, den sIL-6R zu bilden.

2 Material

Im Folgenden werden die der Arbeit zu Grunde liegenden Chemikalien und andere Materialien beschrieben.

2.1 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
4 β -Phorbol-12-Myristate-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
AEBSF	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxiddisulfat	Biozym, Hess, Oldendorf
Ampicillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
BM blue, lösliches POD-Substrat	Roche Diagnostics, Mannheim
Bromophenolblau	Fluka Chemika, Buchs, Schweiz
BSA Fraction V ph 7.0	PAA GmbH, Pasching, Österreich
BzATP	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Complete Proteaseinhibitor Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim
Concanavalin A Sepharose®-Konjugat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Thermo Scientific, Waltham, USA
DMSO Rotipuran®	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Elafin	PD Dr.Dr. Meyer Hoffert, UKSH, Kiel
Ethanol Rotipuran®	Roth, Karlsruhe
Ethanol, vergällt mit 1% Petrolether	Walter CMP, Kiel
Ficoll, Histopaque 1077	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Fötale Kälberserum	PAA GmbH, Pasching, Österreich
GI 254023	IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin Pufferan®	Roth, Karlsruhe
Guanidin-Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
GW208264X	IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz
Hyper IL-6	AG Grötzinger, CAU, Kiel
Isopropanol Rotipuran®	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Marimastat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
MEM Nichtessentielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Methanol	Walter CMP, Kiel
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe

Natriumpyruvat	Roth, Karlsruhe
NP40	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	PAA GmbH, Pasching, Österreich
Peressigsäure	AppliChem, Darmstadt
Rekombinantes, humanes M-CSF	Immunotools, Friesoythe
Rotiphorese® Acrylamid Lsg.	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Walter CMP, Kiel
Schwefelsäure Rotipuran®	Roth, Karlsruhe
SDS Pellets	Roth, Karlsruhe
SLPI	R&D Systems, Minneapolis, USA
Supersignal® West Femto Substrate	Thermo Scientific, Waltham, USA
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris Pufferan®	Roth, Karlsruhe
TritonX-100	Roth, Karlsruhe
Tween®	Roth, Karlsruhe

2.2 Puffer und Medien

10x PBS

81,82 g NaCl
2,01 g KCl
14,20 g Na₂HPO₄
2,45 g KH₂PO₄

10x SDS-PAGE Laufpuffer

144 g Glycin
30 g Tris
10 g SDS
add 1000ml ddH₂O

10x Transferpuffer

30,3 g Tris
144,1 g Glycin
add 1000ml ddH₂O

1x Transferpuffer

100 ml 10x Transferpuffer
200 ml Methanol
add 1000ml ddH₂O

10% Trenngel

3,87 ml H₂O
2,55 ml 1,5 M Tris/HCl oH 8,8
100 µl 10% SDS
3,33 ml Polyacrylamid
100 µl 10% APS
10 µl TEMED

4% Sammelgel

1,86 ml H₂O
312 µl 0,5 M Tris/HCl oH 8,8
25 µl 10% SDS
335 µl Polyacrylamid
25 µl 10% APS
5 µl TEMED

4x Lämmli-puffer

10,00 ml 1M Tris ph 6,8
3,20g SDS
8,00ml 2-Mercaptoethanol
20,16mg Glycerol
ad 40,00ml ddH₂O
5,00 mg Bromphenplblau

10x TBS

12,1 g Tris
 87,6 g NaCl₂
 add 1000ml ddH₂O

TBS-T

100 ml 10x TBS
 500 µl Tween 20
 add 1000 ml ddH₂O

6% Milchpulver in TBS-T

100 ml TBS-T
 6g Magermilchpulver

10% APS

1 g APS
 10 ml ddH₂O

Einfrüermedium

90% Kulturmedium
 10% DMSO

Puffer PBMC-Isolation

PBS ph 7,2
 2mM EDTA

MACS® Puffer

PBS ph 7,2
 2mM EDTA
 0,5% BSA

Zellysispuffer

50 mM Tris/HCl
 150 mM NaCl
 2 mM EDTA
 1 % NP-40
 1 % Triton X-100
 1 Complete Tablette/50ml

FACS-Puffer

1 % BSA
 PBS

Kulturmedium primäre Monozyten

RPMI 1680
 10% FCS
 1% Natriumpyruvat
 1%NEAS
 2mM L-Glutamin
 1% Penicillin/Streptomycin

Kulturmedium THP-1 /U937

RPMI 1680
 10% FCS
 1% Penicillin/Streptomycin

Stimulationsmedium

RPMI 1680
 1 % BSA

2.3 Größenmarker, Enzyme und Enzypuffer

Accutase
 FastAP™
 PageRuler Plus™
 Prestained Protein Marker™
 Trypsin-EDTA
 Streptavidin-POD Konjugat

PAA GmbH, Pasching, Österreich
 Fermentas, St.Leon-Rot
 Fermentas, St.Leon-Rot
 Fermentas, St.Leon-Rot
 PAA GmbH, Pasching, Österreich
 Roche, Mannheim

2.4 Antikörper

Maus anti-hIL-6R AK 4-11	(Chalaris et al., 2007)
Maus anti-ADAM-17 AK A300	(Trad et al., 2011)
biotinylierter Ziege anti-hIL-6R AK Baf227	R&D Systems Minneapolis, USA
HRP konjugierter Ziege anti-Maus IgG AK	Thermo Scientific, Waltham, USA
biotinylierter Ziege anti-TNF α AK	R&D Systems Minneapolis, USA
Maus anti-TNF α AK	R&D Systems Minneapolis, USA
FITC konjugierter Maus anti-hTACE AK	R&D Systems Minneapolis, USA
FITC konjugierter Maus IgG ₁ Isotyp Kontrolle	R&D Systems Minneapolis, USA
FITC konjugierter Maus anti-hCD14 AK	BD Biosciences, San Jose, USA
APC konjugierter Ratte Anti-Maus IgG ₁ AK	ebioscience Inc. San Diego, USA
PE konjugierter Maus anti-hCD14	R&D Systems Minneapolis, USA
MicroBead konjugierter Maus anti-hCD14 AK	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
anti hADAM-17 IgG AK D1(A12)	(Tape et al., 2011)

2.5 Zelllinien

THP-1	DMSZ, Braunschweig
U937	DMSZ, Braunschweig

2.6 Kits

BCA Protein Assay Kit Pierce®	Thermo Scientific, Waltham, USA
MACS CD14 Microbead Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Human TNF-alpha DuoSet®	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.7 Verbrauchsmaterialien

96-Loch Mikrotiterplatte nunc™ Multisorp	Thermo Scientific, Roskilde, Dänemark
96-Loch-Platte flat/round bottom	Sarstedt, Nümbrecht
Aluminiumfolie	Roth, Karlsruhe
MACS LS-Säulen	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Multi-Adapter für S-Monovette®	Sarstedt, Nümbrecht
Multifly® Nadel	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm	Bemis, Neenah, USA
PVDF-Transfermembran Immobilon-P®	Merk Millipore, Billerica, USA
Reaktionsgefäße 1,5 ml/ 2 ml/ 15ml/ 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Scott-Flaschen 100ml/ 250ml/ 500ml/ 1000ml	Schott, Mainz
Serologische Pipetten 5ml/ 10ml	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovette® EDTA K ₂ -gel	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman Papier	Roth, Karlsruhe
Zählkammer Cellometer®	Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA

Zellkulturflaschen T75
Zellkulturplatten Cellstar®

Sarstedt, Nümbrecht
Greiner bio-one, Frickenhausen

2.8 Geräte

Autoklav	HAST 4-5-6	Arbus Technology, Bad Grund
Blot Imaging	FluorChemQ®	CellBiosciences, Santa Clara, USA
Blotter, Semi-Dry	Trans-Blot SD	Bio-Rad München
Durchflusszytometer	FACS Canto	BD Biosciences, San Jose, USA
Einfrierkarussell	Frosty-Box-18	Kister Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurth
Inkubatoren	WTB binder	WTB binder Tuttlingen
Inkubatoren	Hera Cell	Thermo Scientific, Waltham, USA
Inkubatoren	US AutoFlow	Nuaire, Plymouth, USA
Laborschüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Laborwaage	Kern EW	Kern & Sohn GmbH, Balingen
MACS	Multi Stand	Miltenyi Biotech, Bergisch Gledbach
	QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotech, Bergisch Gledbach
Mikroskop	Telaval 31	Zeiss, Jena
ph-Meter	776 Calimatic®	Knick, Berlin
Photometer	SLT Rainbow	Tecan, Maennedorf, Schweiz
Real-Time PCR System	LightCycler 480 II	Roche, Grenzach
Reinstwasseranlage	Milli Q-Plus	Millipore; Massachusetts, USA
SDS-PAGE Zubehör		Bio-Rad München
Spannungsgeber	Power Pac 300, Basic	Bio-Rad München
Zellzähler	Cellometer® Auto T4	Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA
Zentrifugen	5415 R	Eppendorf, Hamburg
	5417 R	Eppendorf, Hamburg
	Function line Labofuge	Heraeus, Hanau
	Jouan CR3i	DJB Labcare Ltd, Newport, UK
	Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
	Multifuge 3 SR	Heraeus, Hanau

3 Methoden

Im Folgenden werden die der Arbeit zu Grunde liegenden Methoden beschrieben.

3.1 Isolation primärer humaner Monozyten aus Blut

3.1.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte von drei unterschiedlichen gesunden Donoren mit Hilfe des Sarstedt S-Monovetten®-Systems.

3.1.2 Isolation der mononukleären Zellfraktion mittels eines Ficoll® Gradienten

Die Isolation der mononukleären Zellfraktion (*periphery blood mononuclear cell*, PBMC) fand nach dem Protokoll „Isolation of mononuclear cells from peripheral blood by density gradient centrifugation“ von Miltenyi Biotech statt. Abweichend wurde statt Ficoll-paque™ Histopaque 1077 verwendet. Dazu wurde das Blut aus zwei Sarstedt S-Monovetten® auf ein Gesamtvolumen von 35ml mit Puffer für die PBMC-Isolation aufgefüllt, was ungefähr einer Verdünnung von 1:2 entsprach. Die verdünnte Blutprobe wurde vorsichtig in ein 50ml Reaktionsgefäß übertragen, indem es auf einen bereits vorgelegten Spiegel von 15ml Histopaque 1077 aufgebracht wurde. Dabei wurde darauf geachtet, dass es zu keiner Durchmischung beider Flüssigkeiten unterschiedlicher Dichte kam. Nach Zentrifugation bei 400g für 30 min bei abgestellter Bremse wurde der Gradient entnommen und der Serumanteil verworfen. Der entstandene ringförmige Anteil zwischen Serum und Ficoll®, der die PBMC Fraktion darstellte, wurde mit Hilfe einer Pipette entnommen und mehreren Waschschrinen mit Isolationspuffer unterzogen, um den Anteil an Thrombozyten bestmöglich zu verringern. Nach Aufnahme der PBMC-Fraktion in MACS® Puffer wurde umgehend mit dem Aufreinigen der primären Monozyten begonnen.

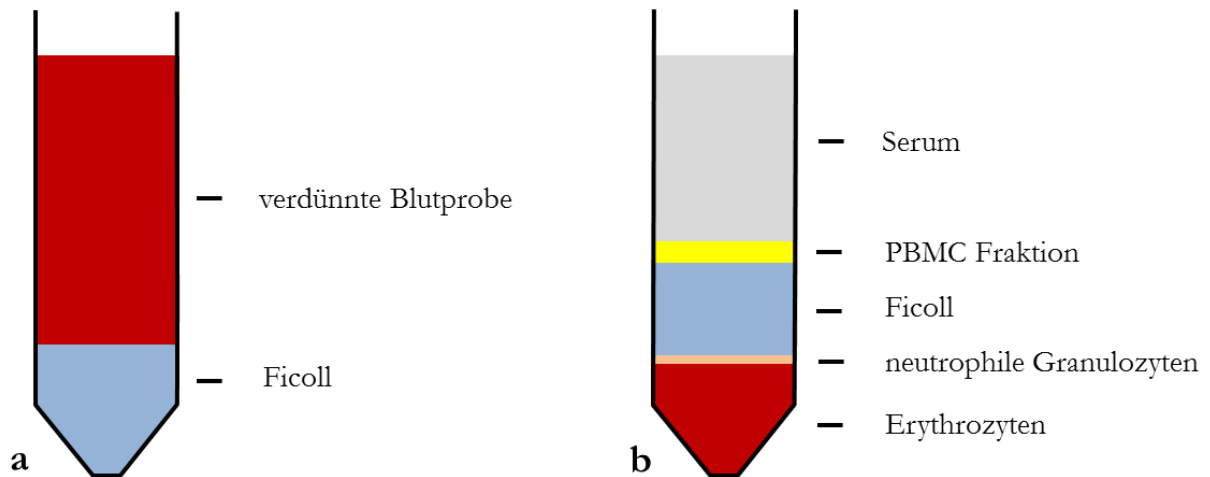


Abbildung 3.1 Der Ficoll® Gradient vor und nach Zentrifugation. (a) Die Blutprobe wurde auf 35 ml mit Isolationspuffer aufgefüllt und vorsichtig mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette auf 15 ml Histopaque 1077 aufgebracht, um eine Durchmischung beider Komponenten zu verhindern. (b) Nach 30 minütiger Zentrifugation stellt sich ein fünfschichtiger Gradient dar. In der Reihenfolge zunehmender Dichte trennen sich der Thrombozyten-enthaltende Serum-Anteil vom Anteil der peripheren mononukleären Zellen, also Monozyten, T- und B-Lymphozyten und periphere dendritische Zellen. Zwischen der Lage der Erythrozyten und dem Ficoll befindet sich eine dünne Lage, die die neutrophilen Granulozyten darstellt.

3.1.3 Magnetic Activated Cell Sorting - MACS®

Das Aufreinigen der primären Monozyten aus der mononukleären Zellfraktion mittels einer positiven Selektion geschah nach dem Arbeitsprotokoll „CD14 MicroBeads“ von Miltenyi Biotech. Es wurden LS Säulen (Produktname) benutzt. Das Prinzip basiert auf einer Markierung der Zellen mit magnetischen Nanopartikeln, welche an bestimmte Antikörper gekoppelt sind. Die Spezifität dieser Antikörper für ein bestimmtes Oberflächenprotein führt zur selektiven Markierung der gewünschten Zielzellpopulation. Um aus den separierten PBMCs monozytäre Zellen zu selektieren, wurde das Oberflächenprotein CD14 gewählt. CD14 bildet zusammen mit dem TLR4 (*toll-like receptor 4*) und dem Lymphozyten-Antigen 96 den Lipopolisaccharid-Rezeptorkomplex und wird vor allem von Monozyten und Makrophagen und in geringem Maße von dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten exprimiert. Die Zellsuspension wird auf eine Säule aufgebracht, welche mit ferromagnetischen Partikeln gefüllt ist. Diese mit einer zellfreundlichen Beschichtung versehenen Sphären potenzieren das magnetische Feld, in das die Säule gesetzt wird. Dieses Magnetfeld sorgt für das Festhalten der markierten Zellen in der Säule bei gleichzeitigem Durchfluss aller nichtmarkierten Zellen. Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld kann die markierte Zellpopulation eluiert werden. Der Erfolg der Isolation CD14⁺ Zellen wurde über eine durchflusszytometrische Untersuchung unter Verwendung eines PE gekoppelten anti-human CD14 Antikörpers aus der Maus (siehe 2.4) validiert.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der monozytären Zelllinien THP-1 und U937 erfolgte in T75 Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂. Das Kulturmedium wurde regelmäßig mindestens alle 3 Tage gewechselt und es wurde darauf geachtet, dass die Zellzahl nicht über 10⁶ Zellen/ml anstieg. Dazu wurden 20µl der Zellsuspension entnommen und in eine Cellometer®-Zählkammer übertragen, mit deren Hilfe eine Zählung im Cellometer® Auto T4 durchgeführt wurde. Nach Zentrifugation der Zellen bei 1200 U/min für 5min und Entfernung des Kulturmediums durch Absaugen wurden die Zellen mit einer Dichte von ca. 3x10⁵ ausgesät. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt, die vor und nach Benutzung durch Wischdesinfektion desinfiziert wurde. Arbeitsmittel der Zellkultur wurden ebenfalls vor und nach Benutzung desinfiziert, Absauganlagen mit 70% Ethanol gespült. Eine eventuelle Mykoplasmenkontamination konnte durch regelmäßige Kontrollen ausgeschlossen werden.

3.2.2 Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen

Im Folgenden wird das Vorgehen bei der Differenzierung von monozytären Zellen zu den Makrophagen-ähnlichen Zellen beschrieben.

3.2.2.1 THP-1 und U937

Die Differenzierung von monozytären Zelllinien, wie z.B. THP-1 und U937 Monozyten zu einem Makrophagen-ähnlichen Phänotyp, wird standardmäßig mit 4β-Phorbol-12-Myristate-13-Acetat (PMA) induziert (Baek et al., 2009; Daigneault et al., 2010; Murao et al., 1983). Dazu wurden die Zellen wie in 3.2.1 beschrieben pelletiert und in einer Dichte von ca. 8x10⁵ Zellen/ml in Zellkulturschalen ausgesät. Durch Zugabe von PMA in einer Endkonzentration von 50 nM (THP-1) bzw. 100 nM (U937) zum Kulturmedium wurde die Differenzierung induziert, wobei beide Zelllinien dem Stimulus über drei Tage ausgesetzt wurden. Nach diesen drei Tagen wurden die nun adhärennten Zellen nach Absaugen des Kulturmediums dreimal mit sterilem PBS gewaschen und mit neuem Medium versorgt. Zur Erlangung eines ausgeprägten Makrophagen-ähnlichen Phänotyps wurden beide Zelllinien noch sieben Tage unter regelmäßigem Medium-Wechsel kultiviert. Die Weiterverarbeitung der Zellen, z.B. durch Stimulation oder Lysatherstellung, fand also insgesamt mindestens zehn Tage nach Induktion der Differenzierung statt.

3.2.2.2 Primäre Monozyten

Mittels humanem Makrophagen-Kolonie stimulierendem Faktor (*human macrophage colony stimulating factor*, hM-CSF) lässt sich die Differenzierung primärer Monozyten zu Makrophagen *in vitro* induzieren (Dong et al., 2013; Geissmann et al., 2010). Nach erfolgreicher Isolation der primären Monozyten aus Blut mittels des MACS® Systems wurden die Zellen entweder direkt stimuliert und weiterverarbeitet, oder in einer Konzentration von etwa 8×10^5 Zellen/ml in 10ml Kulturmedium für primäre Monozyten in einer Zellkulturschale ausgesät. Durch Zugabe von hM-CSF in einer Endkonzentration von 100 ng/ml wurde die Differenzierung zu Makrophagen induziert. Das Kulturmedium wurde nach fünf Tagen Inkubation im Brutschrank erneuert und die Zellen für weitere fünf Tage im Brutschrank gelagert. Weitere Experimente, wie z.B. Stimulationsversuche oder Durchflusszytometrie, fanden somit mindestens zehn Tage nach Induktion der Differenzierung statt.

3.2.3 Kryokonservierung der Zellen

In der Zellkultur sollte, wenn immer möglich, mit Zelllinien gearbeitet werden, welche wenig Passagen aufweisen und nicht mit heterogenen Zellen, Bakterien oder Pilzen kontaminiert sein sollten. Dazu wurden von den Zelllinien bei möglichst niedriger Passagenzahl Reservealiquote durch Kryokonservierung angelegt. Dafür wurden die Zellen, wie in 3.2.1 beschrieben pelletiert und in einer Konzentration von ca. 8×10^5 Zellen/ml in 1,5 ml Einfriermedium (Kulturmedium + 10% DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Nach adäquater Beschriftung wurden die Aliquote über Nacht in einem Isopropanol-enthaltendem Einfrierkarussell bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Die dauerhafte Lagerung des Zellmaterials fand bei $-150\text{ }^\circ\text{C}$ statt. Bei Bedarf erfolgte das Auftauen zügig mit schrittweiser Resuspendierung in 15 ml auf $37\text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmten Kulturmedium. Nach Pelletierung wurden die Zellen erneut in Kulturmedium aufgenommen und in T-75 Zellkulturflaschen bzw. Zellkulturschalen überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte, wie unter 3.2.1 beschrieben.

3.2.4 Stimulation der Zellen

Stimulationsversuche stellen eine zentrale Methode dieser Dissertation dar. Ziel ist es, physiologische Einflüsse auf die Monozyten und Makrophagen durch gewisse Stimulantien zu simulieren und das Verhalten der Zelle auf biochemischer Ebene durch verschiedenste Methoden zu analysieren. Spezifische Inhibitoren sind dabei wichtig, um die limitierte Proteolyse zu betrachtender Proteine, wie z.B. des hIL-6R, bestimmten dafür verantwortlichen Proteasen

zuordnen zu können. Alle verwendeten Stimuli und Inhibitoren mit dazugehörigen Konzentrationen sind in Tabelle 3.1.4 aufgeführt.

Tabelle 1 Stimuli und Inhibitoren

Stimulans	Endkonzentration	Inkubationszeit	
PMA	100 nM	60 min THP-1/U937	
		120 min primäre Zellen	
BzATP	500 µM	20 min	
LPS	1 µg/ml	120 min	
Inhibitor		Präinkubationszeit	Zielprotease
Marimastat	3 µM	20-30 min	Metalloproteasen
GI254023X	3 µM	20-30 min	ADAM-10
GW208264X	3 µM	20-30 min	ADAM-17; ADAM-10
anti hADAM-17 <i>D1(A12)</i>	100 nM	20-30 min	ADAM-17
AEBSF	250 µM	20-30 min	Serinproteasen
SLPI	2,5 µM	20-30 min	Cathepsin G; NE
Elafin	20 µg/ml	20-30 min	Protease 3; NE

Suspensionszellen und adhärenente Zellen wurden vor der Stimulation unterschiedlich vorbehandelt. Die Stimulation fand in 24-Loch Zellkulturschalen statt. Suspensionszellen wurden, wie unter 3.2.1 beschrieben pelletiert und nach einmaliger Wäsche in sterilem PBS in Stimulationsmedium für 30-60min aufgenommen, gezählt und unmittelbar vor der Stimulation in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in 200 µl Stimulationsmedium pro Ansatz ausgesät. Primäre, direkt vor der Stimulation wie in 3.1 beschrieben isolierte Monozyten wurden sofort in Stimulationsmedium aufgenommen. Adhärenente Zellen wurden zwei Tage vor Stimulation mit Hilfe von Akkutase 10-20min von ihrer Unterlage abgelöst, pelletiert und in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen pro Ansatz in 1 ml Kulturmedium ausgesät. Am Tage der Stimulation wurde das Kulturmedium abgesaugt und die wieder adhärenierten Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen. Danach inkubierte man die adhärenenten Zellen für 30-60 min in 0,5-1 ml Stimulationsmedium, welches dann unmittelbar vor Stimulation durch 200 µl Stimulationsmedium erneuert wurde. Um eine adäquate Hemmung der Proteasen zu erzielen, wurde mit den spezifischen Inhibitoren eine Präinkubation durchgeführt, nach welcher dann der Stimulus hinzugefügt wurde. Auf Grund der hohen endogenen IL-6R-Expression der THP-1 Zellen (Jones et al., 1998) und der U937 Zellen (Nakajima et al., 1992) wurde für diese eine etwas kürzere PMA-Inkubationszeit von 60 min festgelegt. Nach abgeschlossener Inkubationszeit im Brutschrank wurden die 24-Loch Zellkulturplatten bei 1200 U/min für 5 min und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden je in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und für 1 min

bei 12000 U/min zentrifugiert, um enthaltene Zellen und Detritus zu entfernen. Der so entstandene Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und bei -20 °C bis zur Durchführung des ELISA eingefroren. Die in der 24-Loch Zellkulturplatte zurückgebliebenen Suspensions- bzw. adhärennten Zellen wurden entweder verworfen, zur Herstellung von Lysaten herangezogen oder im Durchflusszytometer weitergehend analysiert. Ernte und Lysatherstellung erfolgte, wie in 3.2.5 beschrieben.

3.2.5 Ernte der Zellen und Herstellen von Lysaten

Die Ernte der Zellen erfolgte bei den Suspensionszellen durch Pelletieren bei 1200 U/min in einem 50 ml Reaktionsgefäß. Es folgte ein Waschschrift mit sterilem PBS. Adhärennte Zellen wurden noch in der Zellkulturschale mit sterilem PBS gewaschen und mit einem Zellschaber abgelöst und ebenfalls bei 1200 U/min in einem 50 ml Reaktionsgefäß pelletiert. Die gewonnenen Zellpellets wurden je nach Größe in 200-500 µl 4 °C kaltem Lysis-Puffer + 3 µM Marimastat resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße übertragen. Die Lysate wurden für 1-2 h bei 4 °C auf dem Rollermixer inkubiert und anschließend für 12000 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde von den pelletierten Detritus abgenommen und bei -20 °C eingefroren. Es folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration, wie in 3.8 beschrieben. Um eine Anreicherung glykosylierter Proteine, wie z.B. ADAM-10/-17 oder des IL-6R, zu erreichen, wurden die gewonnenen Lysate mit Concanavalin-A konjugierter Sepharose® behandelt. Concanavalin-A ist ein Speicherprotein der Jack Bohne (*Canavalia ensiformis*) und gehört zur Gruppe der Lektine. Es bindet vorrangig terminale α -D-Mannosereste und andere strukturverwandte Zucker (Goldstein et al., 1965). Dazu wurde nach Bestimmung der Proteinkonzentration eine Menge von 400 µg Protein mit 50 µl Concanavalin A-Sepharose® in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß über Nacht bei 4°C auf dem Rollermixer inkubiert. Danach wurde die Sepharose® standardmäßig bei 3000 g für 7min pelletiert, der Überstand entfernt und mit 1 ml sterilem PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde die gesamte Restflüssigkeit mit einer Mikroliterspritze abgenommen und die Probe mit 50 µl 4x Lämmli-Probenpuffer für 20 min bei 95 °C aufgeköcht. Der nach erneuter Zentrifugation gewonnene Überstand wurde entweder sofort auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (SDS-PAGE, 3.4), oder in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren.

3.3 qRT-PCR

Um die Expression bestimmter Proteine auch auf RNA-Ebene nachweisen zu können, wurde eine Echtzeit quantitative reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (*real time quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, qRT-PCR) durchgeführt. Diese bestand aus

mehreren Teilen: der RNA Isolation, der cDNA Synthese und der eigentlichen qPCR. Die Isolation der RNA aus den Zellpellets der primären Monozyten/Makrophagen fand nach Protokoll des GeneJET RNA Purification Kit von Fermentas statt. Anschließend erfolgte die cDNA Synthese. Dazu wurden 500 ng der gewonnenen RNA mit 1 µl Random Hexamer und 12,5 µl DEPC-H₂O für 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach der Anlagerung der Primer (Konzentration 2 µM) erfolgte die reverse Transkription. Die Inkubation erfolgte in drei Schritten von 10 min bei 25 °C über 60 min bei 42 °C bis 10 min bei 70 °C. Die cDNA wurde bei -20 °C bis zur Weiterverwendung eingefroren, ihr Gesamtvolumen betrug ca. 20 µl/Probe. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes gestaltete sich wie folgt:

RNA/Random Hexamer Gemisch
 4 µl 5x Reactionbuffer
 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor
 2 µl dNTP's
 1 µl RevertAid H Minus Reverse Transkriptase

Mit der synthetisierten cDNA erfolgte nun die Echtzeit PCR. Als endogene Kontrolle diente GAPDH. Insgesamt fanden 40 Zyklen statt. Sowohl für ADAM-17 als auch für GAPDH wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Zusammensetzung des PCR Ansatzes und das Programm des LightCycler war wie folgt:

Tabelle 2 PCR Zyklusprogramm

5 µl Maxima SYBR green qPCR Master Mix (2x)	50 °C	120 sec (nur beim ersten Durchgang)
0,5 µl Primermix (2 µM)	95 °C	15 sec (beim ersten Durchgang 600 sec)
3,5 µl Nukleasefreies H ₂ O	60 °C	30 sec
1 µl cDNA (200 ng)	72 °C	30 sec
	40 °C	30 sec (nur beim letzten Durchgang)

Die Berechnung der mRNA Expression erfolgte schließlich auf Grundlage der Delta Delta-CP (= *Crossing Point*) Methode, wie beschrieben (Livak and Schmittgen, 2001).

3.4 SDS-PAGE

Zur Analyse der zu untersuchenden Proteine aus Zelllysaten und Zellüberständen wurde die Standardmethode der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) angewandt. Es wurden diskontinuierliche Gele verwendet, d.h. dem Trenngel wurde ein Sammelgel vorgeschaltet, damit das Proteingemisch vor dem Eintritt in das Trenngel an einem Startpunkt konzentriert vorlag. Die Zusammensetzung der Gele ist Abschnitt 2.2 zu entnehmen

und es wurden ausschließlich Gele mit 1,5 mm Dicke und 10 Taschen verwendet. Die ausgehärteten Gele wurden in die Elektrophoresekammern überführt, welche mit 1x SDS-Laufpuffer aufgefüllt wurden. Nach Auftragen der Proben und des Proteinmarkers wurde eine Spannung von 180 V für 60-90 min angelegt. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Acrylamidgele aus der Elektrophoresekammer deinstalliert, das Sammelgel und die nicht proteintragenden Anteile beschnitten. Die Weiterverarbeitung erfolgte im Western Blot.

3.5 Western Blot

Zur Identifikation bestimmter Proteine, die zuvor im SDS-PAGE Verfahren aufgetrennt wurden, kamen zwei unterschiedliche Proteintransfer-Methoden zum Einsatz.

Beim *Semi-Dry Blot* wird das im SDS-PAGE auf das Polyacrylamid übertragene Proteingemisch in einer Blotkammer durch eine vertikal angelegte Spannung auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde die zugeschnittene PVDF Membran zuvor für 15-30 s in Methanol aktiviert und danach - wie auch das Whatman Papier - in Transferpuffer equilibriert. Auf den Boden der Blotkammer wurden dann je vier Lagen Whatman Papier, die PVDF Membran, das Acrylamidgel und schließlich wieder vier Lagen Whatman Papier eingebracht und mit einem Roller eingeschlossene Luftblasen beseitigt. Die Kammer wurde geschlossen und für 120 min eine Spannung von 120 V angelegt.

Beim *Wet-Blot* Verfahren geschieht der Proteintransfer entlang einer horizontal angelegten Spannung in einem Blot-Tank, der ganz und gar mit Transferpuffer aufgefüllt wird. Die Vorbehandlung der einzelnen Papiere und Membranen ist der *Semi-Dry* Methode gleich, wobei die einzelnen Komponenten in einem Transferpufferbad zusammengefügt und flankiert von zwei Kunststoffschwämmen in eine Kassette eingebracht wurden. Nachdem die Kassette im Blot-Tank versenkt wurde, wurde über 120 min eine Spannung von 90 V angelegt. Der Tank befand sich während des Blot-Vorgangs auf Eis.

Nach erfolgtem Transfer wurden die PVDF Membran der Blotkammer entnommen und mit einem Kugelschreiber die transferierten Markerbanden leicht nachgezeichnet. Anschließend wurde die PVDF Membran in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und in einer 1%Milchpulver/TBS-T Lösung für 1 h bei RT auf dem Rollenmischer blockiert, um eine unspezifische Bindung nachfolgend verwendeter Antikörper zu unterbinden.

Die nun verwendeten Antikörper und ihre Verdünnungen wurden wie folgt eingesetzt:

Tabelle 3 Western Blot Antikörper

Antikörper	Verdünnung
Maus anti-hIL-6R AK 4-11	1:1000 in 5 ml 1% Milchpulver/TBS-T
Maus anti-ADAM-17 AK A300	1:1000 in 5 ml 1% Milchpulver/TBS-T
HRP konjugierter Ziege anti-Maus IgG AK	1:5000 in 10 ml 1% Milchpulver/TBS-T

Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte ebenfalls in 1% Milchpulver/TBS-T bei 4 °C über Nacht. Darauf erfolgten drei Waschschrte in TBS-T für jeweils 10 min und die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper in 1% Milchpulver/TBS-T für 2 h bei RT. Abschließend erfolgten wiederum zwei Waschschrte mit TBS-T und mit PBS. Die Entwicklung erfolgte mit Hilfe des Supersignal® West Femto Substrates im Mischungsverhältnis 1:1 und dem Imager FluorchemQ® von CellBiosciences. Um weitere Proteine auf der PVDF Membran nachzuweisen, wurde dieser mit Restore™ Western Blot Stripping Buffer laut Herstellerprotokoll von Thermo Scientific behandelt und es wurde erneut mit dem Blockieren begonnen.

3.6 ELISA

Dem Nachweis des sIL-6R und TNF α in den Zellüberständen und Zellysaten diente ein „sandwich“ ELISA (engl. *Enzyme linked immunosorbent assay*). Alle Standardwerte und Proben wurden in technischen Triplikaten analysiert. Der ELISA wurde auf nunc™ Multisorp Platten nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 4 ELISA Protokoll

Arbeitsschritt	Anti shIL-6R	Anti hTNF α
erster Antikörper, o/n RT	Maus anti-hIL-6R 4-11 Verdünnung 1:1000 in PBS 1,0 μ g in 50 μ l PBS/Ansatz	Maus anti TNF α AB Verdünnung 1:180 in PBS 4 μ g in 50 μ l PBS/Ansatz
Waschen	dreimal mit PBS-T aus Spritzflasche	dreimal mit PBS-T aus Spritzflasche
Blockieren, 2h RT	1% BSA/PBS 200 μ l	1 % BSA/PBS 200 μ l
Standard, 2h RT	Hyper IL-6 in 7 Werten von 2000 pg/ml bis 31,25 pg/ml	rekombinantes hTNF α in 7 Werten von 1000 pg/ml bis 15,62 pg/ml
Proben	50 μ l als Triplikate	50 μ l als Triplikate
Waschen	dreimal mit PBS-T aus Spritzflasche	dreimal mit PBS-T aus Spritzflasche
zweiter Antikörper, 2h RT	biotinylierter Ziege anti-hIL-6R AK Baf227 Verdünnung 1:1000 in 1 % BSA/PBS	biotinylierter Ziege anti-TNF α AK Verdünnung 1:180 in 1%

	200 ng/ml/Ansatz	BSA/PBS 500 ng/ml/Ansatz
Waschen	dreimal mit PBS-T aus Spritzflasche	dreimal mit PBS-T aus Spritzflasche
Streptavidin-HRP, 45min RT/dunkel	Streptavidin-POD conjugate Verdünnung 1:10000 in 1% BSA/PBS	Streptavidin-POD conjugate Verdünnung 1:10000 in 1% BSA/PBS
Waschen	dreimal mit PBS-T aus Spritzflasche	dreimal mit PBS-T aus Spritzflasche
Entwicklung, 10-30min RT	BM blue, lösliches POD-Substrat 75 µl	BM blue, lösliches POD-Substrat 75 µl
Abstoppen	1,8 M H ₂ SO ₄ 75 µl	1,8M H ₂ SO ₄ 75 µl

Zur letztendlichen Messung der Absorption diente das Spektrophotometer SLT Rainbow. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden anhand der Absorption der Standardwerte ermittelt und die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den technischen und biologischen Triplikaten errechnet.

3.7 Durchflusszytometrie

Der Analyse der Oberflächenexpression von Proteinen wie hIL-6R, ADAM-17, ADAM-10 und CD14 diente die Durchflusszytometrie (*Fluorescence activated cell sorting*, FACS). Dabei werden Proteine der Zelloberfläche mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper nachgewiesen. Der fluoreszenzmarkierte Antikörper wird im Durchflusszytometer von einem Laser angeregt und die Intensität des emittierten Spektrums wird gemessen. Die gemessene Intensität ist der Expression des zu analysierenden Proteins auf der Zelloberfläche proportional.

Dazu wurden die Suspensionszellen (THP-1-, U937-, primäre Monozyten) nach Stimulation in FACS-Puffer bei 4 °C aufgenommen und 10⁵ Zellen/Vertiefung einer 96-Loch Platte mit rundem Boden übertragen. Die adhärennten Makrophagen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale nach erfolgter Stimulation abgelöst und ebenfalls in 4 °C FACS-Puffer aufgenommen und umgesetzt. Nach Zentrifugation bei 1500 U/min für 5 min und Abwurf des Überstandes wurden die Zellen mit 5 µl human *Fc-Receptor binding inhibitor* in 100 µl FACS-Puffer blockiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper durch die Fc-Rezeptoren zu unterbinden. Es folgte die Inkubation mit den Antikörpern in 100 µl FACS-Puffer für jeweils 30 min bei 4 °C. Die Antikörper, deren Reihenfolge und ihre Endkonzentration wurden wie folgt angewendet:

Tabelle 5 FACS Antikörper

Antikörper	Verdünnung
Färbung ADAM-10/17, hIL-6R, Lebendkontrolle	
Maus anti-hIL-6R AK 4-11	1:400
APC konjugierter Ratte Anti-Maus IgG ₁ AK	1:1000
FITC konjugierter Maus anti-hTACE AK	1:30
Propidium Jodid	1:50
Isotyp Kontrollen (je eine Färbung)	
APC konjugierter Ratte Anti-Maus IgG ₁ AK	1:1000
FITC konjugierter Maus IgG ₁ Isotyp Kontrolle	1:10
CD14-FACS	
FITC konjugierter Maus anti-hCD14 AK	1:5

Zwischen den Inkubationen wurde zweimal mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen, dazu wurde bei 1500 U/min für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgeworfen. Die Färbung der Proben fand in Duplikaten statt. Da eine Mehrfachfärbung durchgeführt wurde und die einzelnen Emissionsspektren der Fluorophore sich geringfügig überlappten, wurden auch Einzelfärbungen vorgenommen, um eine Kompensation der Spektren zu ermöglichen. Darüber hinaus wurden Isotyp-Kontrollen zu den Einzelfärbungen erstellt. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des FACS Canto Gerätes von BD Biosciences, die Weiterverarbeitung der FCS-Daten mit Hilfe der Software FlowJo von Tree Star, Inc.

3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate fand unter Verwendung des BCA Protein Assay Kit von Pierce® nach Herstellerprotokoll statt.

4 Ergebnisse

Diese Dissertation soll Aufschluss darüber geben, wie der humane sIL-6R durch Monozyten und Makrophagen freigesetzt wird. Es soll festgestellt werden, ob neben ADAM-10 und ADAM-17 weitere Proteasen an seiner limitierten proteolytischen Verarbeitung beteiligt sind und ob Veränderungen der Zelle während des Differenzierungsprozesses Einfluss auf die Fähigkeit von Monozyten und Makrophagen nehmen, lösliche Formen wichtiger Entzündungsfaktoren wie TNF α und sIL-6R zu produzieren. Dazu wurde ausschließlich mit Zellen humanen Ursprungs gearbeitet und nur endogen exprimierte Proteine untersucht.

4.1 Untersuchungen zur Expression von ADAM-17 in Monozyten und Makrophagen

Es ist bekannt, dass zahlreiche wichtige Enzyme mononukleärer Zellen wie Matrix-Metalloproteinasen während der Differenzierung vom Monozyten zum Makrophagen in ihrer Expression reguliert werden (Newby, 2008). Im Folgenden wurde untersucht, ob auch eine Veränderung in der Expression von ADAM-17 während des monozytären Differenzierungsvorgangs stattfindet. Es wurden sowohl die humanen monozytären Zelllinien THP-1 und U937 als auch primär isolierte Zellen humaner Spender betrachtet.

4.1.1 Differenzierung der monozytären Zelllinien THP-1 und U937 zu Makrophagen-ähnlichen Zellen

Der Differenzierungsvorgang der Zelllinien erfolgte wie beschrieben unter Verwendung von 4 β -Phorbol-12-Myristate-13-Acetat (PMA) als Stimulus (Baek et al., 2009; Daigneault et al., 2010; Murao et al., 1983), welcher 72 h auf die Zellen einwirkte. Die Differenzierung zu einem Makrophagen-ähnlichen Phänotyp konnte lichtmikroskopisch nachgewiesen werden. Es fand eine Adhäsion der sonst als Monozyten in Suspension vorliegenden Zellen an den Boden der Zellkulturschale statt. Eine Vergrößerung des Zellvolumens und die Ausprägung unterschiedlicher Granula wurden sichtbar. Eine weitere Zunahme der Zellzahl konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 4.1).

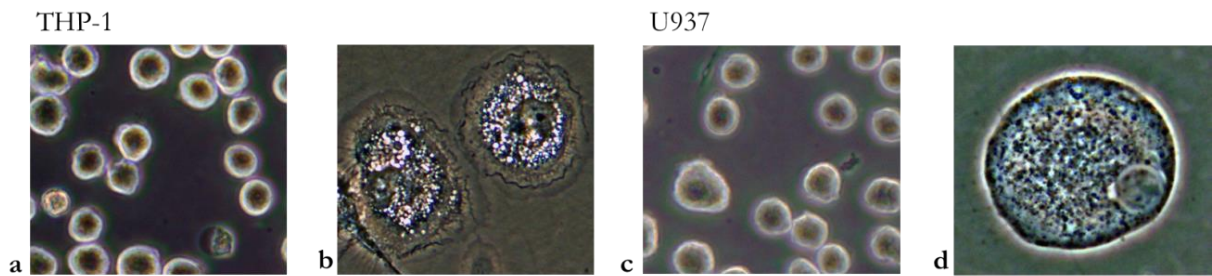


Abbildung 4.1 Differenzierungsprozess der Zelllinien THP-1 und U937. (a,c) THP-1 und U937 Zellen in Suspension. Sie zeigen einen monozytären Phänotyp. (b,d) Nach 72 h PMA-Behandlung (50 nM für THP-1 Zellen und 100 nM für U937 Zellen) kam es zur Adhäsion der Zellen an den Boden der Zellskulturschale. Eine Zunahme des Zellvolumens und die Ausprägung typischer Granula wurden beobachtet. Ein Anstieg der Zellzahl fand nicht mehr statt.

4.1.2 Isolation der primären Monozyten und deren Differenzierung

Die Gewinnung der primären Monozyten aus der PBMC-Fraktion humaner Blutproben erfolgte mittels eines Ficoll®-Gradienten und nachfolgender magnetaktivierter Zellsortierung - MACS®. Die erfolgreiche Isolation der CD14⁺ Zellen wurde am Durchflusszytometer unter Verwendung eines FITC-gekoppelten antiCD14 Antikörpers aus der Maus und einer entsprechenden FITC-gekoppelten Maus IgG₁ Isotyp-Kontrolle sichergestellt (Abbildung 4.2).

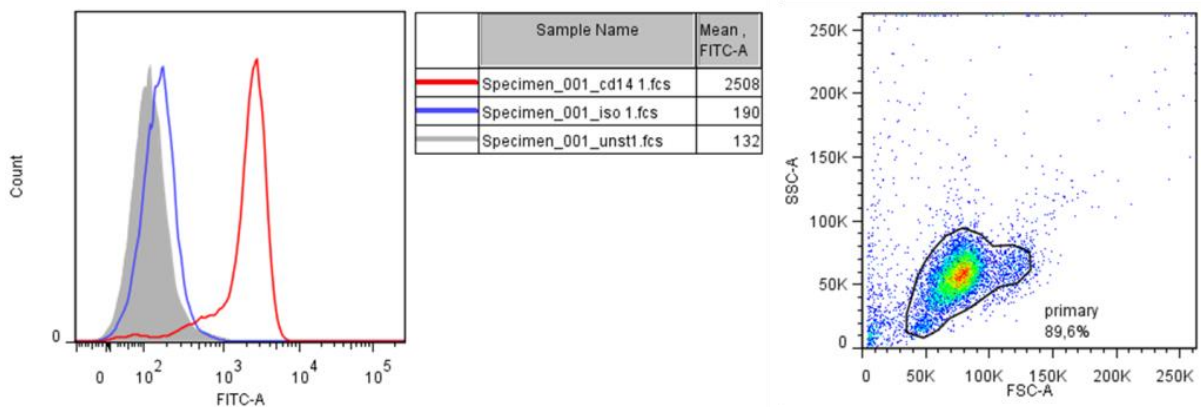


Abbildung 4.2 Nachweis der Isolation CD14⁺ Zellen. Direkt nach Isolation der primären Monozyten mit Hilfe eines Ficoll® Gradienten und des MACS® Systems wurden die isolierten Zellen mit einem Fluoreszin Isothiozyanat (FITC)-gekoppelten IgG₁ antiCD14 Antikörper aus der Maus (rot) und eine zweite Gruppe mit einer entsprechenden Isotyp-Kontrolle inkubiert (blau). Eigenfluoreszenz ungefärbter Zellen (grau).

Sofort nach der Isolation wurden die primären Monozyten in Kulturmedium aufgenommen und durch Hinzufügen von hM-CSF in einer Endkonzentration von 100 ng/ml die Differenzierung

zu Makrophagen eingeleitet. Auch hier war nach 72 h eine deutliche Veränderung des Phänotyps lichtmikroskopisch zu beobachten. Adhäsion an den Boden der Kulturschale, Zunahme des Zellvolumens und verstärkte Ausprägung intrazellulärer Granula deuteten auf eine erfolgreiche Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen hin (Abbildung 4.3).

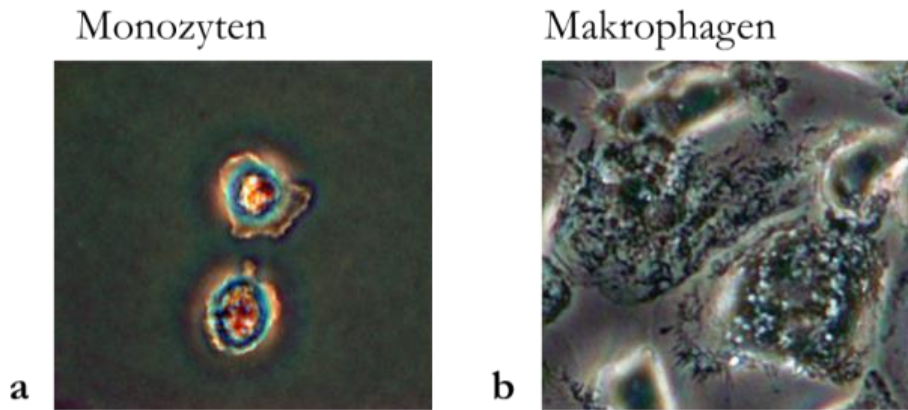


Abbildung 4.3 Differenzierung der primären Monozyten. Schon nach ca. 24 h der Kultivierung der frisch isolierten Monozyten **(a)** konnte eine Adhäsion der Zellen an den Boden der Kulturschale beobachtet werden. Nach 72 h der Kultivierung in hM-CSF-haltigem Medium zeigten die Zellen einen Makrophagen-ähnlichen Phänotyp mit Bildung intrazellulärer Granula, Ausbildung von Pseudopodien und deutlicher Volumenzunahme **(b)**.

4.1.3 ADAM-17-Expression in Monozyten und Makrophagen der Zelllinien U937 und THP1

Um eine Veränderung der Expression von ADAM-17 feststellen zu können, wurden sowohl von den U937- und THP-1 Monozyten, als auch von den mittels PMA differenzierten Makrophagen (siehe 3.2.2) Zelllysate hergestellt und eine Menge von 400 µg Gesamtprotein mit Concanavalin A-Sepharose® gefällt, um glykosylierte Proteine, wie ADAM-17 anzureichern. Die Probe wurde mittels SDS-Page aufgetrennt und per Western-Blot Verfahren auf eine PVDF Membran übertragen. Der Nachweis von ADAM-17 erfolgte mit Hilfe des spezifischen Antikörpers A300 (Trad et al., 2011) (Abbildung 4.4).

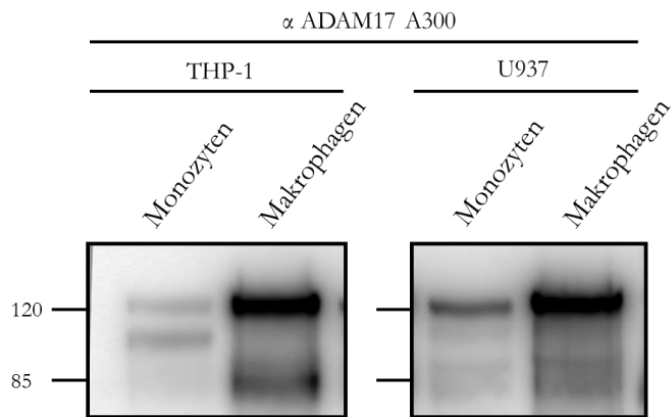


Abbildung 4.4 ADAM-17-Expression in Monozyten und Makrophagen der Zelllinien THP-1 und U937 Der Antikörper A300 war in der Lage, eine klare Bande in Höhe von 120kD sowohl bei den Monozyten als auch bei den differenzierten Makrophagen der jeweiligen Zelllinie zu detektieren. Sowohl bei den THP-1 als auch bei den U937 Zellen ist eine deutlich intensivere Bande bei den Makrophagenderivaten nachweisbar, entsprechend der Pro-form von ADAM-17. Zusätzlich lässt sich bei THP-1 Monozyten eine klare Bande auf ca. 110 kD Höhe und bei den THP-1 Makrophagen auf ca. 85 kD Höhe detektieren, entsprechend der maturen Form von ADAM-17.

4.1.4 ADAM-17-Expression in primären humanen Monozyten und Makrophagen

Um die Expression von ADAM-17 in primären Zellen nachzuweisen, wurden aus dem Blut gesunder Spender mittels Ficoll-Gradient und MACS® CD14⁺ Monozyten isoliert (siehe 3.1). Ein Teil dieser Monozyten wurde mit Hilfe von hM-CSF über einen Zeitraum von 10 d zu Makrophagen differenziert (siehe 4.1.2). Es wurden von isolierten Monozyten und differenzierten Makrophagen dreier Donoren Zelllysate hergestellt und 400 µg Protein mit Hilfe von Concanavalin A-Sepharose® gefällt. Nach Auftrennen der Probe per SDS-Page wurden die Proteine durch einen Western-Blot auf eine PVDF Membran übertragen. Zum spezifischen Nachweis von ADAM-17 wurden dieselben Antikörper benutzt, wie bei den Zelllinien THP-1 und U937 (Abbildung 4.5).

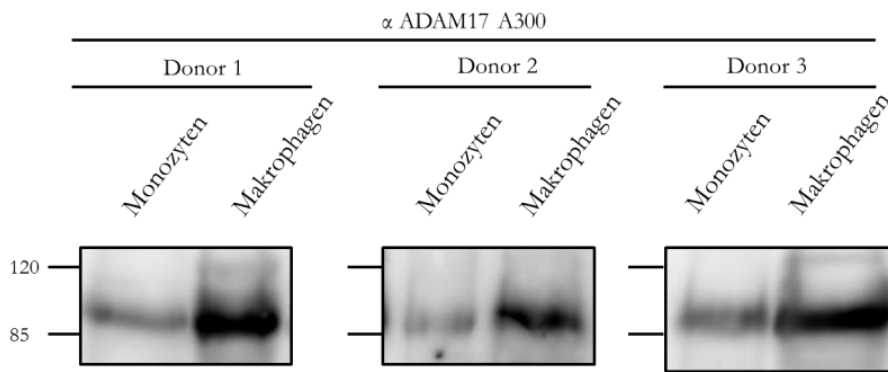


Abbildung 4.5 Die Expression von ADAM-17 in primären Monozyten und Makrophagen
 Sowohl bei den Monozyten, als auch den Makrophagen aller drei Donoren konnte auf Höhe von ca. 90 kD eine klare Bande detektiert werden, welche auf Seiten der Makrophagen eine deutlich intensivere Ausprägung zeigte. Zusätzlich konnte je eine schwache Bande auf Höhe von ca. 120 kD bei den Makrophagen aus Donor 1 und 3 nachgewiesen werden.

Um eine Veränderung des ADAM-17-Expressionsmusters nicht nur auf Protein-Ebene, sondern auch auf Ebene der Transkription nachweisen zu können, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Dazu wurde aus den Monozyten und differenzierten Makrophagen der Donoren 1 und 2 RNA isoliert. Pro Probe dienten 500 ng gewonnene RNA als Vorlage für die reverse Transkription. Als endogene Kontrolle für die qRT-PCR wurde GAPDH verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels der $\Delta\Delta C_P$ -Methode. Bei beiden Donoren konnte ein ca. 5-facher Anstieg der ADAM-17-mRNA der Makrophagen gegenüber den Monozyten nachgewiesen werden (Abbildung 4.6).

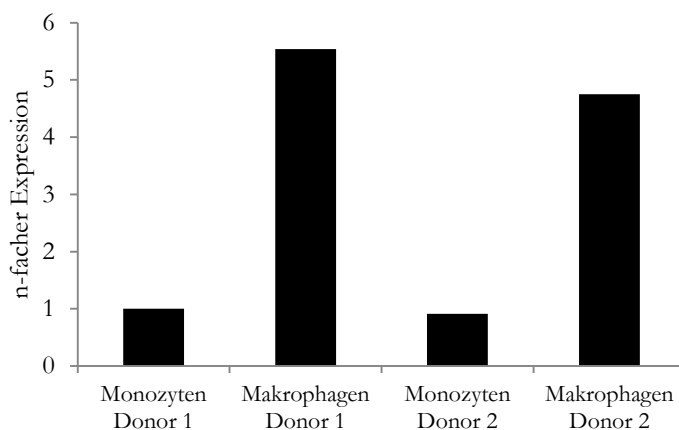


Abbildung 4.6 ADAM-17-mRNA Expression primärer Monozyten und Makrophagen
 Nach 40 Zyklen der Polymerase Kettenreaktion kann bei beiden Donoren ein ca. 5-facher Anstieg der ADAM-17-mRNA Expression nach Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich also eine klare Expressionssteigerung sowohl auf mRNA als auch auf Protein-Ebene von ADAM-17 nach Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen feststellen.

4.2 Die Entstehung des humanen löslichen Interleukin-6 Rezeptors

4.2.1 Stimulationsversuche mit Monozyten und Makrophagen der humanen Zelllinie THP-1

THP-1 Monozyten sowie daraus abgeleitete Makrophagen wurden jeweils in Stimulationsmedium aufgenommen und in biologischen Triplikaten zu $2 \cdot 10^5 / 200 \mu\text{l}$, d.h. in einer Konzentration von $10^6 / \text{ml}$ ausgebracht. Im Stimulationsmedium wurde 10% FCS mit 1% sterilen BSA ersetzt, um Wechselwirkungen der darin enthaltenen natürlichen Proteaseinhibitoren mit den zu untersuchenden Proteasen auszuschließen. Nach 6 h Inkubation mit spezifischen Proteaseinhibitoren wurden die Zellen durch Zentrifugation depletiert und der Überstand mit Hilfe eines sIL-6R-ELISA analysiert. Die in jeweils technischen Triplikaten gemessene Konzentration an sIL-6R lieferte hierbei Rückschlüsse auf die am konstitutiven *Shedding* des membranständigen IL-6R beteiligten Proteasen. Die Untersuchung des induzierten *Sheddings* durch Stimulation mit 100 nM PMA oder 500 μM BzATP erfolgte analog, jedoch mit verkürzter Inkubationszeit von 1 h für PMA bzw. 20 min für BzATP. Dabei gilt PMA als klassisches Stimulanzium ADAM-17-abhängiger Proteolyse. Es wurde außerdem eine Präinkubation mit den entsprechenden Proteaseinhibitoren von 30 min durchgeführt. Auch wurde eine Kontrolle mit DMSO durchgeführt, um einen Einfluss desselbigen auf das IL-6R-*Shedding* auszuschließen. Der Übersichtlichkeit halber sind in folgenden Diagrammen nicht immer unbehandelte Proben und DMSO-Kontrolle zusammen aufgeführt, sofern diese in der Konzentration des sIL-6R keinen signifikanten Unterschied aufwiesen. Ein nach Inhibition verbleibender Basalspiegel an sIL-6R im Überstand ist zu erwarten, da THP-1 Zellen auch große Mengen an sIL-6R durch alternatives Spleißen erzeugen und ausschütten (Jones et al., 1998).

4.2.1.1 Konstitutive Entstehung des löslichen IL-6 Rezeptors

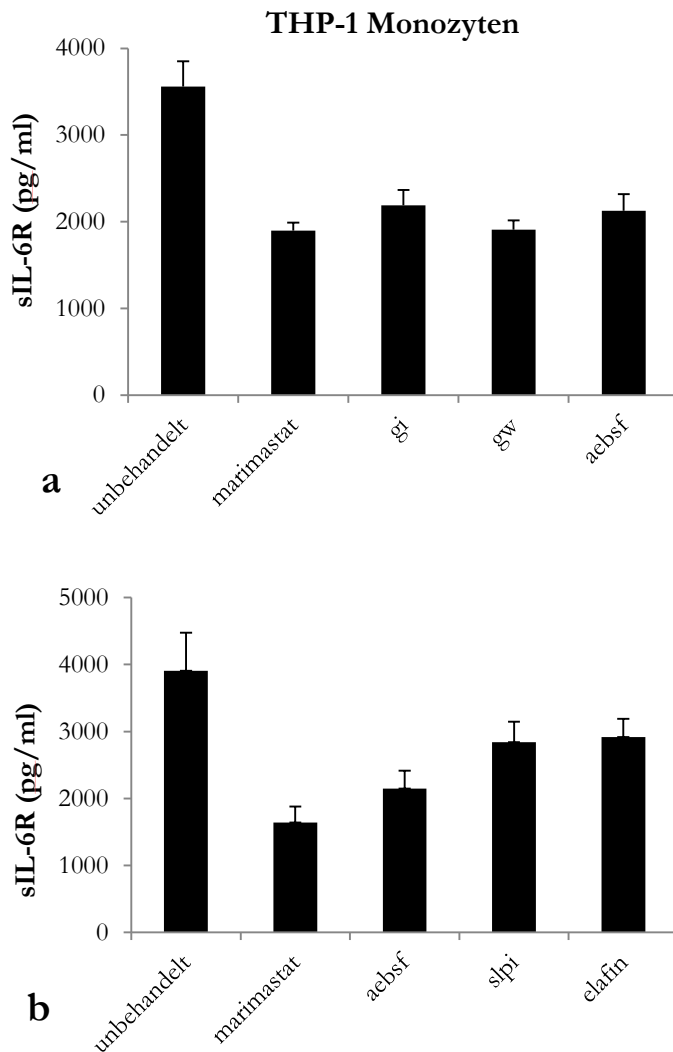


Abbildung 4.7 Die konstitutive Freisetzung des sIL-6R durch monozytäre THP-1 Zellen
Der Zellüberstand wurde für 6 h von unbehandelten und von mit spezifischen Proteaseinhibitoren behandelten Zellen gesammelt. (Konzentration Inhibitoren: Marimastat, GI, GW jew. 3 μ M. AEBSF 250 μ M. SLPI 2,5 μ M. Elafin 20 μ g/ml.) Die Konzentration des im Überstand befindlichen sIL-6R wurde per ELISA bestimmt. SD durch Fehlerbalken repräsentiert (n=3 unabhängige Experimente).

Die Messung der sIL-6R-Spiegel im Zellüberstand der THP-1 Monozyten nach bereits 6 h zeigte relativ hohe Konzentrationen von ca. 3,5-4 ng/ml, was für ein stark ausgeprägtes konstitutives *Shedding* in dieser Zelllinie spricht. Mit dem Breitspektrum-Metalloproteinase-Inhibitor Marimastat und im Detail mit dem ADAM-10-spezifischen Inhibitor GI konnte die sIL-6R Konzentration auf unter 2 ng/ml verringert werden. Die Abhängigkeit des konstitutiven *Sheddings* von ADAM-17, dargestellt durch GW, einem Inhibitor von ADAM-10 und -17, war nur marginal (Abbildung 4.7a). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Gruppe um Jones (Jones et al., 1998),

welche mit einem ADAM-17-spezifischen Inhibitor nach 8 h Inkubation im Überstand von THP-1 Monozyten keinen Einfluss dessen auf die Generierung des sIL-6R feststellen konnten. Auch mit Hilfe des unspezifischen Serinprotease-Inhibitors AEBSF konnte der Spiegel an sIL-6R auf ca. 55% des Ursprungsniveaus gesenkt werden. Die nähere Bestimmung der verantwortlichen Serinprotease war nicht eindeutig. Sowohl für den Inhibitor von CG und NE: SLPI als auch für den Inhibitor von PR3 und NE: Elafin konnte eine Verringerung der Konzentration des konstitutiv prozessierten sIL-6R nachgewiesen werden (auf ca. 75% des Ausgangswertes), nicht jedoch auf das gleiche Niveau wie AEBSF (Abbildung 4.7b).

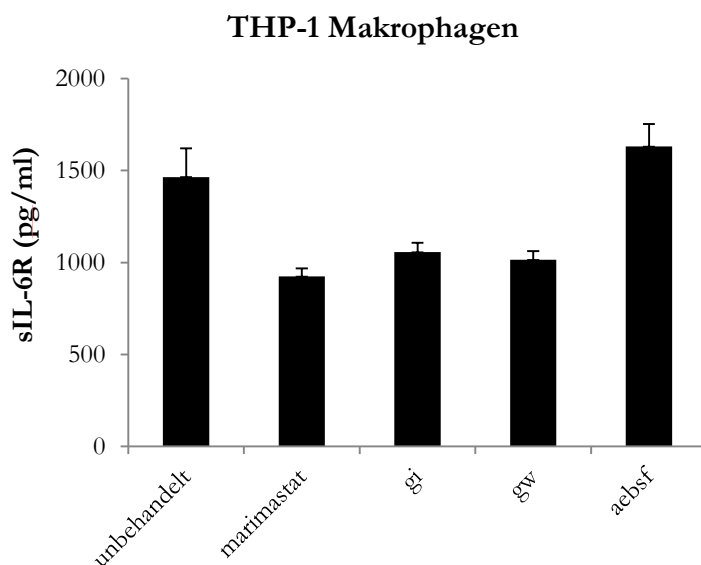


Abbildung 4.8 Konstitutive sIL-6R-Freisetzung durch THP-1-Makrophagen Monozytäre THP-1 Zellen wurden mittels 50nM PMA für 3d zu Makrophagen differenziert. Nach weiteren 7d Ruhezeit wurde für 6h von unbehandelten und von mit spezifischen Proteaseinhibitoren behandelten Zellen der Zellüberstand gesammelt. (Konzentration Inhibitoren: Marimastat, GI, GW jew. 3 μ M. AEBSF 250 μ M.) Die Konzentration des im Überstand befindlichen sIL-6R wurde per ELISA bestimmt. SD durch Fehlerbalken repräsentiert, wobei n=3 unabhängige Experimente.

Die konstitutive Entstehung des sIL-6R bei THP-1 Makrophagen konnte den Monozyten ähnlich klar durch Marimastat, GI und GW gleichermaßen auf ein Niveau von ca. 60-70% gesenkt werden, wobei auch hier also ADAM-10 und nicht ADAM-17 für das *Shedding* des hIL-6R verantwortlich ist. Da THP-1 Zellen nach Differenzierung zu Makrophagen Serinproteasen wie CG nicht mehr exprimieren (siehe 1.3), ist eine Inhibition des hIL-6R-*Sheddings* durch den Serinprotease-Inhibitor AEBSF nicht zu erwarten (Rivera-Marrero et al., 2004). Das Resultat des Stimulationsversuchs bestätigte diese Annahme und wirft somit einen deutlichen Unterschied zum monozytären THP-1-Phänotyp auf.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ADAM-17 weder bei den THP-1 Monozyten noch Makrophagen zur konstitutiven Entstehung des sIL-6R beiträgt, während für beide Differenzierungsstadien eine deutliche Aktivität von ADAM-10 nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren ist die Aktivität einer oder mehrerer Serinproteasen bei der konstitutiven Generierung des sIL-6R bei THP-1 Monozyten sehr wahrscheinlich. Nach abgeschlossenem Differenzierungsprozess und dem damit verbundenen Verlust aktiver Serinproteasen bei den Makrophagen verschwindet dieser Effekt jedoch. Generell ist zu beobachten, dass die THP-1 Zellen in ihrem monozytären Phänotyp konstitutiv mehr sIL-6R produzieren als die Makrophagen.

4.2.1.2 Entstehung des löslichen IL-6-Rezeptors durch Stimulation mit 4 β -Phorbol-12-Myristate-13-Acetat (PMA)

Es ist bekannt, dass eine durch PMA induzierte Aktivierung von Proteinkinase C zu einem ADAM-17-abhängigen *Shedding* des hIL-6R führt (Jones et al., 1998; Kveiborg et al., 2011). ADAM-10 wird bei dieser Art des induzierten *Sheddings* nur eine geringe Rolle zugeschrieben. Diese Ergebnisse sollten mittels verschiedener Protease-Inhibitoren anhand der THP-1 Monozyten und Makrophagen nachvollzogen werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Expressionssteigerung von ADAM-17 während des Differenzierungsprozesses zu Makrophagen einen qualitativen oder quantitativen Einfluss auf das IL-6R-*Shedding* in THP-1 Zellen besitzt. Die Zellüberstände der stimulierten Monozyten und Makrophagen wurden per ELISA auf die Konzentration an sIL-6R untersucht. Wenn *Shedding* des IL-6R an der Änderung der sIL-6R-Spiegel im Überstand beteiligt wäre, würde es eine Änderung der Oberflächenexpression des IL-6R auf den Zellen geben. Dies wurde per Durchflusszytometrie der THP-1 Monozyten evaluiert und festgestellt, ob nach PMA-Stimulation die Dichte an membrangebundenem IL-6R abgenommen hat. Auch wurde untersucht, ob eine Änderung der Oberflächenexpression von ADAM-17 nach PMA-Stimulation stattgefunden hat.

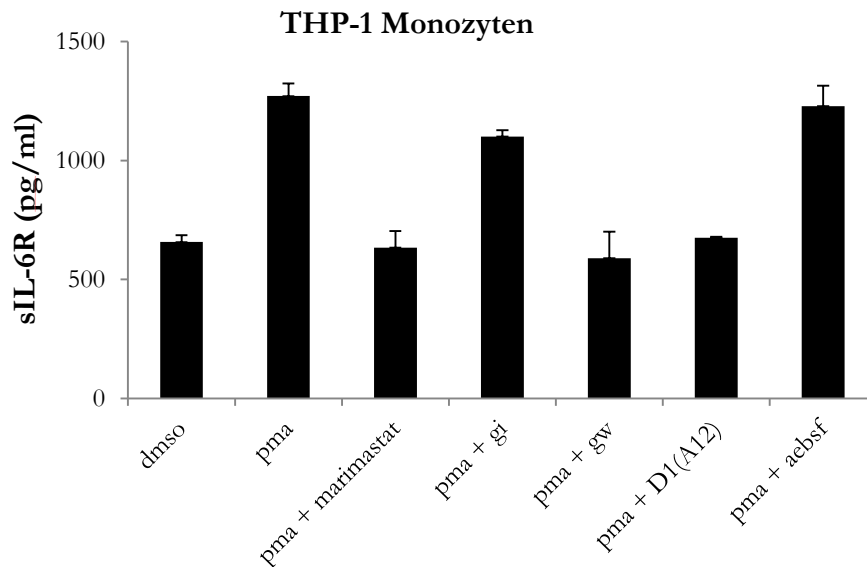


Abbildung 4.9 sIL-6R-Freisetzung nach Stimulation der THP-1 Monozyten mit 100nM PMA Der Zellüberstand wurde für 1h von unbehandelten und von mit PMA behandelten Zellen gesammelt. Als Negativkontrolle diente DMSO. Es fand eine 30 min Präinkubation mit den spezifischen Proteaseinhibitoren statt. (Konzentration Inhibitoren: Marimastat, GI, GW jew. 3 μ M. AEBSF 250 μ M. D1(A12) 100 μ M). Die Konzentration des im Überstand befindlichen sIL-6R wurde per ELISA bestimmt. SD durch Fehlerbalken repräsentiert, wobei n=3 unabhängige Experimente.

Nach einstündiger Stimulation der THP-1 Monozyten mit PMA kann im Überstand eine ca. 1,9fach erhöhte Konzentration an sIL-6R nachgewiesen werden. Mit dem ADAM-17-selektiven inhibitorischen Antikörper D1(A12), Marimastat und GW (inhibiert ADAM-10 und -17) kann dieses PMA-induzierte *Shedding* vollständig aufgehoben werden. Während mit dem Serinprotease-Inhibitor AEBSF kein Effekt auf das *Shedding* ausgeübt werden kann, bewirkt eine Inkubation mit dem ADAM-10-spezifischen Inhibitor GI eine Verminderung der sIL-6R-Konzentration um ca. 14% (Abbildung 4.9).

Um das Ergebnis der Untersuchung der Überstände zu festigen und zu ermitteln, ob ADAM-17 eine quantitative Änderung auf der Zelloberfläche nach PMA-Stimulation erfährt, wurde eine Immunfärbung an den THP-1 Monozyten durchgeführt und die Oberflächenexpression von IL-6R und ADAM-17 im Durchflusszytometer bestimmt. Bevor die Monozyten mit den jeweils wie in 3.7 beschriebenen für IL-6R und ADAM-17-spezifischen fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern inkubiert wurden, wurde eine Blockierung des natürlich auf den Monozyten vorkommenden Fc-Rezeptors vorgenommen. Damit wird eine unspezifische Bindung der Antikörper auf der Zelloberfläche verhindert. Eine Kontrolle dafür stellt die durchgeführte Inkubation mit einem unspezifischen Antikörper dar, der in Antikörper-Klasse und Fluorophor-

Konjugation (APC für IL-6R, FITC für ADAM-17) dem spezifischen Antikörper gleich ist - im Weiteren als Isotyp-Kontrolle bezeichnet. Es zeigte sich, dass die Fluoreszenz des IL-6R-spezifischen Antikörpers nach PMA-Stimulation um ca. die Hälfte abnimmt. Dieser Effekt lässt sich durch Präinkubation mit den ADAM-17-Inhibitoren GW und D1(A12) nahezu aufheben, während mit dem ADAM-10-Inhibitor GI kein beobachtbarer Effekt induziert werden kann. Dieses Ergebnis entspricht sehr genau den Beobachtungen der Analyse des sIL-6R im Überstand der stimulierten THP-1 Monozyten.

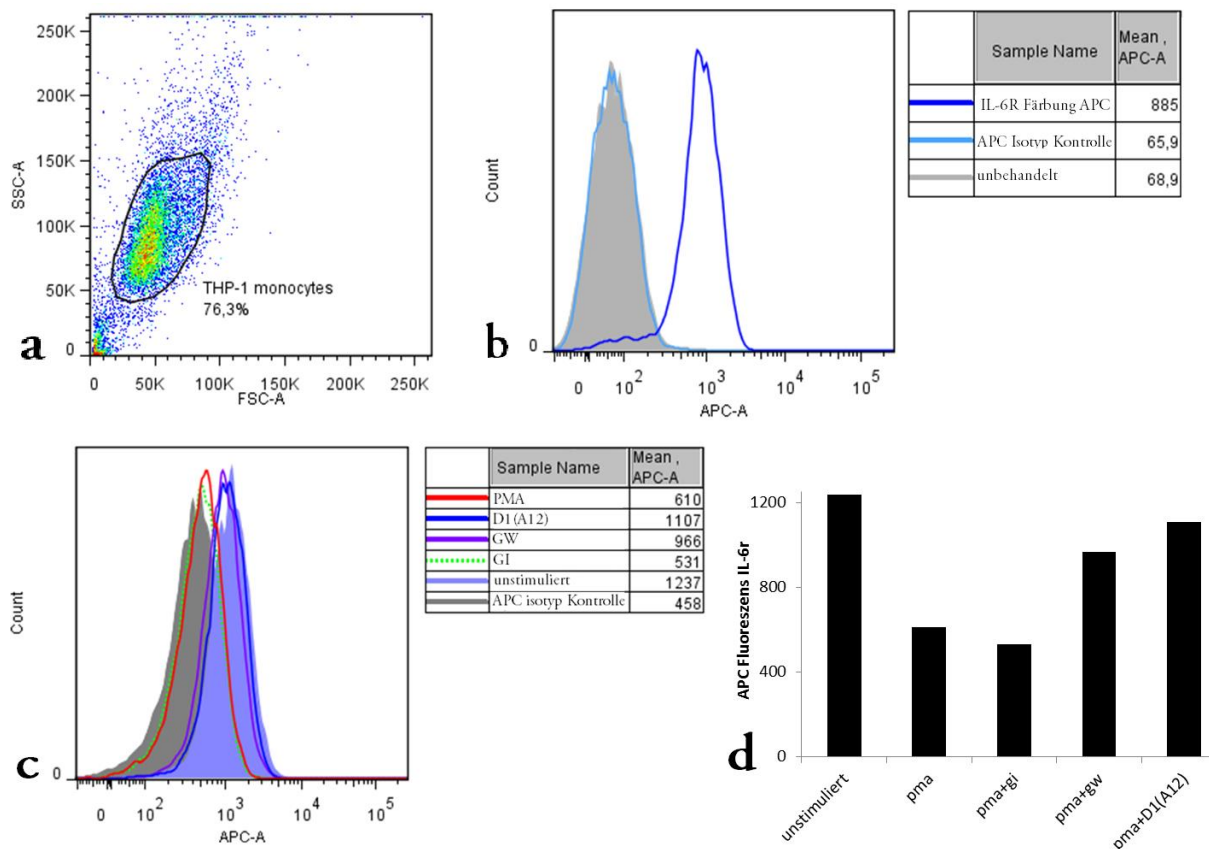


Abbildung 4.10 Oberflächenexpression des IL-6R der THP-1 Monozyten nach 100 nM PMA Stimulation THP-1 Zellen wurden für 1 h mit 100 nM PMA stimuliert. Es fand eine 30min Präinkubation mit den spezifischen Proteaseinhibitoren statt. (Konzentration Inhibitoren: GI, GW jew. 3 μ M. D1(A12) 100 μ M.) Mit einem anti-hIL-6R-AK (4-11) aus der Maus und einem APC konjugierten sekundär AK wurde eine Färbung des hIL-6R durchgeführt und die Fluoreszenz bestimmt. Als Negativkontrolle diente die einmalige Inkubation der Isotyp-Kontrolle **a)** Auswahl der zu betrachtenden homogenen Zellpopulation im FSC/SSC Diagramm **b)** IL-6R-Oberflächenexpression der THP-1 Monozyten **c)** IL-6R-Oberflächenexpression der mit PMA und spezifischen Inhibitoren inkubierten THP-1-Monozyten; Experiment exemplarisch **d)** IL-6R-Oberflächenexpression **c)** dargestellten Experiments im Balkendiagramm, um zu verdeutlichen, wie „deckungsgleich“ die Änderung der Oberflächenexpression des IL-6R zu der in **Abbildung 4.9** gezeigten Änderungen des sIL-6R-Spiegels im Zellüberstand ist.

In THP-1 Zellen konnte nachgewiesen werden, dass nach PMA-Stimulation eine deutliche Reduktion der ADAM-17-Oberflächenexpression auftritt (Doedens and Black, 2000). Dies zeigt auch die hier durchgeführte Untersuchung der ADAM-17-Oberflächenexpression im Durchflusszytometer. Nach PMA-Stimulation verringert sich die ADAM-17-spezifische Fluoreszenz um ca. 28%. Dieser Effekt kann teilweise durch eine Präinkubation mit dem ADAM-10/-17-spezifischen Inhibitor GW aufgehoben werden. Nach Präinkubation mit GI und AEBSF kann kein Effekt beobachtet werden (Abbildung 4.11). Ein Versuch, mit Hilfe spezifischer AKs (*A300*) und vorangegangener ConA-Fällung des Überstands ADAM-17 zu detektieren, schlug fehl (nicht gezeigt). Dies deckt sich mit bereits beschriebenen Beobachtungen.

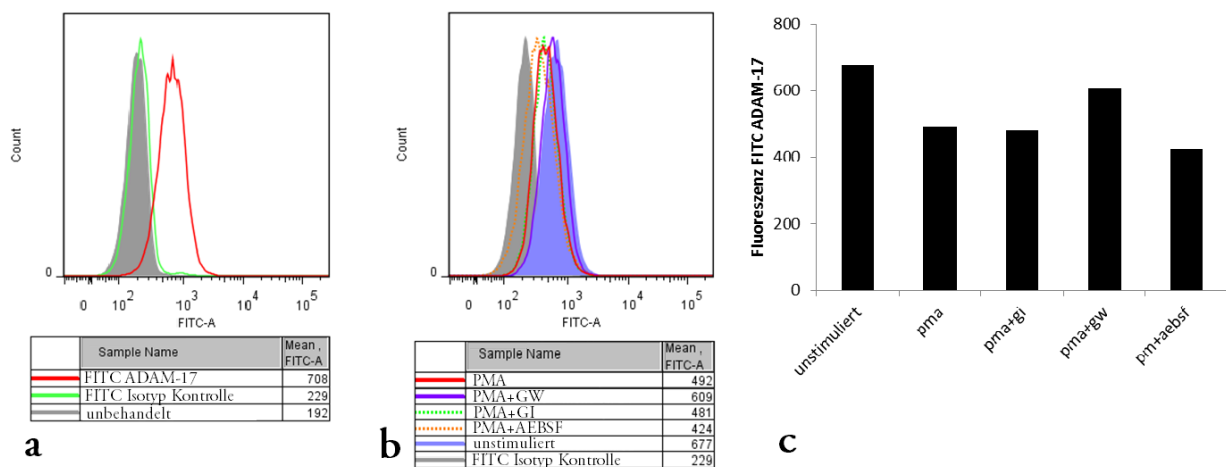


Abbildung 4.11 Oberflächenexpression von ADAM-17 der THP-1 Monozyten nach 100 nM PMA Stimulation THP-1 Zellen wurden für 1 h mit 100 nM PMA stimuliert. Es fand eine 30 min Präinkubation mit den spezifischen Proteaseinhibitoren statt. (Konzentration Inhibitoren: GI, GW jew. 3 μ M. AEBSF 250 μ M.) Mit einem FITC-konjugierten anti-hADAM-17 AK wurde eine Färbung von ADAM-17 durchgeführt und die Fluoreszenz bestimmt. Als Negativkontrolle diente eine einmalige Inkubation mit dem FITC-konjugierten Isotyp-AK. **a)** ADAM-17-Oberflächenexpression der THP-1-Monozyten **b)** ADAM-17-Oberflächenexpression der mit PMA und spezifischen Inhibitoren inkubierten Monozyten **c)** ADAM-17-Oberflächenexpression des in b) gezeigten Experiments im Balkendiagramm, um die deutliche Abnahme der ADAM-17-Oberflächenexpression zu verdeutlichen; man beachte den aufhebenden Effekt von GW.

THP-1-Makrophagen wurden zwei Tage vor Stimulation mit Hilfe von Akkutase 10-20 min von ihrer Unterlage abgelöst, pelletiert und in einer Konzentration von Zellen 10^6 /ml Kulturmedium ausgesät. Am Tage der Stimulation wurde das Kulturmedium abgesaugt und die wieder adhärennten Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen. Danach inkubierte man die adhärennten Zellen für 30-60 min in 0,5-1 ml Stimulationsmedium, welches dann unmittelbar vor Stimulation durch 200 μ l Stimulationsmedium erneuert wurde. Um eine adäquate Hemmung der Proteasen zu erzielen, wurde mit den spezifischen Inhibitoren eine Präinkubation für 30 min

durchgeführt, nach welcher dann PMA in einer Endkonzentration von 100 nM hinzugefügt wurde. Die Stimulation sowie die Abnahme des Überstandes der Monozyten und Makrophagen und die Analyse mittels ELISA fand zu jeder Zeit parallel statt.

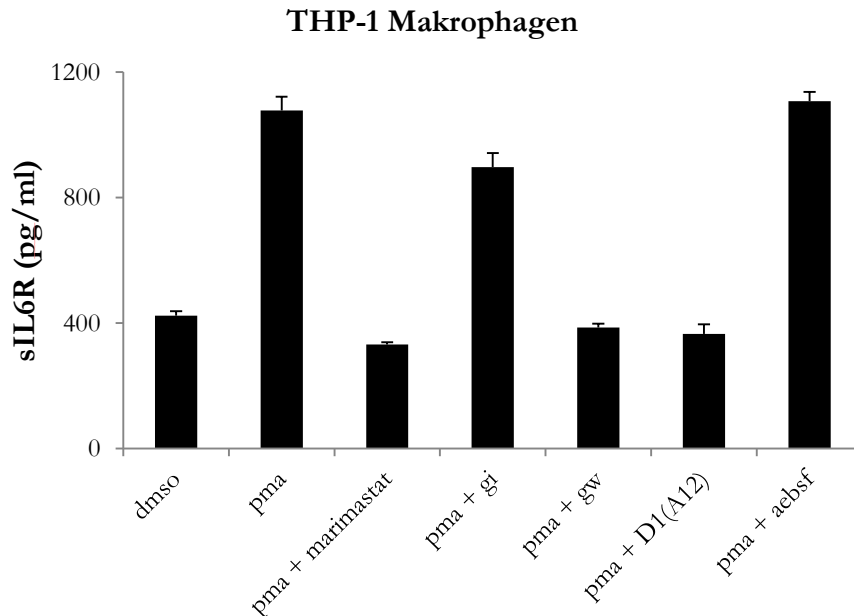


Abbildung 4.12 sIL-6R-Freisetzung nach Stimulation der THP-1 Makrophagen mit 100 nM PMA Monozytäre THP-1 Zellen wurden mittels 50 nM PMA für 3 d zu Makrophagen differenziert. Nach weiteren 7 d Ruhezeit wurde der Zellüberstand für 1 h von unbehandelten und von mit PMA behandelten Zellen gesammelt. Als Negativkontrolle diente DMSO. Es fand eine 30 min Präinkubation mit den spezifischen Proteaseinhibitoren statt. (Konzentration Inhibitoren: Marimastat, GI, GW jew. 3 μ M. AEBSF 250 μ M. D1(A12) 100 μ M.) Die Konzentration des im Überstand befindlichen sIL-6R wurde per ELISA bestimmt. SD durch Fehlerbalken repräsentiert, wobei n=3 unabhängige Experimente.

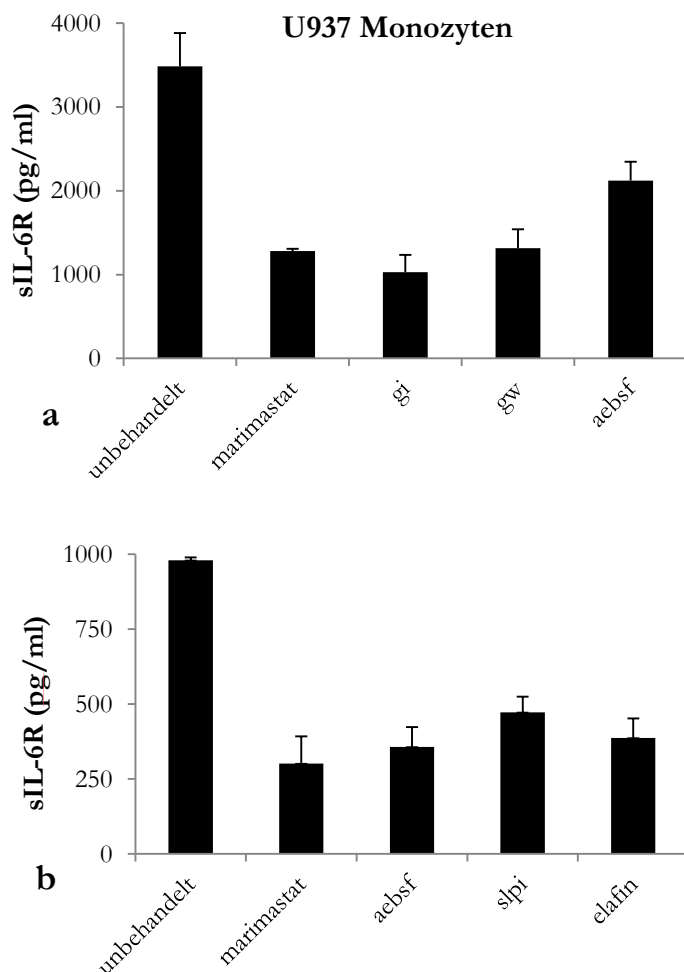
Die THP-1 Makrophagen zeigen nach einstündiger Stimulation mit PMA eine 2,5 fach erhöhte Konzentration an sIL-6R im Überstand. Ähnlich den Monozyten konnte durch Präinkubation mit jeweils D1(A12), Marimastat und GW dieses PMA-induzierte Shedding vollständig aufgehoben werden, welches eindeutig ADAM-17 als verantwortliche Protease für das Shedding identifiziert. Auch bei den Makrophagen konnte ein leicht inhibitorischer Effekt von GI auf das PMA-induzierte *Shedding* von 17% und damit von ADAM-10 nachgewiesen werden. Eine Wirkung von AEBSF und damit eine Involvierung von Serinproteasen am PMA-induzierten *Shedding* kann - wie erwartet - nicht gezeigt werden. Vergleichend ist zu beobachten, dass die THP-1-Makrophagen zu keiner Zeit mehr sIL-6R produzierten als die gleiche Anzahl an THP-1-Monozyten, obwohl eine deutliche Expressionssteigerung von ADAM-17 vorlag. Jedoch lag relativ eine deutliche Steigerung der Fähigkeit der Makrophagen, unter PMA Stimulation den IL-

6R zu *shedden*, vor (1,9 fach Monozyten zu ca. 2,5 fach Makrophagen). Da während der 60min der Inkubation mit PMA neben dem induzierten *Shedding* des IL-6R durch ADAM-17 vermutlich auch ein konstitutives *Shedding* durch vorrangig ADAM-10 stattfand, konnte bei beiden Differenzierungsstadien auch eine Inhibition durch GI zwischen 14-17% nachgewiesen werden.

4.2.2 Stimulationsversuche mit Monozyten und Makrophagen der humanen Zelllinie U937

Unterschiedliche monozytäre Zelllinien unterscheiden sich teilweise erheblich in der Expression ihrer Oberflächen-Proteasen, so exprimiert die humane Zelllinie U937 z.B. keine Matriptase (Kilpatrick et al., 2006). Daher wurde auch die humane Zelllinie U937 hinsichtlich ihres *Shedding*-Verhaltens des IL-6R - konstitutiv und stimuliert - untersucht. Stimulation der U937 Zellen erfolgten analog zu den THP-1 Monozyten und Makrophagen. Die Analyse des Zellüberstands auf sIL-6R mittels ELISA und die Ermittlung der Oberflächenexpression von IL-6R und ADAM-17 per Durchflusszytometrie fand ebenfalls streng analog zu den THP-1 Zellen statt.

4.2.2.1 Konstitutive Entstehung des löslichen IL-6-Rezeptors



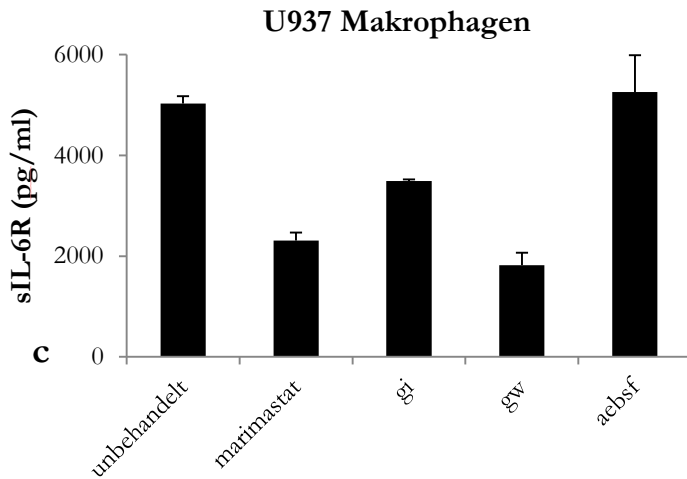


Abbildung 4.13 Die konstitutive Freisetzung des sIL-6R durch U937 Zellen Der Zellüberstand wurde für 6 h von unbehandelten und von mit spezifischen Proteaseinhibitoren behandelten U937 **Monozyten** gesammelt **a,b**. Des Weiteren wurden monozytäre U937 Zellen mittels 50 nM PMA für 3 d zu Makrophagen differenziert. Nach weiteren 7 d Ruhezeit wurde für 6h von unbehandelten und von mit spezifischen Proteaseinhibitoren behandelten U937 **Makrophagen** ebenfalls der Zellüberstand gesammelt **c**. (Konzentration Inhibitoren: Marimastat, GI, GW jew. 3 μ M. AEBSF 250 μ M. SLPI 2,5 μ M. Elafin 20 μ g/ml.) Die Konzentration des im Überstand befindlichen sIL-6R wurde per ELISA bestimmt. SD durch Fehlerbalken repräsentiert, wobei n=3 unabhängige Experimente.

Nach sechsstündiger Inkubation der U937 Zellen ohne und mit den spezifischen Proteaseinhibitoren wurden die Überstände der Zellen gesammelt und mittels ELISA auf die Konzentration des konstitutiv produzierten sIL-6R hin untersucht. Es zeigt sich eine Reduktion der sIL-6R-Konzentration auf ca. 30% des Ausgangswertes in den Überständen der U937-**Monozyten**, die mit ADAM-10 wirksamen Inhibitoren (Marimastat, GI, GW) inkubiert wurden. Es ist also anzunehmen, dass ADAM-17 an der - auf *Shedding* basierten - konstitutiven Produktion des sIL-6R keinen Anteil hat. Eine deutliche Reduktion des konstitutiven IL-6R-*Sheddings* der Monozyten kann mit dem Breitspektrum Serinprotease-Inhibitor AEBSF erreicht werden. Die Inkubation mit SLPI und Elafin hemmt die fortlaufende Freisetzung des sIL-6R auf einem ähnlich effektiven Niveau. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass mind. eine Serinprotease, und zwar wahrscheinlich NE an der konstitutiven Spaltung des IL-6R beteiligt ist. Im Überstand der **Makrophagen-ähnlichen** U937 Zellen ist die Konzentration an sIL-6R gegenüber der unbehandelten Zellen in den Proben am geringsten, in denen ADAM-10 und -17 kombiniert inhibiert wurden (zwischen 45-35% Marimastat und GW), während die alleinige Inhibition von ADAM-10 mit GI einen weniger deutlichen Effekt erzielte (ca. 70%). Das bedeutet, dass in den U937-**Makrophagen** nicht ADAM-10 allein, sondern auch eine Aktivität von ADAM-17 an der konstitutiven Entstehung des sIL-6R beteiligt ist. Die Konzentration an

sIL-6R im Überstand der U937 Makrophagen lässt sich durch Inkubation mit dem Serinprotease-Inhibitor AEBSF - wie erwartet - nicht beeinflussen. Es konnte also bei den U937-Makrophagen keine am konstitutiven *Shedding* des IL-6R beteiligte Serinprotease detektiert werden. Dieses Verhalten deckt sich weitestgehend mit dem der THP-1 Makrophagen.

Zusammenfassend lässt sich also konstatieren, dass die konstitutive Freisetzung des sIL-6R der U937 Zellen im Vergleich zu den THP-1 Zellen sehr ähnlich ist. Auch hier konnte ADAM-10 als die dominante Protease für die konstitutive Freisetzung des sIL-6R in Monozyten und Makrophagen ermittelt werden. Wie bei den THP-1 Monozyten kann bei den U937 Monozyten die Involvierung einer Serinprotease am konstitutiven IL-6R-*Shedding* angenommen werden, bei der es sich wahrscheinlich vorrangig um NE handelt.

4.2.2.2 *Entstehung des löslichen IL-6-Rezeptors durch Stimulation mit 4 β -Phorbol-12-Myristate-13-Acetat (PMA)*

Das PMA induzierte *Shedding* des IL-6R der U937 Zellen wurde ebenfalls analog zu den Stimulationsversuchen an den THP-1 Zellen analysiert. Auch hier fand, um eine adäquate Inhibition der Zielproteasen zu gewährleisten, eine halbstündige Präinkubation mit den jeweiligen Hemmstoffen statt, bevor für eine Stunde mit PMA in einer Endkonzentration von 100nM stimuliert wurde. Die Konzentration des sIL-6R im Zellüberstand der unterschiedlich stimulierten Zellen wurde per ELISA ermittelt. Die Oberflächenexpression von ADAM-17 und membrangebundenem IL-6R wurde mit Hilfe einer Immunfärbung der Zellen per Durchflusszytometrie analysiert.

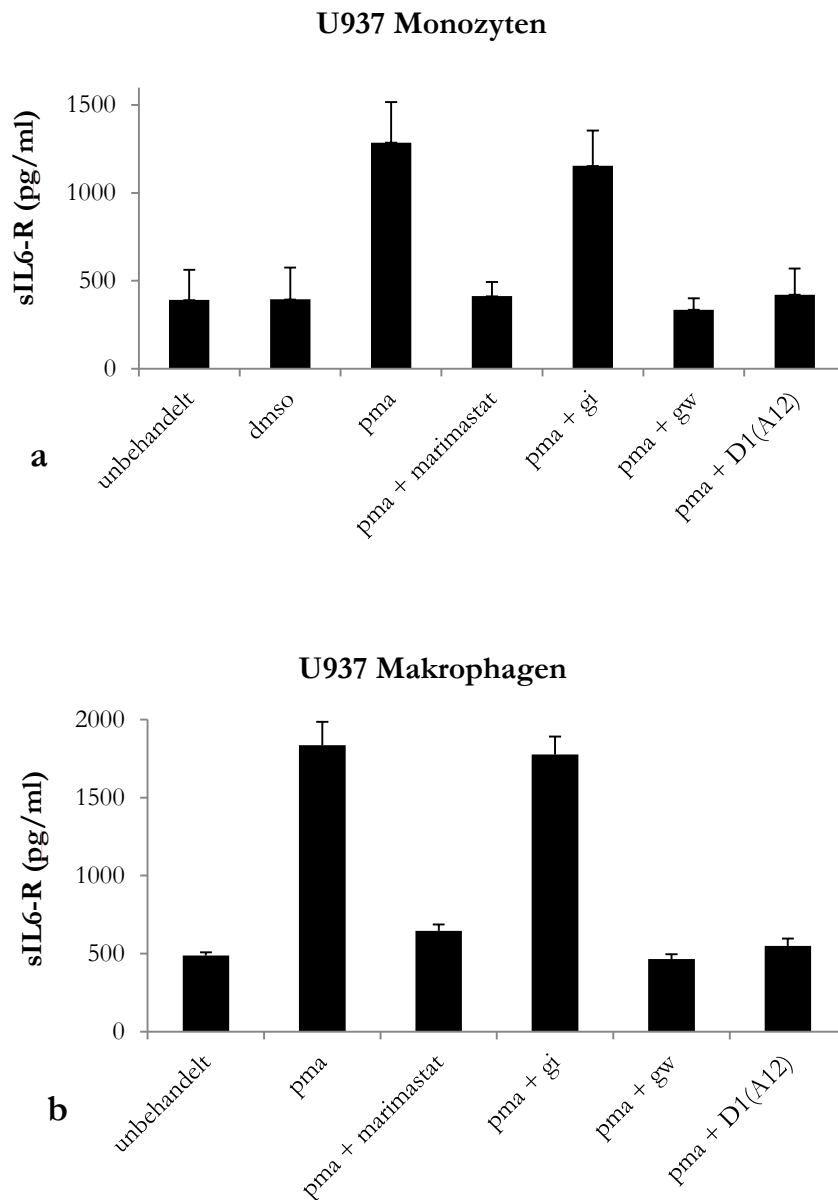


Abbildung 4.14 sIL-6R-Freisetzung nach Stimulation der U937 Zellen mit 100 nM PMA
 Der Zellüberstand wurde für 1 h von unbehandelten und von mit PMA behandelten frischen U937 **Monozyten** gesammelt, **a**. Als Negativkontrolle diente DMSO. Es fand eine 30 min Präinkubation mit den spezifischen Proteaseinhibitoren statt. (Konzentration Inhibitoren: Marimastat, GI, GW jew. 3 μ M. AEBSF 250 μ M. D1(A12) 100 μ M.) Des Weiteren wurden im Vorfeld monozytäre U937 Zellen mittels 50 nM PMA für 3 d zu **Makrophagen** differenziert. Nach weiteren 7 d Ruhezeit wurde für 1 h von unbehandelten und von mit PMA behandelten U937 **Makrophagen** ebenfalls der Zellüberstand gesammelt **b**. Die Konzentration des im Überstand befindlichen sIL-6R wurde per ELISA bestimmt. SD durch Fehlerbalken repräsentiert (n=3 unabhängige Experimente).

Nach einstündiger Stimulation der U937 Zellen mit PMA ließ sich mittels ELISA bei beiden Differenzierungsstadien eine gegenüber den unbehandelten Zellen deutlich gesteigerte Konzentration des sIL-6R im Zellüberstand nachweisen (Monozyten 3,3 fach und Makrophagen 3,7 fach). Durch Inkubation der Zellen mit Inhibitoren, die ADAM-17 potent blockieren, konnte dieser Konzentrationsanstieg aufgehoben werden (Marimastat, GW, D1(A12)). Nach Inkubation mit dem ADAM-10-spezifischen Inhibitor GI konnte bei U937 Monozyten und Makrophagen kein Effekt auf das PMA-stimulierte *Shedding* nachgewiesen werden (Abbildung 4.14).

Wenn der membrangebundene IL-6R durch ADAM-17 von der Zelloberfläche proteolytisch freigesetzt wird, so muss sich die Konzentration des IL-6R auf der Zellmembran verringern. Deshalb sollte gezeigt werden, ob die Oberflächendichte des IL-6R bei den U937 Zellen wie bei den THP-1 Zellen nach PMA Stimulation einer Veränderung unterliegt. Es wurde zu diesem Zweck eine spezifische Immunfärbung der U937 Zellen auf den IL-6R und ADAM-17 durchgeführt und durch die Messung der Fluoreszenz im Durchflusszytometer die Dichte der Proteine auf der Zelloberfläche bestimmt. Die Färbungen fanden analog zu den THP-1 Zellen statt.

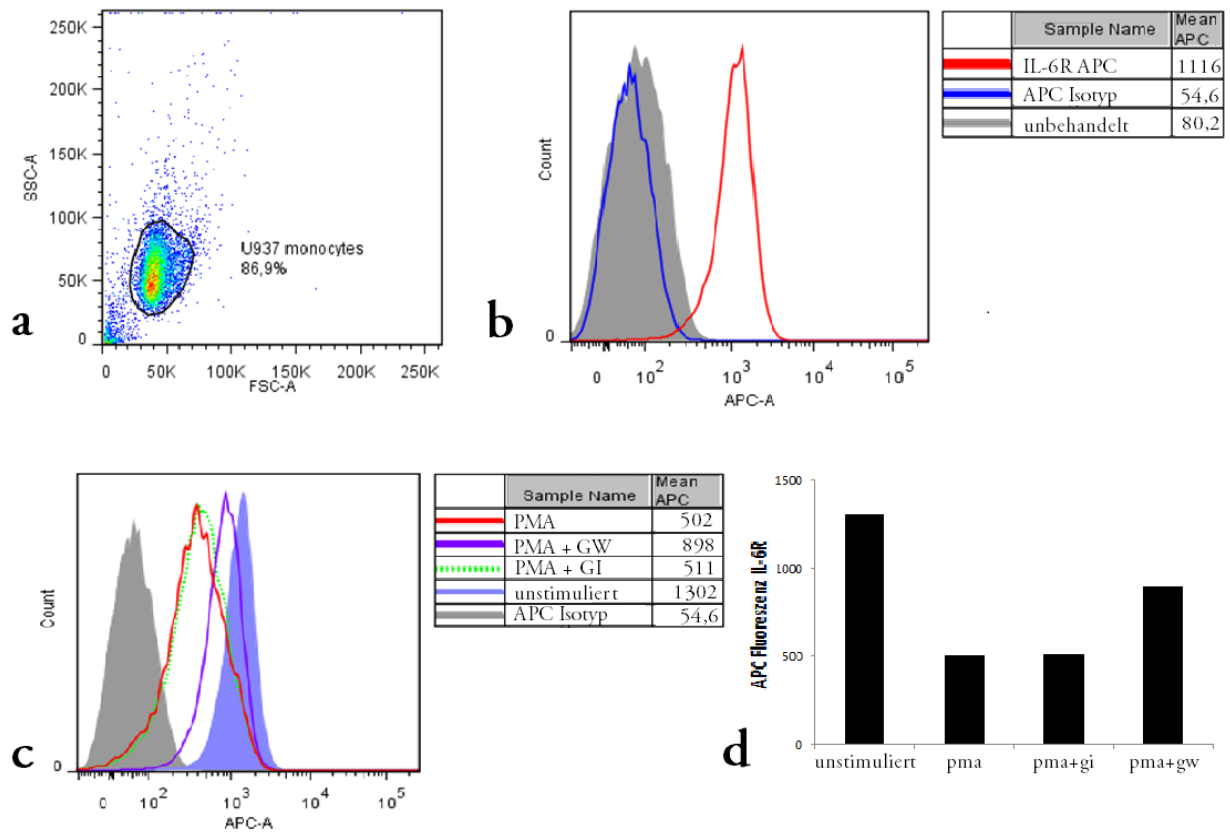


Abbildung 4.15 Oberflächenexpression des IL-6R der U937 Monozyten nach 100 nM PMA Stimulation Frische U937 Zellen wurden für 1 h mit 100 nM PMA stimuliert. Es fand eine 30 min Präinkubation mit den spezifischen Proteaseinhibitoren statt. (Konzentration Inhibitoren: GI, GW jew. 3 μ M) Mit einem anti-hIL-6R AK (4-11) und einem APC konjugierten sekundär AK wurde eine Färbung des hIL-6R durchgeführt und die Fluoreszenz bestimmt. Als Negativkontrolle diente einmalige Inkubation mit dem entspr. Isotyp-AK. **a**) Auswahl der zu betrachtenden homogenen Zellpopulation im FSC/SSC Diagramm **b**) IL-6R Oberflächenexpression der U937-Monozyten **c**) IL-6R-Oberflächenexpression der mit PMA und spezifischen Inhibitoren inkubierten U937-Monozyten; Experiment exemplarisch **d**) IL-6R-Oberflächenexpression des in c) dargestellten Experiments im Balkendiagramm, um zu verdeutlichen, wie „deckungsgleich“ die Änderung der Oberflächenexpression des IL-6R zu der in **Abbildung 4.14** gezeigten Änderung des sIL-6R-Spiegels im Zellüberstand ist.

Durch PMA Stimulation nimmt die IL-6R-Dichte auf der Zelloberfläche der Monozyten um ca. 60% ab. Dieser Effekt lässt sich mit dem ADAM-10/-17-spezifischen Inhibitor GW um die Hälfte reduzieren, jedoch nicht ganz aufheben. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der FACS-Analyse der THP-1-Monozyten. Die Inhibition von ADAM-10 hat keinen Einfluss auf die Abnahme der IL-6R-Expression nach PMA Stimulation, was sich mit den Ergebnissen des sIL-6R-ELISAs der Zellüberstände deckt.

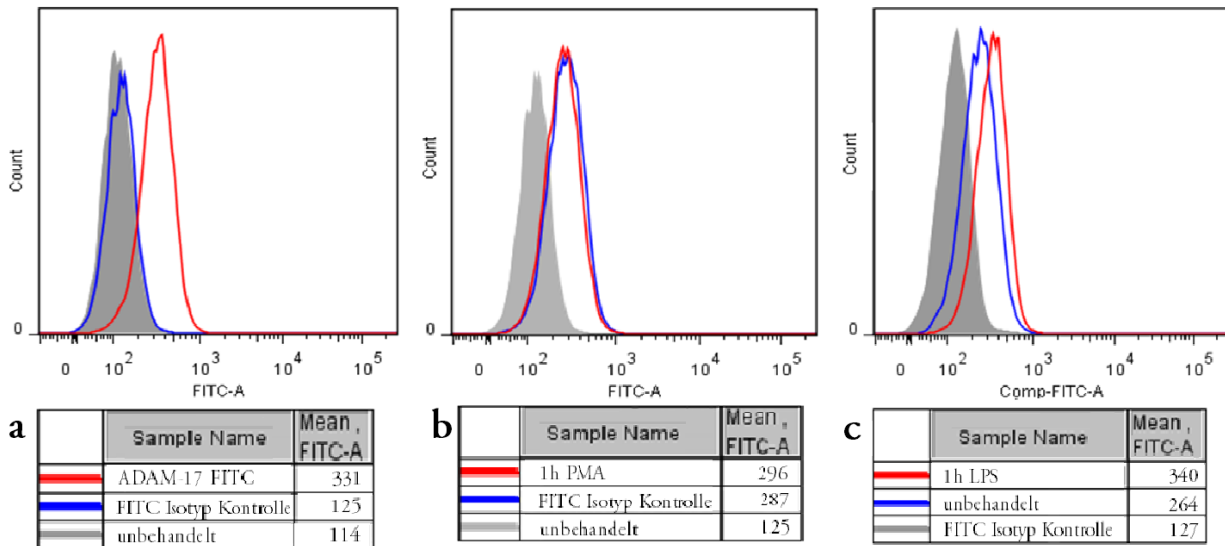


Abbildung 4.16 Oberflächenexpression von ADAM-17 der U937 Monozyten Stimulation mit PMA und LPS U937 Monozyten wurden jeweils für 1h mit 100 nM PMA oder 500 μ M LPS stimuliert. Mit einem FITC konjugierten Maus anti-hADAM-17 AK wurde eine Färbung von ADAM-17 durchgeführt und die Fluoreszenz bestimmt. Als Negativkontrolle diente einmalige Inkubation mit einem FITC-konjugierten Isotyp-AK **a)** FITC-Fluoreszenz der für ADAM-17 gefärbten Zellen. **b)** FITC-Fluoreszenz der für ADAM-17 gefärbten und mit PMA Zellen **c)** FITC-Fluoreszenz der für ADAM-17 gefärbten und mit LPS stimulierten Zellen.

Die ADAM-17-Oberflächenexpression der unterschiedlich behandelten U937 Monozyten zeigte nach PMA Stimulation - anders als bei den THP-1 Monozyten - keine signifikante Veränderung. Nach Vorbehandlung mit LPS aus Escherichia coli kann dagegen eine Zunahme der ADAM-17-spezifischen Oberflächenfluoreszenz um ca. 22% beobachtet werden.

In den U937 Zellen mit Makrophagen-ähnlichem Phänotyp konnte eine erhöhte ADAM-17-Expression festgestellt werden (siehe 4.1.3). Insgesamt ist zu konstatieren, dass die U937 Makrophagen gegenüber den Monozyten eine erhöhte sIL-6R-Produktion zeigen (sowohl konstitutiv, als auch PMA-induziert). Relativ zu **den jeweils unbehandelten Zellen** gesehen ist nach PMA-Behandlung ein stärkeres *Shedding* bei den Makrophagen zu beobachten. Eine Beobachtung, die sich auch bei den THP-1 Zellen zeigt.

4.2.3 Stimulationsversuche mit primären CD14⁺ Monozyten und Makrophagen

Monozytäre Krebszelllinien wie U937 oder THP-1 unterscheiden sich teilweise erheblich im Expressionsmuster der hier untersuchten Zytokine und Proteasen. Um einen wirklichen Einblick zu erhalten, wie der sIL-6R durch humane Monozyten produziert wird, wurden, wie unter 3.1 beschrieben, von maximal drei gesunden Spendern primäre Monozyten entnommen und isoliert. Einerseits wurden diese teilweise sofort stimuliert und nahezu analog zu den THP-1/U937

Zellen auf ihr *Shedding*-Verhalten des IL-6R hin untersucht. Andererseits wurde durch Kultivierung der primären Monozyten in hM-CSF -haltigen Kulturmedium eine Differenzierung zu Makrophagen wie unter 3.2.2 beschrieben eingeleitet. Der einzige Unterschied bestand in der Anwendung unterschiedlicher Inkubationszeiten. So wurde, um ein *Shedding* des sIL-6R zu induzieren, mit PMA und LPS für 2 h inkubiert. Die Konzentrationen der verwendeten Stimulatoren und Protease-Inhibitoren blieben gegenüber den Stimulationsversuchen der THP-1 und U937 Zellen unverändert und wie in 3.2.4 dargestellt. Dieses Vorgehen ist dem Umstand geschuldet, dass primäre Zellen nicht über so hohe endogene Level an IL-6R verfügen, wie die Krebszelllinien THP-1 und U937. Die Zellen wurden ebenfalls in einer Dichte von $2 \cdot 10^5 / 200 \text{ ml}$, also in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml stimuliert. Danach wurde der Zellüberstand per ELISA auf die Konzentration an löslichen IL-6R untersucht und im Durchflusszytometer die Oberflächenexpression des membrangebundenen IL-6R ermittelt.

4.2.3.1 Konstitutive Entstehung des löslichen IL-6R

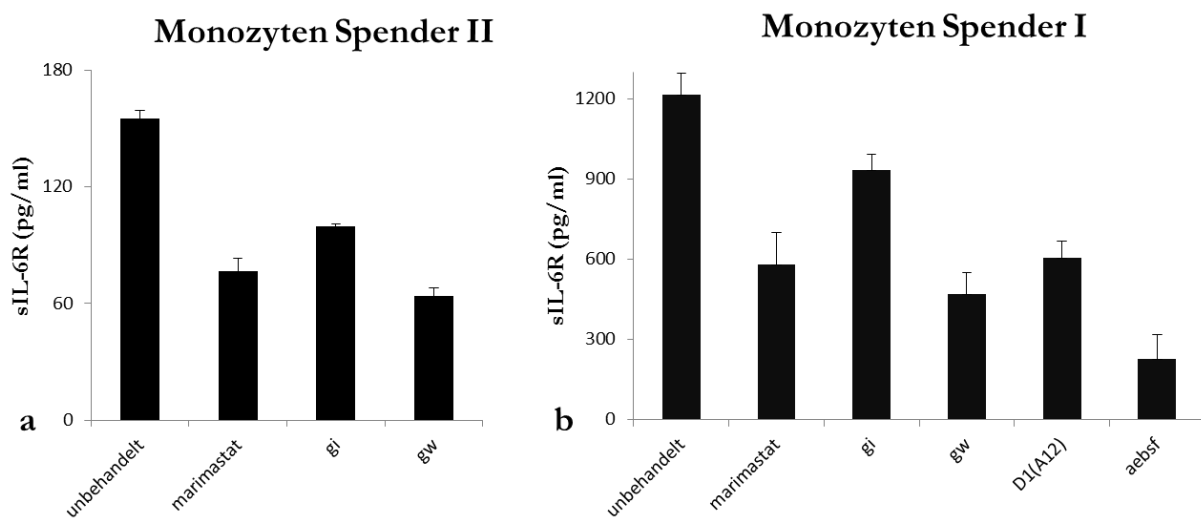


Abbildung 4.17 Konstitutive Freisetzung des sIL-6R durch primäre Monozyten CD14⁺ primäre Monozyten wurden mittels Ficoll-Gradient und MACS® aus dem Blut gesunder Spender isoliert. Es wurde für 6 h von unbehandelten und von mit spezifischen Proteaseinhibitoren behandelten Zellen der Zellüberstand gesammelt. (Konzentration Inhibitoren: Marimastat, GI, GW jew. 3 μM . AEBSF 250 μM . D1(A12) 100 μM .) Die Konzentration des im Überstand befindlichen sIL-6R wurde per ELISA bestimmt. SD durch Fehlerbalken repräsentiert, wobei $n=2$ unabhängige Experimente. sIL-6R im Zellüberstand primärer Monozyten Spender 2 **a)** und primärer Monozyten Spender 1 **b)**.

Nach 6h Inkubation zeigte der Zellüberstand der frisch aus humanem Blut isolierten **Monozyten** eine deutlich detektierbare Konzentration des sIL-6R. Diese ist wie beschrieben interindividuell

gewissen Schwankungen unterlegen (Robak et al., 1998; Robak et al., 1999; Wierzbowska et al., 1999). Diese konstitutive Produktion an sIL-6R konnte mit dem Metalloprotease-Inhibitor Marimastat und dem kombiniert ADAM-10/ADAM-17-inhibitorischen Molekül GW um mehr als 50% verringert werden. Die alleinige Inhibition von ADAM-10 durch GI hat eine Verringerung der sIL-6R-Konzentration um ca. 25-35% zur Folge. Eine ebenfalls deutliche Inhibition bis zu 45% wird mit Hilfe des ADAM-17-spezifischen inhibitorischen Antikörpers D1(A12) erreicht. Somit kann für die Hälfte des im Überstand befindlichen sIL-6R die limitierte Proteolyse des membranständigen IL-6R durch ADAM-10 und ADAM-17 gemeinsam verantwortlich gemacht werden. Einen Hinweis darauf, dass die andere Hälfte des produzierten sIL-6R auf die Aktivität einer Serinprotease zurückzuführen ist, lieferte die deutlich verminderte sIL-6R-Konzentration im Überstand der Zellen, die mit dem Serinprotease-Inhibitor AEBSF behandelt wurden (Abbildung 4.17).

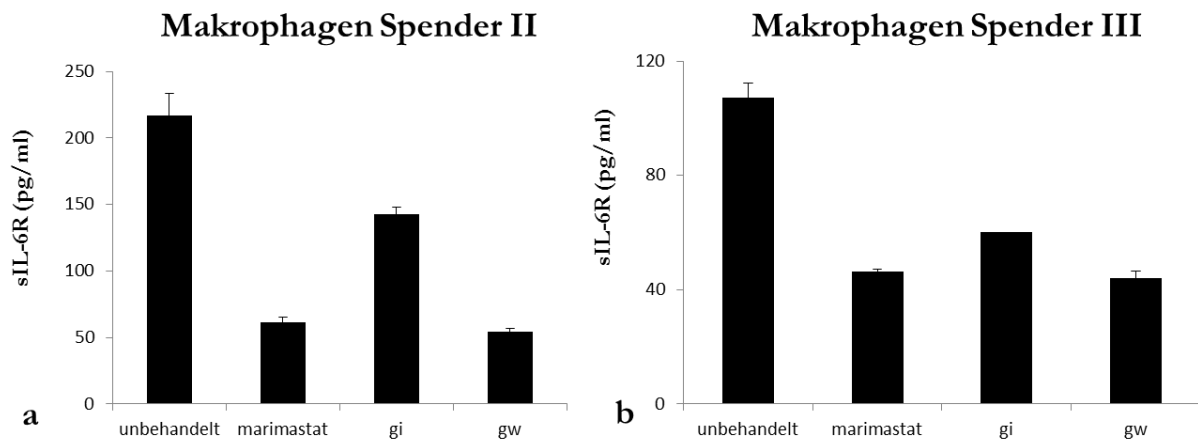


Abbildung 4.18 Konstitutive Freisetzung des sIL-6R durch primäre Makrophagen CD14⁺ primäre Monozyten wurden mittels hM-CSF über 10 d zu Makrophagen differenziert. Es wurde für 6 h von unbehandelten und von mit spezifischen Proteaseinhibitoren behandelten Zellen der Zellüberstand gesammelt. (Konzentration Inhibitoren: Marimastat, GI, GW jew. 3µM). Die Konzentration des im Überstand befindlichen sIL-6R wurde per ELISA bestimmt. SD durch Fehlerbalken repräsentiert (n=2 unabhängige Experimente). **a)** sIL-6R im Zellüberstand differenzierter Makrophagen Spender II **b)** sIL-6R im Zellüberstand differenzierter Makrophagen Spender III

Die mittels hM-CSF differenzierten primären Makrophagen wurden ebenfalls 6h zeitgleich mit denselben Proteaseinhibitoren inkubiert und der Zellüberstand auf die sIL-6R-Konzentration mittels ELISA überprüft. Auch die Auswertung der hier dargestellten Ergebnisse fand zeitgleich statt und die untersuchten Zellen stammen von denselben Spendern (Abbildung 4.18). Unbehandelt kann bei den Makrophagen, wie bei den Monozyten eine individuell sehr unterschiedliche IL-6R-Konzentration im Zellüberstand ermittelt werden. Die mit den

Inhibitoren Marimastat und GW behandelten Zellen zeigten eine um ca. 70% verringerte Konzentration an sIL-6R im Zellüberstand. Die sehr geringe Diskrepanz in der Effektivität dieser beiden Inhibitoren deutet darauf hin, dass keine andere Metalloprotease an dem konstitutiven *Shedding* des humanen IL-6R beteiligt ist, als ADAM-10 und -17. Die alleinige Blockade von ADAM-10 durch GI führte zu einer Verringerung der sIL-6R-Konzentration im Überstand um ca. 45%. Somit ist auch bei den Makrophagen das Entstehen des sIL-6R zu einem erheblichen Teil auf limitierte Proteolyse des membranständigen Rezeptors zurückzuführen. Dabei ist dieses konstitutive *Shedding* sowohl auf die Aktivität von ADAM-10 als auch ADAM-17 zurückzuführen.

4.2.3.2 Entstehung des löslichen IL-6-Rezeptors durch Stimulation mit 4 β -Phorbol-12-Myristate-13-Acetat (PMA)

Die Ergebnisse aus den Stimulationsversuchen mit THP-1 und U937 Zellen sollten anhand primärer Monozyten und Makrophagen nachvollzogen werden. Wie beschrieben, wurden die aus humanem Blut isolierten Zellen stimuliert und deren Überstände analog zu den bereits durchgeführten Experimenten per ELISA auf die Konzentration an sIL-6R untersucht. Es wurde außerdem mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Oberflächenkonzentration des IL-6R, ADAM-10 und ADAM-17 bestimmt.

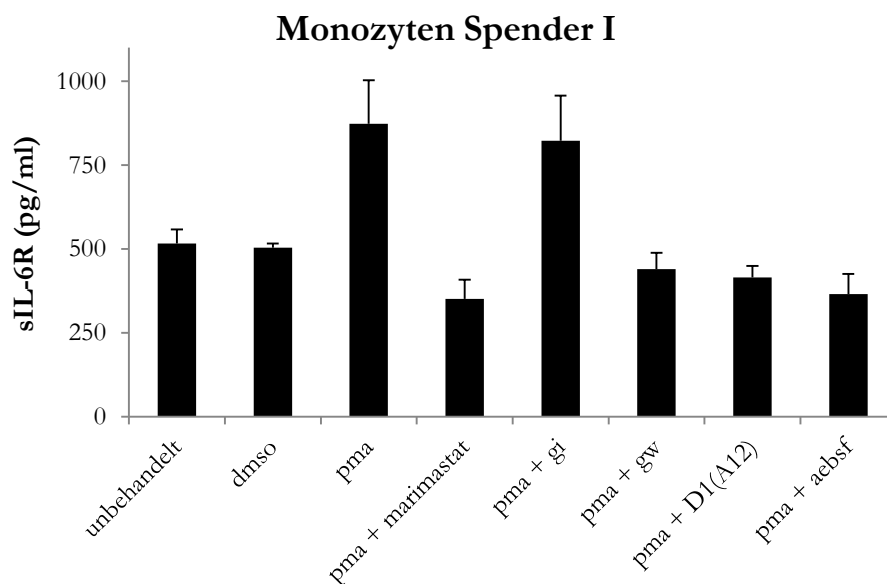


Abbildung 4.19 PMA-induzierte Freisetzung des sIL-6R in primären Monozyten CD14⁺ primäre Monozyten wurden mittels Ficoll-Gradient und MACS® aus dem Blut gesunder Spender isoliert. Es wurde für 2 h mit 100 nM PMA stimuliert und von unbehandelten und von mit spezifischen Proteaseinhibitoren vorbehandelten Zellen der Zellüberstand gesammelt. (Konzentration Inhibitoren: Marimastat, GI, GW jew. 3 μ M. AEBSF 250 μ M. D1(A12) 100 μ M.)

Die Konzentration des im Überstand befindlichen sIL-6R wurde per ELISA bestimmt. DMSO als Negativkontrolle. SD durch Fehlerbalken repräsentiert (n=2 unabhängige Experimente).

Nach zweistündiger Inkubation mit PMA zeigte sich im Zellüberstand der primären Monozyten eine ca. 1,7-fach erhöhte sIL-6R-Konzentration gegenüber den unbehandelten Zellen (respektive gegenüber den DMSO-Kontrollzellen). In gleichem Maße konnte diese erhöhte sIL-6R-Konzentration durch ADAM-17-spezifische Inhibitoren wie Marimastat, GW und den Antikörper D1(A12) unterdrückt werden. Vorbehandlung mit dem rein ADAM-10-inhibitorischen Molekül GI führte zu keinem Effekt auf das durch PMA induzierte *Shedding* des IL-6R. Interessanterweise konnte durch den pan-Serinproteaseinhibitor AEBSF ebenfalls ein aufhebender Effekt von mehr als 50% erzielt werden (Abbildung 4.19). Um nachzuweisen, dass der sIL-6R im Überstand von der Zelloberfläche der Monozyten stammt, wurde eine Immunfärbung durchgeführt und die Fluoreszenz im Durchflusszytometer bestimmt. Auch die Oberflächen-expression von ADAM-10 und ADAM-17 wurde auf diese Weise vor und nach PMA-Stimulation untersucht.

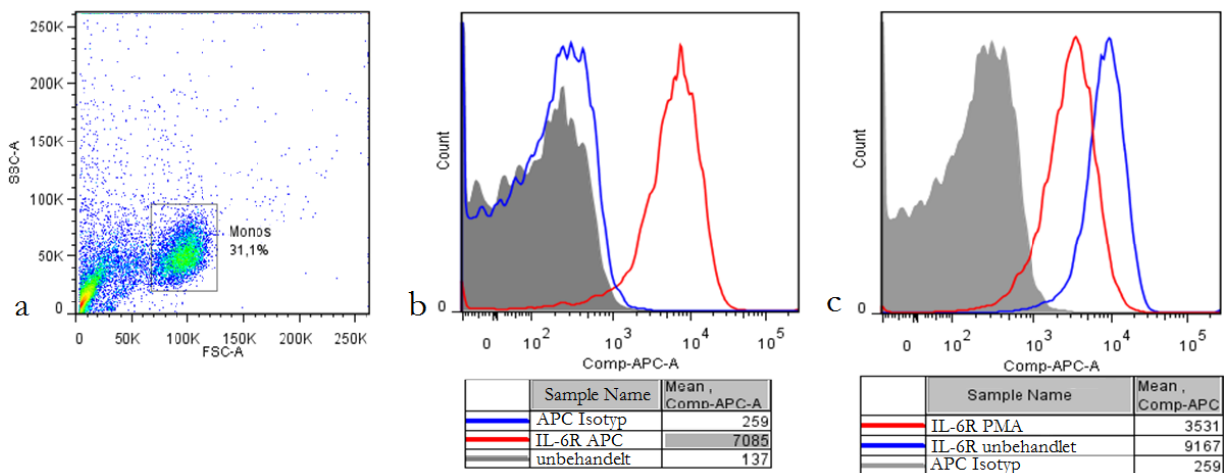


Abbildung 4.20 Oberflächenexpression des IL-6R vor und nach PMA-Stimulation CD14⁺ primäre Monozyten wurden mittels Ficoll-Gradient und MACS® aus dem Blut gesunder Spender isoliert und für 2 h mit 100 nM PMA stimuliert. Die hIL-6R-Oberflächenexpression wurde per FACS-Analyse bestimmt. Als Negativkontrolle diente einmalige Inkubation mit einem APC-konjugierten Isotyp-AK. **a)** Auswahl der zu betrachtenden homogenen Zellpopulation im FSC/SSC Diagramm **b)** Oberflächenexpression des IL-6R auf CD14⁺ Monozyten, Histogramm **c)** Oberflächenexpression des IL-6R auf CD14⁺ Monozyten nach PMA-Stimulation.

Nach Immunfärbung der Monozyten mit einem hIL-6R-spezifischen AK wurde im Durchflusszytometer die Oberflächenexpression des IL-6R bestimmt. Der IL-6R ließ sich auf der

Oberfläche der primären Monozyten gut nachweisen, wobei nach PMA-Stimulation die IL-6R-Oberflächenexpression stark abnahm (um ca. 60%).

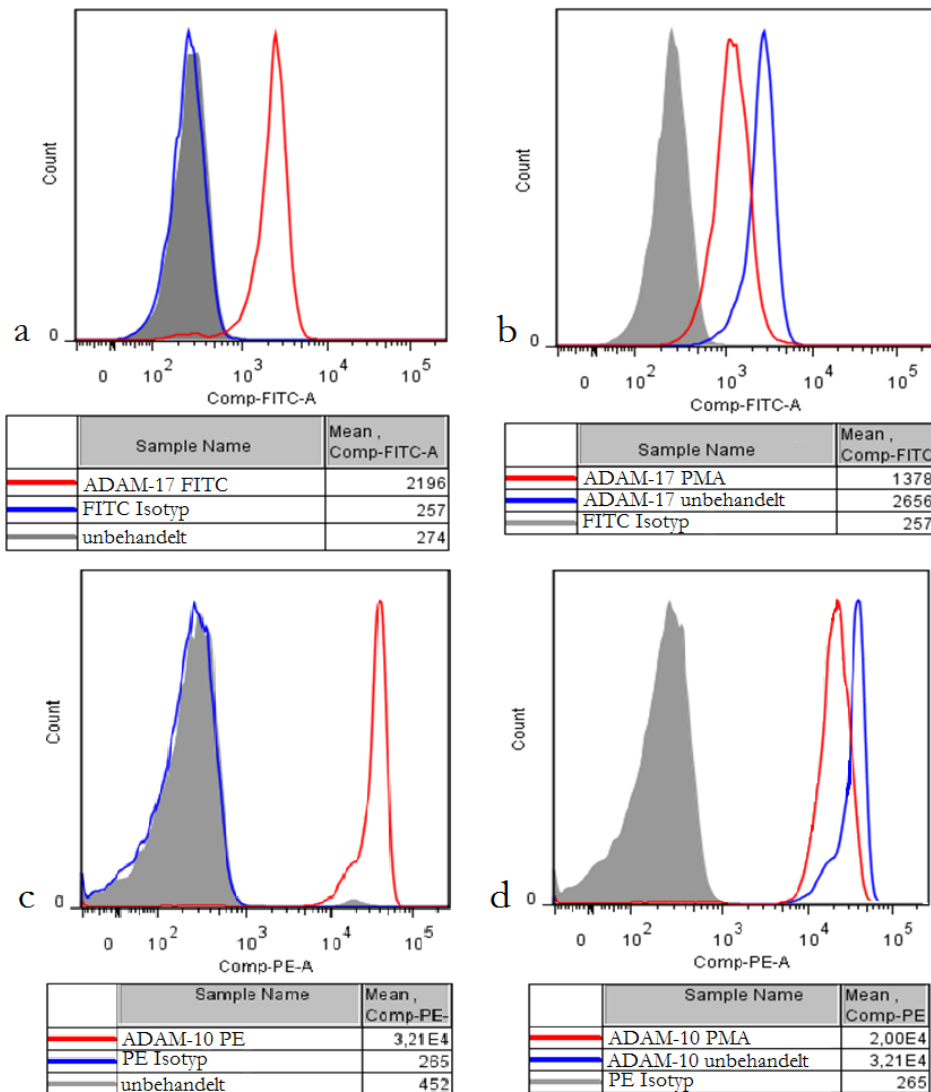


Abbildung 4.21 Oberflächenexpression von ADAM-10 und ADAM-17 primärer Monozyten unter PMA-Stimulation CD14⁺ primäre Monozyten wurden mittels Ficoll-Gradient und MACS® aus dem Blut gesunder Spender isoliert. Es wurde für 2 h mit 100 nM PMA stimuliert. Die ADAM-17-(FITC)- und ADAM-10 (PE)-Oberflächenexpression wurde per FACS-Analyse bestimmt. Als Negativkontrolle diente einmalige Inkubation mit einem APC-konjugierten Isotyp-AK. **a)** deutlicher Nachweis der ADAM-17-Oberflächenexpression auf den primären Monozyten **b)** ADAM-17-Oberflächenexpression nimmt nach PMA-Stimulation um ca. die Hälfte ab **c)** deutlicher Nachweis der ADAM-10-Oberflächenexpression auf primären Monozyten **d)** Abnahme der ADAM-10-Oberflächenexpression nach PMA-Stimulation.

Sowohl ADAM-10 als auch ADAM-17 konnten deutlich auf der Zelloberfläche der primären Monozyten nachgewiesen werden (Abbildung 4.21 a; c). Auf THP-1-Monozyten konnte nach PMA-Stimulation eine Abnahme der ADAM-17-Oberflächenexpression nachgewiesen werden

(siehe 4.2.1.2) (Doedens and Black, 2000). Dass dieses Phänomen auch für primäre Monozyten und über ADAM-17 hinaus auch für ADAM-10 zutrifft, wurde noch nicht beschrieben. Im hier dargestellten Experiment zur Untersuchung der Oberflächenexpression von ADAM-10 und -17 in primären Monozyten nach PMA-Stimulation konnte nun dieser Nachweis erbracht werden. Dabei nimmt die ADAM-17-Oberflächenexpression um ca. 50%, die von ADAM-10 um ca. 40% ab (Abbildung 4.21 b; d).

Die primären Monozyten wurden weiterhin mit Hilfe von hM-CSF zu einem Makrophagen-ähnlichen Zelltyp differenziert und zu $2 \cdot 10^5$ Zellen/200 ml ausgesät. Es fand eine Stimulation dieser Zellen zeitgleich mit den Monozyten statt. Stimuli und Inhibitoren besaßen dieselben Endkonzentrationen und Anwendungszeiten. Die Ermittlung der sIL-6R-Konzentration fand analog per ELISA statt.

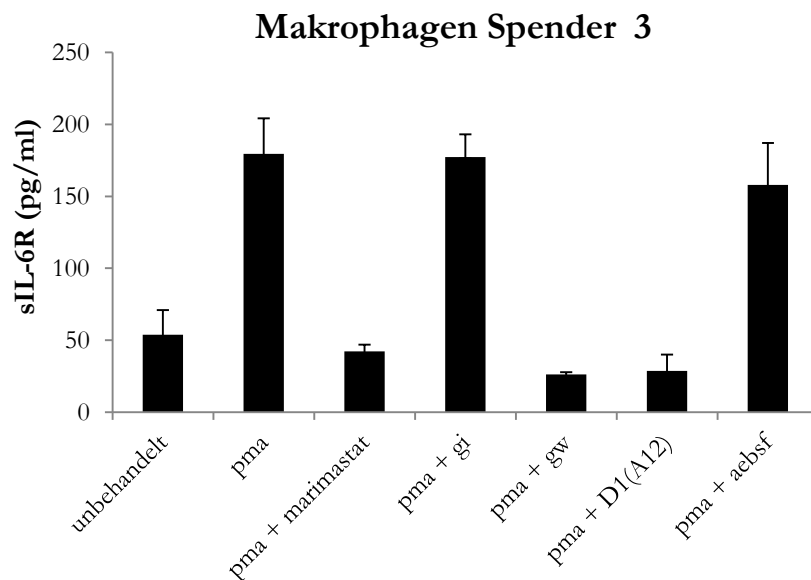


Abbildung 4.22 PMA-induzierte Freisetzung des sIL-6R durch primäre Makrophagen CD14⁺ primäre Monozyten wurden mittels Ficoll-Gradient und MACS® aus dem Blut gesunder Spender isoliert. Mittels hM-CSF Inkubation für 3 d wurden diese zu Makrophagen differenziert. Nach weiteren 7 d Ruhezeit wurde für 2 h mit 100 nM PMA stimuliert und von unbehandelten und von mit spezifischen Proteaseinhibitoren vorbehandelten Zellen der Zellüberstand gesammelt. (Konzentration Inhibitoren: Marimastat, GI, GW jew. 3 μ M. AEBSF 250 μ M. D1(A12) 100 μ M.) Die Konzentration des im Überstand befindlichen sIL-6R wurde per ELISA bestimmt. SD durch Fehlerbalken repräsentiert (n=2 unabhängige Experimente).

Nach zweistündiger Behandlung der primären Makrophagen mit dem Proteinkinase-C Aktivator PMA konnte eine Steigerung der sIL-6R-Konzentration gegenüber den unbehandelten Zellen um den Faktor 3,3 ermittelt werden. Damit war auch für primäre Zellen bei Makrophagen ein - relativ zu den jeweils unbehandelten Zellen - deutlich stärkeres PMA-induziertes *Shedding*

gegenüber den Monozyten nachweisbar (Abbildung 4.23). Diese gesteigerte sIL-6R-Produktion war vor allem auf eine ADAM-17-Aktivität zurückzuführen und ließ sich durch spezifische Inhibitoren aufheben (GW, Marimastat, D1(A12))(Abbildung 4.22). Durch Präinkubation mit dem ADAM-10-spezifischen Inhibitor GI, als auch mit dem Serinprotease-Inhibitor AEBSF konnte keine Aufhebung des PMA-induzierten *Sheddings* erreicht werden. Ergo konnte eine Beteiligung von Serinproteasen oder ADAM-10 an diesem PMA-induzierten *Shedding* des IL-6R ausgeschlossen werden (Abbildung 4.22).

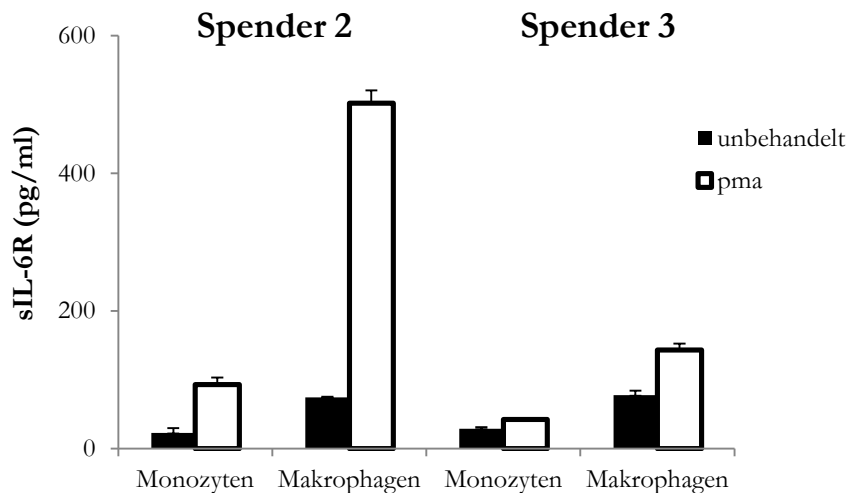


Abbildung 4.23 Vergleich des PMA induzierten IL-6R-*Sheddings* durch Monozyten und Makrophagen unterschiedlicher Spender CD14⁺ primäre Monozyten wurden mittels Ficoll-Gradient und MACS® aus dem Blut gesunder Spender isoliert. Ein Teil wurde sofort mit 100 nM PMA stimuliert. Ein Teil wurde mittels hM-CSF Inkubation für 3 d zu Makrophagen differenziert. Nach weiteren 7 d Ruhezeit wurde für 2 h mit PMA stimuliert und von unbehandelten und PMA-behandelten Zellen der Zellüberstand gesammelt. Die Konzentration des im Überstand befindlichen sIL-6R wurde per ELISA bestimmt. SD durch Fehlerbalken repräsentiert, wobei n=2 unabhängige Experimente.

Es lässt sich zusammenfassen, dass nach PMA-Stimulation in primären Monozyten und Makrophagen ein ADAM-17 vermitteltes *Shedding* des IL-6R eintritt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus den analogen Stimulationsexperimenten mit den humanen monozytären Zelllinien THP-1 und U937. Ebenfalls war sowohl bei beiden Zelllinien als auch den primären Zellen zu beobachten, dass die jeweils Makrophagen-ähnlichen Zellen insgesamt mehr sIL-6R freisetzen. Auch wurde deutlich, dass die Antwort der Makrophagen-ähnlichen Zellen (im Sinne der sIL-6R-Produktion) auf den gleichen Stimulus relativ gesehen stärker ausfiel. Dies konnte zum Teil auf eine gesteigerte Gesamt-Expression an ADAM-17 während des Differenzierungsvorgangs zurückgeführt werden. Andererseits wurde eine eventuell zu Grunde

liegende gesteigerte Expression des IL-6R nicht untersucht. Eine Änderung der IL-6R-Expression während der Makrophagedifferenzierung wurde bis jetzt nicht beschrieben.

4.2.3.3 Entstehung des löslichen IL-6-Rezeptors durch Stimulation mit LPS

Monozytäre Zellen exprimieren Rezeptoren zur Erkennung bakterieller und viraler Antigene, so z.B. *Toll-like* Rezeptoren. Es ist bekannt, dass nach Aktivierung des *Toll-like* Rezeptors 4 (TLR 4) eine Expressionssteigerung von ADAM-17 und dessen Substraten, wie TNF α oder TNFR1, stattfindet (Chanthaphavong et al., 2012). Dies führt ebenfalls zu einem verstärkten *Shedding* dieser Proteine. Nachfolgend sollte untersucht werden, ob die LPS-induzierte, TLR4-vermittelte Aktivitätssteigerung von ADAM17 auch zu einem vermehrten *Shedding* des IL-6R in primären Monozyten führen kann. Dazu wurden, ähnlich dem unter 4.2.3.2 beschriebenen Stimulationsexperiment die aus humanem Blut isolierten primären Monozyten für 2h mit LPS (1 μ g/ml) stimuliert. Per ELISA wurde die im Zellüberstand ermittelte Konzentration an sIL-6R mit der von unbehandelten Zellen verglichen. Ebenfalls fand eine Präinkubation mit verschiedenen Inhibitoren statt, um die eventuell am *Shedding* beteiligte(n) Protease(n) zu identifizieren.

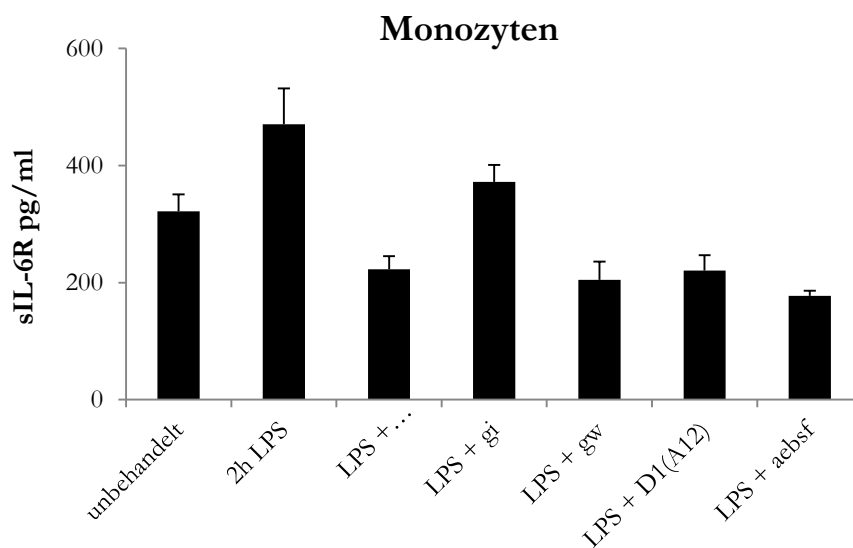


Abbildung 4.24 LPS-abhängige Produktion des sIL-6R durch primäre monozytäre Zellen CD14⁺ primäre Monozyten wurden mittels Ficoll-Gradient und MACS® aus dem Blut gesunder Spender isoliert und für 2 h mit LPS stimuliert. Von unbehandelten und mit spezifischen Proteaseinhibitoren behandelten Zellen wurde der Zellüberstand gesammelt (Konzentration Inhibitoren: Marimastat, GI, GW jew. 3 μ M. D1(A12) 100 nM. AEBSF 250 μ M.) und die Konzentration des im Überstand befindlichen sIL-6R per ELISA bestimmt. SD durch Fehlerbalken repräsentiert (n=2 unabhängige Experimente).

Nach zweistündiger Behandlung der primären Monozyten konnte eine Erhöhung des sIL-6R-Spiegels im Zellüberstand um den Faktor 1,5 nachgewiesen werden. Diese Steigerung konnte durch Vorbehandlung mit ADAM-17-spezifischen Inhibitoren (Marimastat, GW, D1(A12)) auf ein Niveau unterhalb des Wertes der unbehandelten Zellen gesenkt werden (Abbildung 4.24). Die Vorbehandlung mit GI und damit Inhibition von ADAM-10 bewirkt ebenfalls eine Reduktion des sIL-6R-Spiegels, jedoch nur um etwa 22%. Auch die Präinkubation mit dem Serinprotease-Inhibitor AEBSF bewirkt eine Reduzierung des sIL-6R-Spiegels im Zellüberstand von über 60%. Verglichen mit dem Anstieg des sIL-6R im Überstand von Zellen, die z.B. mit PMA oder stimuliert wurden, ist das IL-6R-*Shedding* durch LPS-Stimulation aber eher als moderat einzuschätzen.

4.2.3.4 *Entstehung des löslichen IL-6-Rezeptors durch Stimulation mit BzATP*

Die Aktivierung von PKC durch PMA mit folgend erhöhter ADAM-17-Aktivität ist ein sehr artifizierender Vorgang. Um einen differenzierteren Blick auf den Vorgang des IL-6R-*Sheddings* zu erhalten, ist es notwendig, bekannte physiologische Stimuli von Monozyten und Makrophagen einzusetzen. ATP ist ein physiologischer Stimulus, der in hoher Konzentration von sterbenden Zellen und in entzündeten Geweben freigesetzt wird. Er wirkt über P2X7 Rezeptoren und führt u.a. zur Freisetzung von IL-1 β und IL-18. Auch ADAM-17-vermitteltes *Shedding* des Zelladhäsionsmoleküls L-Selectin und des IL-6R durch ATP-induzierte Aktivierung des P2X7-Rezeptors konnte nachgewiesen werden. Die längerfristige Stimulation von Zellen mit dem P2X7-Agonisten BzATP führt allerdings durch einen erhöhten Einstrom von großen Kationen wie z.B. Ca²⁺ zum Zelltod (Qu and Dubyak, 2009). Um BzATP vermitteltes *Shedding* des IL-6R nachzuweisen, wurden primäre Monozyten nach Isolation aus humanem Blut eines gesunden Spenders wie in 3.1 beschrieben, analog den THP-1 Zellen für 20 min mit BzATP stimuliert. Es fand ebenfalls eine 30 minütige Präinkubation mit verschiedenen Protease-Inhibitoren statt, um die am *Shedding* beteiligten Proteasen zu identifizieren. Die Konzentration an sIL-6R im Zellüberstand wurde per ELISA standardmäßig wie in den anderen hier bereits beschriebenen Stimulationsversuchen ermittelt.

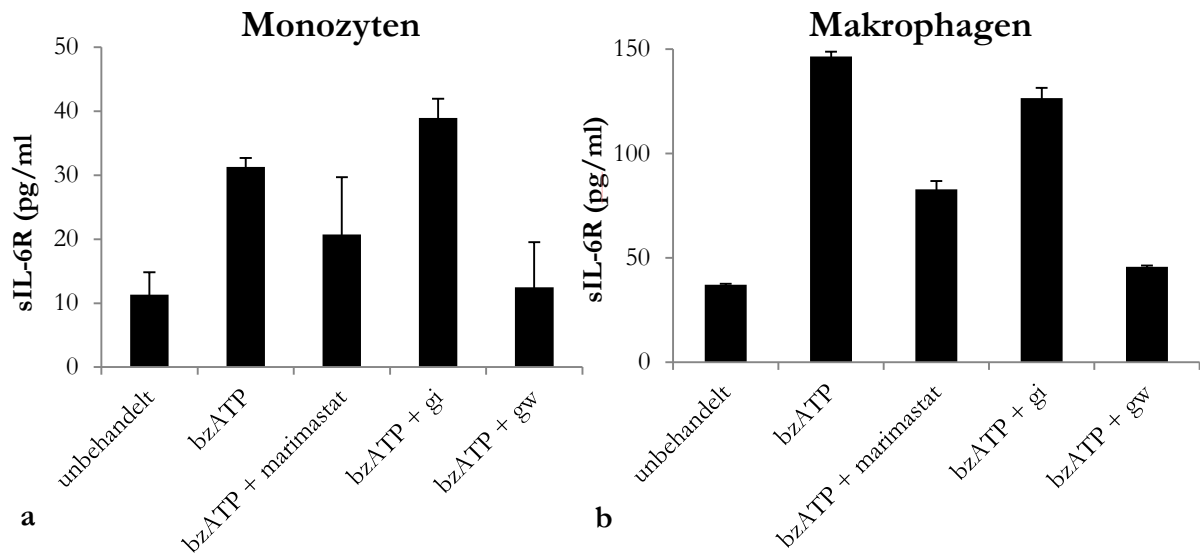


Abbildung 4.25 BzATP-abhängige Produktion des sIL-6R durch primäre monozytäre Zellen CD14⁺ primäre Monozyten wurden mittels Ficoll-Gradient und MACS® aus dem Blut gesunder Spender isoliert. Ein Teil wurde sofort mit 500 μ M BzATP stimuliert, ein anderer Teil mittels hM-CSF zu Makrophagen differenziert. Nach weiteren 7d Ruhezeit wurde für 20min mit BzATP stimuliert und von unbehandelten und mit spezifischen Proteaseinhibitoren behandelten Zellen der Zellüberstand gesammelt. (Konzentration Inhibitoren: GI, GW jew. 3 μ M.) Die Konzentration des im Überstand befindlichen sIL-6R wurde per ELISA bestimmt. SD durch Fehlerbalken repräsentiert, wobei n=2 unabhängige Experimente. sIL-6R im Zellüberstand mit BzATP stimulierter primärer Monozyten **a)** und Makrophagen **b)**.

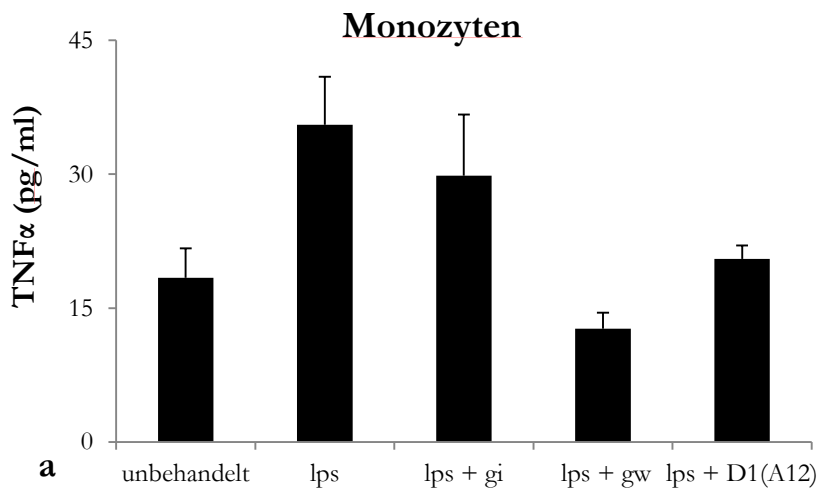
Aufgrund der auf 20 min verkürzten Inkubationszeit mit BzATP, um Nebeneffekte durch absterbende Zellen zu minimieren, zeigen unbehandelte Zellen wenig sIL-6R im Überstand. Im Zellüberstand der **primären Monozyten** konnte nach Behandlung mit BzATP ein deutlicher, ca. 3-facher Anstieg der sIL-6R-Konzentration ermittelt werden (Abbildung 4.25). Dieser Anstieg konnte durch den ADAM-10-spezifischen Inhibitor GI nicht aufgehoben werden. Im Gegensatz dazu führte eine Vorbehandlung mit dem pan-Metalloprotease-Inhibitor Marimastat, sowie dem ADAM-10/ADAM-17-spezifischen Inhibitor GW zu einer Reduktion des erhöhten sIL-6R-Spiegels im Zellüberstand. Im Mittel betrug diese Verminderung ca. 34% für Marimastat bzw. ca. 60% für GW. Ein ca. 4-fach erhöhter Spiegel an sIL-6R konnte auch im Überstand der **primären Makrophagen** nach 20 min BzATP Stimulation ermittelt werden. Diese - in Relation zu den Monozyten - stärkere Generierung des sIL-6R nach BzATP Stimulation konnte im analogen Experiment auch bei den THP-1 Zellen beobachtet werden. Ähnlich den primären Monozyten kann durch eine Präinkubation mit GI nur eine marginale Inhibition des IL-6R-*Sheddings* erreicht werden. Eine Vorbehandlung der stimulierten Makrophagen mit Marimastat und GW führte zu einer Verminderung des erhöhten sIL-6R-Spiegels im Zellüberstand um ca. 45% und 70%. Zusammenfassend ist festzustellen, dass nach Stimulation primärer Monozyten und

Makrophagen mit dem P2X7-Agonisten BzATP ein starkes *Shedding* des IL-6R einsetzt und dieser Effekt durch Inhibition von ADAM-17 nahezu aufgehoben werden kann. ADAM-10 scheint bei diesem Vorgang in primären CD14⁺ monozytären Zellen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

4.2.3.5 Vergleich der TNF α Produktion von Monozyten und Makrophagen nach LPS-Stimulation

Um besser zu verstehen, welche Auswirkung auf die in 4.1.4 beschriebene Expressionssteigerung von ADAM-17 während der Makrophagendifferenzierung auf das *ectodomaine Shedding* besitzt, sollte auch das ADAM-17-abhängige *Shedding* von TNF α genauer betrachtet werden. TNF α wird vor allem von Makrophagen produziert (Belge et al., 2002). Es stellt ein wichtiges immunmodulatorisches Zytokin dar und ist unmittelbar an der Entstehung von Entzündung, Apoptose und Fieber beteiligt (Hehlgans and Pfeffer, 2005).

Primäre Monozyten wurden wie oben beschrieben aus Blut isoliert, zu Makrophagen differenziert und mit LPS aus *Escherichia coli* stimuliert. Die im Experiment betrachteten Monozyten und Makrophagen stammen aus dem Blut desselben gesunden Spenders. Durch Zugabe spezifischer Proteaseinhibitoren konnten Rückschlüsse auf die am TNF α -*Shedding* beteiligten Proteasen gezogen werden.



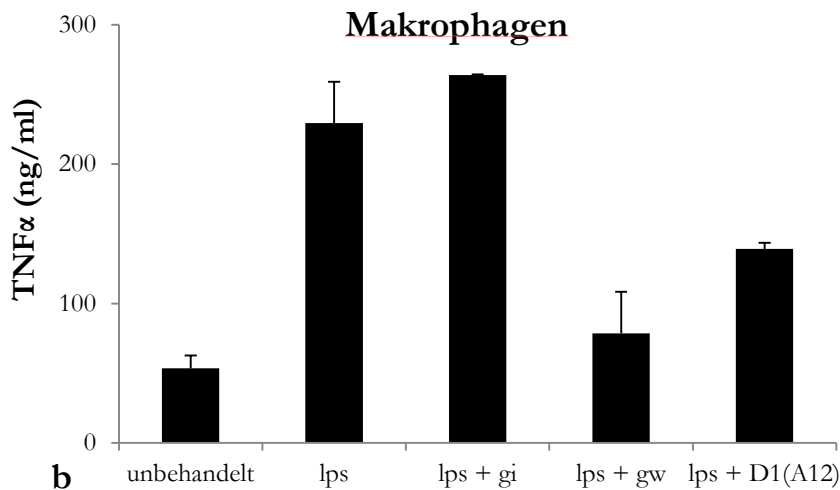


Abbildung 4.26 LPS induzierte Freisetzung von TNF α in primären Monozyten und Makrophagen CD14⁺ primäre Monozyten wurden mittels Ficoll-Gradient und MACS® aus dem Blut gesunder Spender isoliert und ein Teil wurde sofort mit 1 μ g/ml LPS stimuliert. Ein anderer Teil wurde mittels hM-CSF zu Makrophagen differenziert und nach weiteren 7 d Ruhezeit für 2 h mit LPS stimuliert. Der Zellüberstand wurde von unbehandelten und von mit spezifischen Proteaseinhibitoren behandelten Zellen gesammelt. (Konzentration Inhibitoren: GI, GW jew. 3 μ M. D1(A12) 100 nM.) Die Konzentration des im Überstand befindlichen TNF α wurde per ELISA bestimmt. SD durch Fehlerbalken repräsentiert, wobei n=2 unabhängige Experimente. TNF α im Zellüberstand mit LPS stimulierter primärer Monozyten **a)** und Makrophagen **b)**.

Die Prozessierung von proTNF α durch ADAM-17 und anderen Proteasen ist hinreichend beschrieben (Black et al., 1997; Coeshott et al., 1999). Deutlich zeigt sich bei Monozyten und Makrophagen nach LPS-Stimulation ein erhöhter TNF α -Spiegel im Überstand (Abbildung 4.26). Auch hier konnte bei Makrophagen ein deutlicherer Anstieg des TNF α -Spiegels (4,3-fach bei Makrophagen gegenüber 2-fach bei Monozyten, jeweils gegenüber dem Ausgangswert unbehandelter Zellen) nachgewiesen werden. Die Makrophagen-ähnlichen Zellen waren in der Lage, mehr TNF α (ca. 6,5-fach mehr gegenüber den Monozyten) extrazellulär freizusetzen. Dabei ist die Freisetzung von TNF α auf die Aktivität von ADAM-17 (Hemmung der LPS-abhängigen Freisetzung von TNF α durch D1(A12) um ca. 50%) zurückzuführen, wohingegen die Inhibition von ADAM-10 durch GI keinen Einfluss auf das LPS-induzierte *Shedding* von TNF α hatte.

5 Diskussion

5.1 ADAM-17 unterliegt einer Expressionssteigerung während der Makrophagen-differenzierung

Der Differenzierungsprozess vom im Blut zirkulierenden Monozyten zum gewebständigen Makrophagen ist äußerst komplex. Unterschiedliche Monozyten-Subtypen und deren heterogene Rezeptorexpression ermöglicht es diesem Teil des angeborenen Immunsystems, sehr distinkt auf verschiedene Einflüsse, wie z.B. Gewebeschäden oder bakterielle Antigene, zu reagieren (Auffray et al., 2009). Um diese Aufgaben wahrzunehmen, unterliegen einige Metalloproteasen monozytärer Zellen einer Expressionssteigerung während der Differenzierungs- und Polarisierungsphase (Newby, 2008). In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass diese Dynamik auch für ADAM-17 zutrifft - eine Protease, die als hauptverantwortlich gilt für die Freisetzung von wichtigen Entzündungsmediatoren wie sIL-6R oder TNF α und dessen Rezeptoren. Zellen der humanen monozytären Linien THP-1 und U937 wurden mittels PMA wie beschrieben einem künstlichen Differenzierungsprozess unterzogen (Baek et al., 2009; Daigneault et al., 2010). Auch aus dem Blut dreier unterschiedlicher Spender gewonnene primäre CD14⁺ Monozyten wurden mittels hM-CSF zu Makrophagen differenziert. Mit Hilfe von Western Blots konnte ein quantitativer Vergleich der ADAM-17-Protein-Expression zwischen Monozyten und Makrophagen durchgeführt werden. Es zeigte sich, dass eine deutliche Expressionssteigerung von ADAM-17 in allen drei beobachteten Zelltypen während des Differenzierungsprozesses stattfand. Anhand einer qRT-PCR wurde in den primären Monozyten und Makrophagen die beobachtete Expressionssteigerung von ADAM-17 auf mRNA-Ebene (um einen Faktor 5) bestätigt (Abbildung 4.6).

5.2 Die konstitutive Freisetzung des humanen sIL-6R durch monozytäre Zellen

Zellen, die den IL-6R exprimieren, geben diesen ständig auch in löslicher Form an den extrazellulären Raum ab (Matthews et al., 2003). Gemeinhin wird angenommen, dass für diese konstitutive Freisetzung das *Shedding* des membrangebundenen Rezeptors durch ADAM-10 und in einem gewissen Rahmen das alternative Spleißen der IL-6R-mRNA verantwortlich ist (Garbers et al., 2011a; Muller-Newen et al., 1996). Auch die Involvierung anderer leukozytärer Proteasen oder Mechanismen, wie die extrazelluläre Freisetzung des hIL-6R über Exosomen, konnten nachgewiesen werden (Schumacher et al., 2015). Um zu charakterisieren, welche Proteasen die konstitutive Freisetzung des IL-6R auf Monozyten und Makrophagen vermitteln, wurde der Zellüberstand unbehandelter THP-1-, U937- und primärer Monozyten und Makrophagen über 6

Stunden gesammelt. Durch Zugabe spezifischer Inhibitoren konnten Rückschlüsse auf die *Shedding*-Aktivität einzelner Proteasen getroffen werden. Primär muss festgestellt werden, dass wie erwartet durch keinen Protease-Inhibitor allein eine vollständige Suppression der sIL-6R-Freisetzung erreicht werden kann. Weiterhin zeigte sich, dass vorrangig durch eine ADAM-10, nicht jedoch durch eine ADAM-17-spezifische Inhibition bei THP-1 und U937-**Monozyten** eine Freisetzung des sIL-6R unterdrückt werden kann. Dies galt im Übrigen auch für THP-1-**Makrophagen**. Eindeutig jedoch konnte für primäre **Monozyten und Makrophagen**, sowie für U937-**Makrophagen** festgestellt werden, dass nicht ausschließlich ADAM-10, sondern auch ADAM-17 an der proteolytischen Freisetzung des IL-6R durch *Shedding* beteiligt ist. Anhand des spezifischen inhibitorischen Antikörpers D1-A12 konnte nachgewiesen werden, dass in vitro ADAM-17 in primären Monozyten und Makrophagen sogar die bedeutendste Protease für die konstitutive Freisetzung des sIL-6R darstellt.

Für wichtige Entzündungsmediatoren, wie $\text{TNF}\alpha$, die von ADAM-17 prozessiert werden, ist bekannt, dass auch leukozytäre Serinproteasen, wie z.B. Proteinase 3, zu deren proteolytischen Verarbeitung beitragen (Coeshott et al., 1999). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass der IL-6R in vitro ein Substrat der Serinprotease Cathepsin G darstellt (Bank et al., 1999). Bei den THP-1 Monozyten konnte die konstitutive IL-6R-Freisetzung durch Vorbehandlung mit den physiologischen Serinprotease-Inhibitoren Elafin und SLPI um ca. 25% verringert werden; durch Vorbehandlung mit dem Breitspektrum-Serinproteaseinhibitor AEBSF sogar um 45%. Dieses Ergebnis lässt mindestens zwei Szenarien zu. Zum einen könnte im gleichen Maße CG und PR3 für einen Teil des konstitutiven IL-6R-*Sheddings* verantwortlich sein. Eine Behandlung der Zellen mit beiden Inhibitoren SLPI und Elafin gleichermaßen würde dann dasselbe inhibitorische Niveau wie AEBSF erreichen. Zum anderen könnte die jeweils gleich starke inhibitorische Wirkung von Elafin und SLPI auf das konstitutive *Shedding* des IL-6R auf die Beteiligung von NE hinweisen. Dann müsste jedoch für die Differenz der inhibitorischen Wirkung von SLPI und Elafin zu AEBSF eine andere Serinprotease verantwortlich sein, wie z.B. Matriptase. Interessanterweise kann tatsächlich diese Differenz zwischen SLPI/Elafin zu AEBSF in U937 Monozyten, die bekannterweise keine Matriptase exprimieren (Kilpatrick et al., 2006), nicht beobachtet werden (Abbildung 4.13).

Die Ergebnisse der Stimulationsversuche deuten also stark darauf hin, dass sowohl in primären **Monozyten** als auch in monozytären THP-1- und U937-Zellen endogene Serinproteasen an der konstitutiven Produktion des sIL-6R beteiligt sind. Einerseits konnte mit spezifischen künstlichen (AEBSF) -und natürlichen Inhibitoren (SLPI, Elafin) die sIL-6R-Konzentration im Überstand der Zellen signifikant gesenkt werden. Andererseits zeigten die jeweils mit dem

Phorbol-Ester PMA differenzierten Makrophagen-ähnlichen Zellen dieses Verhalten nicht mehr. Dies deckt sich mit der Beschreibung, dass diese Zellen, wenn sie in einen Makrophagen-ähnlichen Zustand übergehen, normalerweise einen Großteil ihrer Serinproteasen verlieren (Dollery et al., 2003), sei dies durch gedrosselte Expression, oder schlicht durch Ausschüttung der azurophilen Granula, in der sich der größte Teil der Serinproteasen NE, CG und PR3 befinden (Lemansky et al., 2007; Rivera-Marrero et al., 2004). Diese würden unweigerlich durch die im Serum stark vertretenen Serpine (α 1-Proteinaseinhibitor, α 1-Antichymotrypsin und α 2-Makroglobulin, ca. 10% aller Plasmaproteine) neutralisiert. Hierbei ist es jedoch wichtig, zwischen membrangebundenen Serinproteasen und solchen zu unterscheiden, die in azurophilen Granula gespeichert werden. So findet sich auf Monozyten membrangebundenes aktives CG, welches z.B. Koagulationsproteine aktiviert und nicht durch Serum-Serpine inhibiert wird (Allen and Tracy, 1995; Owen, 2008). Diese Serinprotease könnte auch an der limitierten proteolytischen Spaltung des IL-6R beteiligt sein.

Insgesamt muss man feststellen, dass diese Möglichkeit für die **Serum sIL-6R-Konzentration** *in vivo* wahrscheinlich aber nur eine untergeordnete Rolle spielt. So wurde bei Patienten, die durch eine Mutation im Cathepsin C-Gen an einem totalen Mangel an aktivem NE, CG und PR3 leiden, keine veränderte Serum-Konzentration an sIL-6R, im Vergleich zu gesunden Individuen, beobachtet (Schumacher et al., 2015; Toomes et al., 1999). Dies schließt allerdings nicht aus, dass es eine Bedeutung dieser Proteasen für eine gesteigerte sIL-6R-Produktion in chronisch entzündeten oder anderweitig pathologisch veränderten Geweben gibt.

5.3 Die Freisetzung des sIL-6R durch monozytäre Zellen nach Stimulation

In den meisten wissenschaftlichen Arbeiten, die sich mit dem *Shedding* des IL-6R oder anderen Transmembranproteinen beschäftigten, wurden meist nur künstliche Stimulanzen wie PMA oder Ionomycin verwendet. Die zu untersuchende Protease und/oder das Substrat wurden häufig durch Transfektion in die zu untersuchenden Zellen eingebracht und somit aus dem physiologischen Kontext entfernt. In dieser Arbeit sollten zum einen die bestehenden Erkenntnisse gefestigt werden. Es sollte aber auch durch die Verwendung von physiologischeren Stimuli wie LPS und BzATP und durch die Betrachtung eines Zelltyps, der natürlicherweise über eine hohe endogene IL-6R-Expression verfügt, ein realistischeres Bild über die Entstehung des sIL-6R gezeichnet werden.

PMA gilt als klassischer Aktivator ADAM-17-vermittelter *Sheddings* diverser Oberflächenproteine. So ist die ADAM-17-abhängige Freisetzung des sIL-6R bereits hinlänglich beschrieben (Garbers et al., 2011a; Jones et al., 1998). Trotzdem ist der Blick auf die freigesetzten sIL-6R-Level interessant, wenn man Monozyten und Makrophagen gegenüberstehend betrachtet. **Künstliche** Überexpression von ADAM-17 führt nicht zu einer gesteigerten *Shedding*-Aktivität der betreffenden Zellen (Merlos-Suarez et al., 1998). So gilt auch für die Monozyten und Makrophagen der hier betrachteten Krebszelllinien THP-1 und U937, dass trotz einer erheblichen natürlichen Steigerung der ADAM-17-Expression während des Differenzierungsprozesses in totum nach PMA-Stimulation nicht signifikant mehr sIL-6R von den Makrophagen in den Zellüberstand abgegeben wurde. Dies könnte daran liegen, dass der IL-6R während der eher unphysiologischen, PMA-induzierten Makrophagendifferenzierung keiner Expressionssteigerung unterliegt. In U937 Zellen wurde sogar die Abnahme der IL-6R-Expression beobachtet (Oberg and Nilsson, 1992). Auch ist es denkbar, dass ADAM-17 noch auf anderem Wege aktiviert werden muss. So führt eine Stimulation mit PMA zu einer unmittelbaren Konformationsänderung von ADAM-17, die das aktive Zentrum rasch freigibt (Le Gall et al., 2010). Auch ist bekannt, dass eine erhöhte ADAM-17-Aktivität eine Phosphorylierung der Protease über ERK oder MAPK p38 voraussetzt (Xu et al., 2012). Diese führt zu einem raschen Transport von ADAM-17 zur Zelloberfläche und zum anderen zu dessen Monomerisierung mit folgender Dissoziation seines spezifischen Inhibitors TIMP3.

Für **primäre Monozyten und Makrophagen** zeigte sich, dass die absolute Menge an freigesetzten sIL-6R an den Extrazellulärraum nach PMA-Stimulation interindividuell sehr unterschiedlich war. Dies ist wahrscheinlich die Konsequenz aus der primär genetisch festgelegten Oberflächenexpression an IL-6R (Ferreira et al., 2013). Konsistent zeigte sich jedoch für alle betrachteten Zelltypen in den Stimulationsversuchen, dass die Mehrexpression an ADAM-17 in den Makrophagen-ähnlichen Zellen **relativ zum Ausgangswert gesehen (unbehandelte Zellen)** zu einer rapideren Steigerung der sIL-6R-Freisetzung führte. Zudem konnte hier für alle Spender primärer Monozyten nachgewiesen werden, dass durch die Makrophagen auch absolut mehr sIL-6R freigesetzt wird. Der Makrophage ist also fähig, schneller und stärker auf den distinkten Stimulus zu reagieren. Dies gilt auch für die Stimulation durch BzATP sowie für die LPS-induzierte Freisetzung von TNF α (Abbildung 4.25Abbildung 4.26).

Es konnte beobachtet werden, dass die Oberflächenexpression von ADAM-10 und ADAM-17 in monozytären Zellen nach PMA Stimulation abnimmt (siehe 4.2.1.2; 4.2.3.2). Dieses Phänomen wurde bereits für ADAM-17 in THP-1 Zellen und einigen andere Zelltypen beschrieben, noch nicht jedoch für primäre Monozyten und nicht für ADAM-10 (Doedens and Black, 2000). Die Autoren gehen davon aus, dass ADAM-17 nach PMA-Stimulation internalisiert wird. So konnte in Zellüberständen PMA stimulierter Zellen kein ADAM-17 detektiert werden (siehe 4.2.1.2; (Doedens and Black, 2000)). Außerdem konnte mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Aufnahmen die spezifische Aufnahme von ADAM-17 ins Innere der Zellen nach PMA-Stimulation nachgewiesen werden. Unter Bedingungen, die Clathrin-abhängige Endozytose blockieren, kam es nicht mehr zur Abnahme der ADAM-17-Oberflächenexpression nach PMA-Stimulation. Interessanterweise findet in Zellen, die mit GW 208264, einem spezifischen Inhibitor von ADAM-10 und ADAM-17, vorbehandelt wurden, keine Abnahme der Oberflächenexpression von ADAM-17 statt (Abbildung 4.11Abbildung 4.16). Ein ähnlicher Effekt wurde ebenfalls von Doedens und Black unter Zuhilfenahme des wenig spezifischen Hydroxamat-Inhibitors IC3 beobachtet. Eine Konformationsänderung von ADAM-17 durch den gebundenen Inhibitor mit folgender Resistenz gegen die Internalisierung könnte eine Erklärung dieses Phänomens sein. Die andere Möglichkeit bestünde in der Inhibition einer an der Endozytose beteiligten unbekanntenen Metalloprotease.

6 Zusammenfassung

Interleukin-6 (IL-6) ist ein Zytokin mit weitreichendem Wirkspektrum. Seine Pleiotropie reicht von der Induktion von Akut-Phase-Proteinen über Leberregeneration und Osteoklastenformation bis hin zur Steuerung wichtiger immunologischer Prozesse. So steuert IL-6 die Proliferation und Differenzierung von Leukozyten oder deren Chemotaxis. IL-6 wirkt über die Dimerisierung eines ubiquitär exprimierten β -Rezeptor gp130, bindet jedoch direkt an einen membranständigen IL-6- α -Rezeptor (IL-6R), dessen Expressionsmuster sich auf Hepatozyten und manche Leukozyten beschränkt. Es kommt auch eine lösliche Form des IL-6R (sIL-6R) vor, generiert durch alternatives Spleißen, vor allem aber auch durch limitierte Proteolyse des membranständigen Rezeptors. Dieses sogenannte IL-6R-*Shedding* erfolgt von Proteasen der ADAM (*a desintegrin and metalloprotease*)-Klasse. Der sIL-6R ist in der Lage, spezifisch IL-6 zu binden und zu einer gp130-Aktivierung auf Zellen zu führen, die den membranständigen IL-6R nicht exprimieren. Dieses als IL-6-*trans-signaling* bezeichnete Phänomen spielt eine bedeutende Rolle in zahlreichen pathologischen Vorgängen. Aufgrund bislang nicht ausreichender Erkenntnisse, wie der sIL-6R physiologischer Weise entsteht, liegt es nahe, die zugrunde liegenden Mechanismen an Zellen zu untersuchen, welche den IL-6R natürlicherweise exprimieren. Überdies ist es sinnvoll, einen Zelltyp zu betrachten, der nachgewiesenermaßen durch Produktion des sIL-6R in pathologischen Vorgängen eine zentrale Rolle spielt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Freisetzung des sIL-6R durch humane monozytäre Zellen untersucht. Dazu wurden sowohl Zellen der humanen Zelllinien THP-1 und U937, als auch primäre, aus Blut isolierte Monozyten betrachtet. Im nächsten Schritt wurden diese Zellen einer Differenzierung zu Makrophagen unterzogen. Zum einen wurde beleuchtet, welche Proteasen an der konstitutiven Entstehung des sIL-6R beteiligt sind. Zum anderen wurde untersucht, ob der Differenzierungsprozess per se einen Einfluss auf die Fähigkeit der Zellen besitzt, den sIL-6R zu generieren. Die unterschiedlichen Zelltypen wurden ebenfalls verschiedenen Stimuli ausgesetzt, die erwiesenermaßen die Freisetzung des sIL-6R erhöhen und das so induzierte IL-6R-*Shedding* auf die beteiligten Proteasen hin untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die für das IL-6R-*Shedding* wichtige Protease ADAM-17 im Differenzierungsprozess des Monozyten zum Makrophagen einer deutlichen Expressionssteigerung unterliegt. Dies führt u.a. dazu, dass Makrophagen, vor allem wenn ein entsprechender Stimulus (z.B. PMA, BzATP, LPS) vorliegt, deutlich mehr sIL-6R freisetzen können als Monozyten. Dies gilt auch für das wichtige immunmodulatorische Zytokin TNF α . Speziell für primäre Monozyten und Makrophagen ließ sich feststellen, dass bei der **konstitutiven** Freisetzung des sIL-6R ADAM-17 neben ADAM-10 die zentrale Rolle spielt. Auch ist es sehr

wahrscheinlich, dass sowohl an der konstitutiven Produktion des sIL-6R als auch nach Stimulation des IL-6R-*Sheddings* leukozytäre Serinproteasen beteiligt sind. Eine genaue Identifikation dieser Protease gelang nicht zweifelsfrei. Die Ergebnisse deuten aber auch darauf hin, dass die Fähigkeit zur Produktion des sIL-6R durch primäre Monozyten interindividuell deutlichen Schwankungen unterliegen kann. Die für THP-1 Zellen beschriebene Abnahme der ADAM-17-Oberflächenexpression nach PMA-Stimulation konnte auch bei primären Monozyten festgestellt werden. Dieses Phänomen betraf auch ADAM-10. Nachdem U937-Zellen bakteriellen Antigenen ausgesetzt wurden, nahm die ADAM-17-Oberflächenexpression zu.

7 Ausblick

Die dargestellten Ergebnisse berücksichtigen die Plastizität des untersuchten Zelltyps nur marginal. So wurden vor allem „naive“ Makrophagen in ihrem *Shedding*-Verhalten untersucht und es wäre interessant, Makrophagen in verschiedenen Polarisierungs- und Aktivierungszuständen zu betrachten. Es ist wichtig, zu verstehen, wie z.B. Tumor-assoziierte Makrophagen via *IL-6-trans-signaling* das Tumor-Milieu beeinflussen und wie diese Zellen den sIL-6R freisetzen. Eine genaue Identifikation der am *IL-6R-Shedding* beteiligten Proteasen und anderen Vorgängen, wie z.B. die Freisetzung des IL-6R über Exosomen, ist notwendig.

Vielversprechende Therapieansätze in der Blockade des *IL-6R-trans-signaling* z.B. mithilfe des Designerproteins sgp130Fc im Zusammenhang mit bedeutenden Erkrankungen wie Kolon-, Pankreas- und Ovarialkarzinom, entzündliche Darmerkrankung, Rheumatoide Arthritis, Peritonitis und Atherosklerose, werden erforscht (Rose-John, 2012).

8 Literaturverzeichnis

(2003). Marimastat: BB 2516, TA 2516. *Drugs R D* 4, 198-203.

Allen, D.H., and Tracy, P.B. (1995). Human coagulation factor V is activated to the functional cofactor by elastase and cathepsin G expressed at the monocyte surface. *J Biol Chem* 270, 1408-1415.

Ancuta, P., Moses, A., and Gabuzda, D. (2004). Transendothelial migration of CD16+ monocytes in response to fractalkine under constitutive and inflammatory conditions. *Immunobiology* 209, 11-20.

Ancuta, P., Rao, R., Moses, A., Mehle, A., Shaw, S.K., Luscinskas, F.W., and Gabuzda, D. (2003). Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med* 197, 1701-1707.

Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Mullberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schutz, M., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., Strand, D., Czaja, J., Schlaak, J.F., Lehr, H.A., Autschbach, F., Schurmann, G., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Ito, H., Kishimoto, T., Galle, P.R., Rose-John, S., and Neurath, M.F. (2000). Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 6, 583-588.

Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27, 669-692.

Baek, Y.S., Haas, S., Hackstein, H., Bein, G., Hernandez-Santana, M., Lehrach, H., Sauer, S., and Seitz, H. (2009). Identification of novel transcriptional regulators involved in macrophage differentiation and activation in U937 cells. *BMC Immunol* 10, 18.

Bank, U., Reinhold, D., Schneemilch, C., Kunz, D., Synowitz, H.J., and Ansorge, S. (1999). Selective proteolytic cleavage of IL-2 receptor and IL-6 receptor ligand binding chains by neutrophil-derived serine proteases at foci of inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 19, 1277-1287.

Banks, R.E., Forbes, M.A., Storr, M., Higginson, J., Thompson, D., Raynes, J., Illingworth, J.M., Perren, T.J., Selby, P.J., and Whicher, J.T. (1995). The acute phase protein response in patients receiving subcutaneous IL-6. *Clin Exp Immunol* 102, 217-223.

Becker, C., Fantini, M.C., Schramm, C., Lehr, H.A., Wirtz, S., Nikolaev, A., Burg, J., Strand, S., Kiesslich, R., Huber, S., Ito, H., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Galle, P.R., Blessing, M., Rose-John, S., and Neurath, M.F. (2004). TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 21, 491-501.

Belge, K.U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., and Ziegler-Heitbrock, L. (2002). The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168, 3536-3542.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.

Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M.,

- Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J., and Cerretti, D.P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* *385*, 729-733.
- Bonifer, C., and Hume, D.A. (2008). The transcriptional regulation of the Colony-Stimulating Factor 1 Receptor (*csf1r*) gene during hematopoiesis. *Front Biosci* *13*, 549-560.
- Cao, H., Wolff, R.G., Meltzer, M.S., and Crawford, R.M. (1989). Differential regulation of class II MHC determinants on macrophages by IFN-gamma and IL-4. *J Immunol* *143*, 3524-3531.
- Chalaris, A., Adam, N., Sina, C., Rosenstiel, P., Lehmann-Koch, J., Schirmacher, P., Hartmann, D., Cichy, J., Gavrilova, O., Schreiber, S., Jostock, T., Matthews, V., Hasler, R., Becker, C., Neurath, M.F., Reiss, K., Saftig, P., Scheller, J., and Rose-John, S. (2010). Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J Exp Med* *207*, 1617-1624.
- Chalaris, A., Garbers, C., Rabe, B., Rose-John, S., and Scheller, J. (2011). The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol* *90*, 484-494.
- Chalaris, A., Rabe, B., Paliga, K., Lange, H., Laskay, T., Fielding, C.A., Jones, S.A., Rose-John, S., and Scheller, J. (2007). Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood* *110*, 1748-1755.
- Chanthaphavong, R.S., Loughran, P.A., Lee, T.Y., Scott, M.J., and Billiar, T.R. (2012). A role for cGMP in inducible nitric-oxide synthase (iNOS)-induced tumor necrosis factor (TNF) alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) activation, translocation, and TNF receptor 1 (TNFR1) shedding in hepatocytes. *J Biol Chem* *287*, 35887-35898.
- Chen, Q., Fisher, D.T., Clancy, K.A., Gauguet, J.M., Wang, W.C., Unger, E., Rose-John, S., von Andrian, U.H., Baumann, H., and Evans, S.S. (2006). Fever-range thermal stress promotes lymphocyte trafficking across high endothelial venules via an interleukin 6 trans-signaling mechanism. *Nat Immunol* *7*, 1299-1308.
- Chen, Q., Wang, W.C., Bruce, R., Li, H., Schleider, D.M., Mulbury, M.J., Bain, M.D., Wallace, P.K., Baumann, H., and Evans, S.S. (2004). Central role of IL-6 receptor signal-transducing chain gp130 in activation of L-selectin adhesion by fever-range thermal stress. *Immunity* *20*, 59-70.
- Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., and Palucka, A.K. (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* *1*, 510-514.
- Coeshott, C., Ohnemus, C., Pilyavskaya, A., Ross, S., Wiczorek, M., Kroona, H., Leimer, A.H., and Cheronis, J. (1999). Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 6261-6266.
- Cressman, D.E., Greenbaum, L.E., DeAngelis, R.A., Ciliberto, G., Furth, E.E., Poli, V., and Taub, R. (1996). Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* *274*, 1379-1383.
- Daigneault, M., Preston, J.A., Marriott, H.M., Whyte, M.K., and Dockrell, D.H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* *5*, e8668.

- Doedens, J.R., and Black, R.A. (2000). Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor- α converting enzyme. *J Biol Chem* *275*, 14598-14607.
- Dollery, C.M., Owen, C.A., Sukhova, G.K., Krettek, A., Shapiro, S.D., and Libby, P. (2003). Neutrophil elastase in human atherosclerotic plaques: production by macrophages. *Circulation* *107*, 2829-2836.
- Dominitzki, S., Fantini, M.C., Neufert, C., Nikolaev, A., Galle, P.R., Scheller, J., Monteleone, G., Rose-John, S., Neurath, M.F., and Becker, C. (2007). Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells. *J Immunol* *179*, 2041-2045.
- Dong, C., Zhao, G., Zhong, M., Yue, Y., Wu, L., and Xiong, S. (2013). RNA sequencing and transcriptomal analysis of human monocytes to macrophages differentiation. *Gene*.
- Dusterhoft, S., Jung, S., Hung, C.W., Tholey, A., Sonnichsen, F.D., Grotzinger, J., and Lorenzen, I. (2013). Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase. *J Am Chem Soc* *135*, 5776-5781.
- Edwards, D.R., Handsley, M.M., and Pennington, C.J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* *29*, 258-289.
- Ellingsgaard, H., Ehses, J.A., Hammar, E.B., Van Lommel, L., Quintens, R., Martens, G., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Berney, T., Pipeleers, D., Halban, P.A., Schuit, F.C., and Donath, M.Y. (2008). Interleukin-6 regulates pancreatic alpha-cell mass expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 13163-13168.
- Eulendorf, R., Dittrich, A., Khouri, C., Muller, P.J., Mutze, B., Wolf, A., and Schaper, F. (2012). Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs. *Eur J Cell Biol* *91*, 486-495.
- Ferreira, R.C., Freitag, D.F., Cutler, A.J., Howson, J.M., Rainbow, D.B., Smyth, D.J., Kaptoge, S., Clarke, P., Boreham, C., Coulson, R.M., Pekalski, M.L., Chen, W.M., Onengut-Gumuscu, S., Rich, S.S., Butterworth, A.S., Malarstig, A., Danesh, J., and Todd, J.A. (2013). Functional IL6R 358Ala allele impairs classical IL-6 receptor signaling and influences risk of diverse inflammatory diseases. *PLoS Genet* *9*, e1003444.
- Garbers, C., Janner, N., Chalaris, A., Moss, M.L., Floss, D.M., Meyer, D., Koch-Nolte, F., Rose-John, S., and Scheller, J. (2011a). Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. *J Biol Chem* *286*, 14804-14811.
- Garbers, C., Thaiss, W., Jones, G.W., Waetzig, G.H., Lorenzen, I., Guilhot, F., Lissilaa, R., Ferlin, W.G., Grotzinger, J., Jones, S.A., Rose-John, S., and Scheller, J. (2011b). Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor. *J Biol Chem* *286*, 42959-42970.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* *327*, 656-661.
- Goldstein, I.J., Hollerman, C.E., and Merrick, J.M. (1965). Protein-Carbohydrate Interaction. I. The Interaction of Polysaccharides with Concanavalin A. *Biochim Biophys Acta* *97*, 68-76.

- Gonzales, P.E., Solomon, A., Miller, A.B., Leesnitzer, M.A., Sagi, I., and Milla, M.E. (2004). Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain. *J Biol Chem* 279, 31638-31645.
- Gordon, S. (2008). Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *Eur J Immunol* 38, 3257-3264.
- Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., and Karin, M. (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 15, 103-113.
- Gutierrez-Lopez, M.D., Gilsanz, A., Yanez-Mo, M., Ovalle, S., Lafuente, E.M., Dominguez, C., Monk, P.N., Gonzalez-Alvaro, I., Sanchez-Madrid, F., and Cabanas, C. (2011). The sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9. *Cell Mol Life Sci* 68, 3275-3292.
- Hashizume, M., Hayakawa, N., and Mihara, M. (2008). IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17. *Rheumatology (Oxford)* 47, 1635-1640.
- Hehlgans, T., and Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, 1-20.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374, 1-20.
- Hirano, T., Nakajima, K., and Hibi, M. (1997). Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 241-252.
- Horelt, A., Belge, K.U., Steppich, B., Prinz, J., and Ziegler-Heitbrock, L. (2002). The CD14+CD16+ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production. *Eur J Immunol* 32, 1319-1327.
- Hume, D.A. (2006). The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol* 18, 49-53.
- Jones, S.A., Horiuchi, S., Novick, D., Yamamoto, N., and Fuller, G.M. (1998). Shedding of the soluble IL-6 receptor is triggered by Ca²⁺ mobilization, while basal release is predominantly the product of differential mRNA splicing in THP-1 cells. *Eur J Immunol* 28, 3514-3522.
- Jostock, T., Mullberg, J., Ozbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M.F., and Rose-John, S. (2001). Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem* 268, 160-167.
- Karnovsky, M.L. (1981). Metchnikoff in Messina: a century of studies on phagocytosis. *N Engl J Med* 304, 1178-1180.
- Kilpatrick, L.M., Harris, R.L., Owen, K.A., Bass, R., Ghorayeb, C., Bar-Or, A., and Ellis, V. (2006). Initiation of plasminogen activation on the surface of monocytes expressing the type II transmembrane serine protease matriptase. *Blood* 108, 2616-2623.
- Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M., and Taga, T. (1995). Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86, 1243-1254.

- Kramps, J.A., Rudolphus, A., Stolk, J., Willems, L.N., and Dijkman, J.H. (1991). Role of antileukoprotease in the human lung. *Ann N Y Acad Sci* 624, 97-108.
- Kveiborg, M., Instrell, R., Rowlands, C., Howell, M., and Parker, P.J. (2011). PKC α and PKC δ regulate ADAM17-mediated ectodomain shedding of heparin binding-EGF through separate pathways. *PLoS One* 6, e17168.
- Le Gall, S.M., Maretzky, T., Issuree, P.D., Niu, X.D., Reiss, K., Saftig, P., Khokha, R., Lundell, D., and Blobel, C.P. (2010). ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *J Cell Sci* 123, 3913-3922.
- Lemansky, P., Smolenova, E., Wrocklage, C., and Hasilik, A. (2007). Neutrophil elastase is associated with serglycin on its way to lysosomes in U937 cells. *Cell Immunol* 246, 1-7.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402-408.
- Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M.H., Broadway, N., Andrews, R.C., Bickett, D.M., Leesnitzer, M.A., and Becherer, J.D. (2005). 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* 8, 161-171.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23, 549-555.
- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., and Mantovani, A. (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 177, 7303-7311.
- Matsumoto, S., Hara, T., Mitsuyama, K., Yamamoto, M., Tsuruta, O., Sata, M., Scheller, J., Rose-John, S., Kado, S., and Takada, T. (2010). Essential roles of IL-6 trans-signaling in colonic epithelial cells, induced by the IL-6/soluble-IL-6 receptor derived from lamina propria macrophages, on the development of colitis-associated premalignant cancer in a murine model. *J Immunol* 184, 1543-1551.
- Matthews, V., Schuster, B., Schutze, S., Bussmeyer, I., Ludwig, A., Hundhausen, C., Sadowski, T., Saftig, P., Hartmann, D., Kallen, K.J., and Rose-John, S. (2003). Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem* 278, 38829-38839.
- McFarland-Mancini, M.M., Funk, H.M., Paluch, A.M., Zhou, M., Giridhar, P.V., Mercer, C.A., Kozma, S.C., and Drew, A.F. (2010). Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor. *J Immunol* 184, 7219-7228.
- McIlwain, D.R., Lang, P.A., Maretzky, T., Hamada, K., Ohishi, K., Maney, S.K., Berger, T., Murthy, A., Duncan, G., Xu, H.C., Lang, K.S., Haussinger, D., Wakeham, A., Itie-Youten, A., Khokha, R., Ohashi, P.S., Blobel, C.P., and Mak, T.W. (2012). iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against *Listeria* and responses to LPS. *Science* 335, 229-232.

- Merlos-Suarez, A., Fernandez-Larrea, J., Reddy, P., Baselga, J., and Arribas, J. (1998). Pro-tumor necrosis factor-alpha processing activity is tightly controlled by a component that does not affect notch processing. *J Biol Chem* *273*, 24955-24962.
- Metschnikoff, E. (1891). Lecture on Phagocytosis and Immunity. *Br Med J* *1*, 213-217.
- Mitsuyama, K., Matsumoto, S., Rose-John, S., Suzuki, A., Hara, T., Tomiyasu, N., Handa, K., Tsuruta, O., Funabashi, H., Scheller, J., Toyonaga, A., and Sata, M. (2006). STAT3 activation via interleukin 6 trans-signalling contributes to ileitis in SAMP1/Yit mice. *Gut* *55*, 1263-1269.
- Mitsuyama, K., Toyonaga, A., Sasaki, E., Ishida, O., Ikeda, H., Tsuruta, O., Harada, K., Tateishi, H., Nishiyama, T., and Tanikawa, K. (1995). Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. *Gut* *36*, 45-49.
- Montero-Julian, F.A. (2001). The soluble IL-6 receptors: serum levels and biological function. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* *47*, 583-597.
- Moss, M.L., Bomar, M., Liu, Q., Sage, H., Dempsey, P., Lenhart, P.M., Gillispie, P.A., Stoeck, A., Wildeboer, D., Bartsch, J.W., Palmisano, R., and Zhou, P. (2007). The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J Biol Chem* *282*, 35712-35721.
- Mosser, D.M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* *73*, 209-212.
- Mullberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Gunther, M., Graeve, L., Buse, G., Mackiewicz, A., Heinrich, P.C., and Rose-John, S. (1993). The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol* *23*, 473-480.
- Muller-Newen, G., Kohne, C., Keul, R., Hemmann, U., Muller-Esterl, W., Wijdenes, J., Brakenhoff, J.P., Hart, M.H., and Heinrich, P.C. (1996). Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing. *Eur J Biochem* *236*, 837-842.
- Muller-Newen, G., Kuster, A., Hemmann, U., Keul, R., Horsten, U., Martens, A., Graeve, L., Wijdenes, J., and Heinrich, P.C. (1998). Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses. *J Immunol* *161*, 6347-6355.
- Murao, S., Gemmell, M.A., Callahan, M.F., Anderson, N.L., and Huberman, E. (1983). Control of macrophage cell differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and phorbol-12-myristate-13-acetate. *Cancer Res* *43*, 4989-4996.
- Nakajima, T., Yamamoto, S., Cheng, M., Yasukawa, K., Hirano, T., Kishimoto, T., Tokunaga, T., and Honda, M. (1992). Soluble interleukin-6 receptor is released from receptor-bearing cell lines in vitro. *Jpn J Cancer Res* *83*, 373-378.
- Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E., and Rubin, B.Y. (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* *158*, 670-689.
- Newby, A.C. (2008). Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *28*, 2108-2114.

- Nowell, M.A., Richards, P.J., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Topley, N., Williams, A.S., and Jones, S.A. (2003). Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. *J Immunol* *171*, 3202-3209.
- Nowell, M.A., Williams, A.S., Carty, S.A., Scheller, J., Hayes, A.J., Jones, G.W., Richards, P.J., Slinn, S., Ernst, M., Jenkins, B.J., Topley, N., Rose-John, S., and Jones, S.A. (2009). Therapeutic targeting of IL-6 trans signaling counteracts STAT3 control of experimental inflammatory arthritis. *J Immunol* *182*, 613-622.
- Oberg, F., and Nilsson, K. (1992). Differentiation and activation associated expression of IL-6 and IL-6 receptors in U-937 monocytic cells: relationship to the expression of CD14. *Growth Factors* *7*, 85-96.
- Okuda, Y., Sakoda, S., Bernard, C.C., Fujimura, H., Saeki, Y., Kishimoto, T., and Yanagihara, T. (1998). IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Int Immunol* *10*, 703-708.
- Owen, C.A. (2008). Leukocyte cell surface proteinases: regulation of expression, functions, and mechanisms of surface localization. *Int J Biochem Cell Biol* *40*, 1246-1272.
- Owen, C.A., Campbell, M.A., Boukedes, S.S., and Campbell, E.J. (1994). Monocytes recruited to sites of inflammation express a distinctive proinflammatory (P) phenotype. *Am J Physiol* *267*, L786-796.
- Owen, C.A., Campbell, M.A., Sannes, P.L., Boukedes, S.S., and Campbell, E.J. (1995). Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J Cell Biol* *131*, 775-789.
- Peters, M., Schirmacher, P., Goldschmitt, J., Odenthal, M., Peschel, C., Fattori, E., Ciliberto, G., Dienes, H.P., Meyer zum Buschenfelde, K.H., and Rose-John, S. (1997). Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in interleukin (IL)-6-sIL-6R double transgenic mice. *J Exp Med* *185*, 755-766.
- Pham, C.T. (2006). Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol* *6*, 541-550.
- Poli, V., Balena, R., Fattori, E., Markatos, A., Yamamoto, M., Tanaka, H., Ciliberto, G., Rodan, G.A., and Costantini, F. (1994). Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *Embo J* *13*, 1189-1196.
- Prox, J., Willenbrock, M., Weber, S., Lehmann, T., Schmidt-Arras, D., Schwanbeck, R., Saftig, P., and Schwake, M. (2012). Tetraspanin15 regulates cellular trafficking and activity of the ectodomain sheddase ADAM10. *Cell Mol Life Sci* *69*, 2919-2932.
- Qu, Y., and Dubyak, G.R. (2009). P2X7 receptors regulate multiple types of membrane trafficking responses and non-classical secretion pathways. *Purinergic Signal* *5*, 163-173.
- Rabe, B., Chalaris, A., May, U., Waetzig, G.H., Seegert, D., Williams, A.S., Jones, S.A., Rose-John, S., and Scheller, J. (2008). Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation. *Blood* *111*, 1021-1028.

- Randolph, G.J., Inaba, K., Robbiani, D.F., Steinman, R.M., and Muller, W.A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* *11*, 753-761.
- Reiss, K., and Saftig, P. (2009). The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol* *20*, 126-137.
- Rivera-Marrero, C.A., Stewart, J., Shafer, W.M., and Roman, J. (2004). The down-regulation of cathepsin G in THP-1 monocytes after infection with *Mycobacterium tuberculosis* is associated with increased intracellular survival of bacilli. *Infect Immun* *72*, 5712-5721.
- Robak, T., Gladalska, A., Stepień, H., and Robak, E. (1998). Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm* *7*, 347-353.
- Robak, T., Wierzbowska, A., Blasinska-Morawiec, M., Korycka, A., and Blonski, J.Z. (1999). Serum levels of IL-6 type cytokines and soluble IL-6 receptors in active B-cell chronic lymphocytic leukemia and in cladribine induced remission. *Mediators Inflamm* *8*, 277-286.
- Rose-John, S. (2012). IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci* *8*, 1237-1247.
- Rose-John, S., and Heinrich, P.C. (1994). Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J* *300 (Pt 2)*, 281-290.
- Rose-John, S., Schooltink, H., Schmitz-Van de Leur, H., Mullberg, J., Heinrich, P.C., and Graeve, L. (1993). Intracellular retention of interleukin-6 abrogates signaling. *J Biol Chem* *268*, 22084-22091.
- Scambia, G., Testa, U., Panici, P.B., Martucci, R., Foti, E., Petrini, M., Amoroso, M., Masciullo, V., Peschle, C., and Mancuso, S. (1994). Interleukin-6 serum levels in patients with gynecological tumors. *Int J Cancer* *57*, 318-323.
- Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C., and Rose-John, S. (2011). ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol* *32*, 380-387.
- Schlondorff, J., Becherer, J.D., and Blobel, C.P. (2000). Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J* *347 Pt 1*, 131-138.
- Schumacher, N., Meyer, D., Mauermann, A., von der Heyde, J., Wolf, J., Schwarz, J., Knittler, K., Murphy, G., Michalek, M., Garbers, C., Bartsch, J.W., Guo, S., Schacher, B., Eickholz, P., Chalaris, A., Rose-John, S., and Rabe, B. (2015). Shedding of Endogenous Interleukin-6 Receptor (IL-6R) Is Governed by A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) Proteases while a Full-length IL-6R Isoform Localizes to Circulating Microvesicles. *J Biol Chem* *290*, 26059-26071.
- Seals, D.F., and Courtneidge, S.A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* *17*, 7-30.
- Shen, H.H., Talle, M.A., Goldstein, G., and Chess, L. (1983). Functional subsets of human monocytes defined by monoclonal antibodies: a distinct subset of monocytes contains the cells capable of inducing the autologous mixed lymphocyte culture. *J Immunol* *130*, 698-705.

- Soond, S.M., Everson, B., Riches, D.W., and Murphy, G. (2005). ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF α -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J Cell Sci* *118*, 2371-2380.
- Tape, C.J., Willems, S.H., Dombernowsky, S.L., Stanley, P.L., Fogarasi, M., Ouwehand, W., McCafferty, J., and Murphy, G. (2011). Cross-domain inhibition of TACE ectodomain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 5578-5583.
- Tenhumberg, S., Schuster, B., Zhu, L., Kovaleva, M., Scheller, J., Kallen, K.J., and Rose-John, S. (2006). gp130 dimerization in the absence of ligand: preformed cytokine receptor complexes. *Biochem Biophys Res Commun* *346*, 649-657.
- Toomes, C., James, J., Wood, A.J., Wu, C.L., McCormick, D., Lench, N., Hewitt, C., Moynihan, L., Roberts, E., Woods, C.G., Markham, A., Wong, M., Widmer, R., Ghaffar, K.A., Pemberton, M., Hussein, I.R., Temtamy, S.A., Davies, R., Read, A.P., Sloan, P., Dixon, M.J., and Thakker, N.S. (1999). Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. *Nat Genet* *23*, 421-424.
- Trad, A., Hansen, H.P., Shomali, M., Peipp, M., Klausz, K., Hedemann, N., Yamamoto, K., Mauermann, A., Desel, C., Lorenzen, I., Lemke, H., Rose-John, S., and Grotzinger, J. (2013). ADAM17-overexpressing breast cancer cells selectively targeted by antibody-toxin conjugates. *Cancer Immunol Immunother* *62*, 411-421.
- Trad, A., Hedemann, N., Shomali, M., Pawlak, V., Grotzinger, J., and Lorenzen, I. (2011). Development of sandwich ELISA for detection and quantification of human and murine a disintegrin and metalloproteinase17. *J Immunol Methods* *371*, 91-96.
- Trautwein, C., Rakemann, T., Niehof, M., Rose-John, S., and Manns, M.P. (1996). Acute-phase response factor, increased binding, and target gene transcription during liver regeneration. *Gastroenterology* *110*, 1854-1862.
- van Furth, R., and Cohn, Z.A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* *128*, 415-435.
- Walker, F., Zhang, H.H., Matthews, V., Weinstock, J., Nice, E.C., Ernst, M., Rose-John, S., and Burgess, A.W. (2008). IL6/sIL6R complex contributes to emergency granulopoietic responses in G-CSF- and GM-CSF-deficient mice. *Blood* *111*, 3978-3985.
- Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R., and Harrington, L.E. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* *25*, 821-852.
- Wiedow, O., Schroder, J.M., Gregory, H., Young, J.A., and Christophers, E. (1990). Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J Biol Chem* *265*, 14791-14795.
- Wierzbowska, A., Urbanska-Rys, H., and Robak, T. (1999). Circulating IL-6-type cytokines and sIL-6R in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* *105*, 412-419.
- Xu, P., Liu, J., Sakaki-Yumoto, M., and Derynck, R. (2012). TACE activation by MAPK-mediated regulation of cell surface dimerization and TIMP3 association. *Sci Signal* *5*, ra34.

Ziegler-Heitbrock, H.W., Strobel, M., Fingerle, G., Schlunck, T., Pforte, A., Blumenstein, M., and Haas, J.G. (1991). Small (CD14+/CD16+) monocytes and regular monocytes in human blood. *Pathobiology* 59, 127-130.

Ziegler-Heitbrock, H.W., Strobel, M., Kieper, D., Fingerle, G., Schlunck, T., Petersmann, I., Ellwart, J., Blumenstein, M., and Haas, J.G. (1992). Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood* 79, 503-511.

9 Anhang

Eidesstattliche Versicherung

Name: André Mauermann
Geburtstag: 01.11.1986
Geburtsort: Schlema, jetzt Bad Schlema
Staatsangehörigkeit: deutsch

Hiermit erkläre ich an Eides statt,

- dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt und verfasst habe, dass alle Hilfsmittel und sonstigen Hilfen angegeben und dass alle Stellen, die ich wörtlich oder dem Sinne nach aus anderen Veröffentlichungen entnommen habe, kenntlich gemacht worden sind;

- dass die Dissertation in der vorgelegten oder einer ähnlichen Fassung noch nicht zu einem früheren Zeitpunkt an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel oder einer anderen in- oder ausländischen Hochschule als Dissertation eingereicht worden ist.

Leipzig, den

André Mauermann

Danksagung

Mein tiefer Dank gebührt den „Vätern“ dieser Arbeit Prof. Dr. Björn Rabe und Prof. Dr. Stefan Rose-John. Ihrer exzellenten Betreuung ist es zu verdanken, dass für mich das zähe, demütige Ringen um Erkenntnis nicht nur überhaupt erst ermöglicht wurde sondern auch schnell erfolgreich war. Mir fällt in dieser ganzen Einrichtung und im SFB 877 auf Anhieb kein Mensch ein, der nicht durch seinen Fleiß, seine Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit ein Vorbild gewesen wäre. Diese Menschen vollbringen Großes und trugen dazu bei, dass meine Zeit an diesem Institut nicht nur zu tiefst befriedigend war, sondern auch einfach nur Spaß gemacht hat. Ein Umstand, den ich aus meinem 5-jährigen Studium der Zahnmedizin eher weniger gekannt hatte. Wenn die Studienzeit die schönste Zeit des Lebens darstellt, dann war dieses lange Jahr die wirkliche Krönung. In diesem Sinne möchte ich mich bei Athena Chalaris und ihrer Gruppe, insbesondere Ansgard „Doc Schmäns“ Helmstetter, Joachim Grötzinger, Ahmad Trad, Ulf Meyer-Hoffert und allen Mitarbeitern im Labor 137 besonders bedanken.

Im Besonderen gilt mein Dank meiner Familie und Ihrer bedingungslosen Unterstützung. Alles Schwere lassen sie leicht werden. Ihre Liebe und Ihr Glaube ist eine unglaubliche Motivation in meinem Leben. Ohne meine Frau Janine wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen. Ihr edler Charakter, ihre Zähigkeit und ihr Fleiß sind meine Inspiration.

Ich möchte meinen Freunden danken, die aufrichtig an der Entstehung dieser Arbeit teilnahmen und mich ermutigten. Ohne meine Freunde wäre ich NICHTS.

Auf die Freundschaft!

Lebenslauf

Name: André Mauermann
Geburtstag: 01.11.1986
Geburtsort: Schlema, jetzt Bad Schlema
Staatsangehörigkeit: deutsch

ab 2015 zahnärztliche Tätigkeit in der Praxis Dr.med.dent. Ulrich Müller
in Leipzig Holzhausen

2013 – 2015 zahnärztliche Assistenzzeit - Praxis Dr.med.dent. Ulrich Müller
in Leipzig Holzhausen

2012 – 2013 Promotionsstudium mit dem Titel „Entstehung des humanen
löslichen Interleukin-6 Rezeptors während der Makrophagen-
differenzierung“ am Biochemischen Institut der Christian-
Albrechts-Universität zu Kiel mit DFG Stipendium

2006 – 2011 Studium der Zahnheilkunde an der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel mit dem Abschluss „sehr gut“

2005 – 2006 Zivildienst am Helios Klinikum in Aue (Sachsen)

1997 – 2005 Abitur am Matthes-Enderlein-Gymnasium Zwönitz

1993 – 1997 Grundschule Johann-Wolfgang-von-Goethe Zwönitz

Veröffentlichungen

Schumacher, N., Meyer, D., **Mauermann, A.**, von der Heyde, J., Wolf, J., Schwarz, J., Knittler, K., Murphy, G., Michalek, M., Garbers, C., Bartsch, J.W., Guo, S., Schacher, B., Eickholz, P., Chalaris, A., Rose-John, S., and Rabe, B. (2015). Shedding of Endogenous Interleukin-6 Receptor (IL-6R) Is Governed by A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) Proteases while a Full-length IL-6R Isoform Localizes to Circulating Microvesicles. *J Biol Chem* 290, 26059-26071

Trad, A., Hansen, H.P., Shomali, M., Peipp, M., Klausz, K., Hedemann, N., Yamamoto, K., **Mauermann, A.**, Desel, C., Lorenzen, I., Lemke, H., Rose-John, S., and Grotzinger, J. (2013). ADAM17-overexpressing breast cancer cells selectively targeted by antibody-toxin conjugates. *Cancer Immunol Immunother* 62, 411-421.