A SZOLUBILIS INTERLEUKIN-6 RECEPTOR KELETKEZÉSÉNEK ÉS HATÁSMECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA

Doktori (Ph.D.) értekezés

Készítette: Holub Marianna Csilla

Témavezeto: Dr. Falus András egyetemi tanár

Semmelweis Egyetem,
7. Tudományági Doktori Iskola: „ Molekuláris Orvostudományok”,
19. sz. Ph.D. program: „A humán genetika és géndiagnosztika alapjai”

Opponensek:
dr. Kalabay László, egyetemi docens, SE III. sz. Belgyógyászati Klinika,
dr. Berki Tímea, egyetemi docens, POTE Immunológiai és Biotechnológiai Intézet,
dr. Becker Krisztina, egyetemi adjunktus, SE Bor- és Nemikórtani Klinika (póttag)

Szigorlati bizottság tagjai:
Elnök: dr. Schaff Zsuzsa, egyetemi tanár, SE II. sz. Pathológiai Intézet,
dr. Dérfalvi Beáta, klinikai orvos, SE I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika,
dr. Kovács János, egyetemi tanár, ELTE Állatszervezettani Tanszék

Budapest, 2003.

TARTALOMJEGYZÉK 1

ÖSSZEFOGLALÁS 3
ABSTRACT 5
1. **RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK** 8
2. BEVEZETÉS 10
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 12
3.1. Az IL-6 receptor családba tartozó citokinek 12
3.1.1. Az IL-6 biológiai hatásai 12
3.1.2. Az IL-6 receptor 15
3.1.3. Az IL-6 jelátvitele 19
3.1.4. **A szolubilis IL-6 receptor keletkezése és biológiai hatásai** 22
3.2. **Az oncostatin M** 28
3.2.1. Az oncostatin M és az interleukin-6 kapcsolata 30
3.2.1. Az IL-6 és szolubilis IL-6 receptor szerepe betegségek pathomechanizmusában 31
3.3.1. **Az IL-6 és sIL-6R szerepe gyulladásos bélbetegségek pathomechanizmusában** 35
3.3.2. Az IL-6 és sIL-6R szerepe rheumatoid arthritisben 37
4. HIPOTÉZISEK, CÉLKITUZÉSEK 40
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 42
5.1. Sejtkultúrák 42
5.1.1. **Perifériás vér mononukleáris sejtjei** 42
5.1.2. **Sejtvonalak** 42
5.2. **Mononukleáris sejt szeparálás** 42
5.3. Alkalmazott kezelések 43
5.3.1. **PBMC kezelése** 43
5.3.2. Sejtvonalak kezelése 43
5.4. RNS- izolálás 44
5.5. Reverz transzkripció (RT) és polimeráz láncreakciót (PCR) 44
5.6. **Endonukleázos emésztés** 46
5.7. Szekvenálás 46
5.8. Szérum/plazma IL-6 koncentráció mérése 46
5.9. Élo sejtek számának meghatározása MTT módszerrel 46

5.10. **sIL6R ELISA** 47
5.11. sIL-6R dot blot 47
5.12. Differential Display 47
5.12.1. A Differential Display elméleti háttere 47
5.12.2. A Differential display kivitelezése 48
6. EREDMÉNYEK 49
6.1. Az alternatív „splicing” révén keletkezett mRNS kimutatása 49
6.2. Perifériás vér mononukleáris sejtjeinek IL-6R komplex vizsgálata gyulladásos betegségekben 51
6.2.1. IBD betegek szérum IL-6 szint növekedése 51
6.2.2. Gyulladásos betegségben szenvedo betegek IL-6R és gp130 mRNS expressziója 52
6.3. Az OSM hatása a sIL-6R keletkezésére HepG2 és MDA-MB435 sejtvonalon 55
6.4. Az IL-6 illetve az sIL-6R hatása az sIL-6 receptor keletkezésére 60
6.5. IL-6, sIL-6R és IL-6 + sIL-6R együttes hatására bekövetkezo génexpressziós mintázat változás HepG2 hepatoma sejtvonalon 62
7. **MEGBESZÉLÉS** 70
8. KÖVETKEZTETÉSEK 78
9. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA 79
10. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS 80
11. IRODALOMJEGYZÉK 81
12. A TÉMÁBAN MEGJELENT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE 98
13. EGYÉB SAJÁT KÖZLEMÉNYEK 99
14. ELOADÁSOK, POSZTEREK 99

ÖSSZEFOGLALÁS

Az interleukin-6 (IL-6) citokin családra jellemzo, hogy receptoraik egy közös szignáltranszdukciós láncból (gp130) és egy ligand specifikus alegységbol állnak. Az IL-6 ligand specifikus receptora nemcsak membránkötött formában, hanem szolubilisan is elofordul a testnedvekben. A szolubilis forma proteolitikus emésztéssel, vagy mRNS alternatív „splicing" révén keletkezhet. Bár a szolubilis receptorok és membránkötött változatuk általában versengenek a ligandért, ezért antagonistáknak tekinthetok, a szolubilis IL-6 receptor (sIL-6R) épp ellenkezoleg, intracelluláris jelet is gerjeszthet a gp130-hoz kapcsolódva. Mivel a gp130 alegység minden magvas sejten expresszálódik, a legtöbb sejtet IL-6-ra érzékennyé teszi, ezért a sIL-6R kulcsszerepet tölt be az IL-6-ra adott sejtválaszok szabályozásában, gyakran központi szereplojévé válik a helyi és szisztémás, IL-6 mediálta eseményeknek. Az IL-6 hatásmechanizmusában a sIL-6R ugyanolyan fontos szereplové lépett elo, mint az általa megkötött citokin.

Kísérleteinkben az interleukin-6 (IL-6) jelátvitelében szerepet játszó specifikus szolubilis interleukin-6 receptor (sIL-6R) keletkezésének körülményeit, illetve jelenlétének hatásait vizsgáltuk.

Eredményeink a következok:

1. Igazoltuk, hogy a sIL6R mRNS alternatív „splicing" révén is keletkezhet. Kidolgoztunk egy RT-PCR módszert az alternatív „splicing" útján keletkezo sIL-6R mRNS kimutatására.
2. Kimutattuk, hogy az általunk használt sejtvonalakban az IL-6R mRNS-ének alternatív „splicing" folyamatát maga a ligand (IL-6), illetve a vele azonos jelátviteli utat használó oncostatin-M (OSM) is befolyásolja. Az OSM, ugyancsak a gp130-at használja szignáltranszdukcióra, és megnöveli mind a membránkötött IL-6R mind az alternatív „splicing" révén létrejövo sIL-6R expresszióját HepG2 humán hepatoma és MDA-MB-435 humán emlo karcinóma sejtvonalakon.
3. Kimutattuk, hogy gyulladásos bélbetegségekben és rheumatoid arthritisben a sIL6R szerepet játszik a betegség patomechanizmusában.
4. A molekuláris módszerek közé újonnan bevezetett macroarray módszerrel elsoként mutattuk ki HepG2 humán hepatoma sejtvonalon a sIL-6R által befolyásolt génexpressziós változásokat. cDNS expressziós array módszert használva mintegy 580 humán gén expresszióját vizsgáltuk. Kísérleteinkben a

humán HepG2 hepatoma sejtvonalon állandóan expresszálódó IL-6R mennyiségét növeltük további sIL-6R hozzáadásával. Eredményeink azt mutatják, hogy az IL-6R denzitás növekedését a sejt génexpressziós mintázatában bekövetkezett jellegzetes változás követte. Vizsgálataink arra engednek következtetni, hogy a szolubilis IL-6R jelenléte fontos szerepet játszik a citokinek közötti kölcsönhatásokban: miközben szélesíti az IL-6-ra reagáló sejtek repertoárját, egyúttal megváltoztatja azok génexpressziós mintázatát.

ABSTRACT

The receptors of the interleukin-6 (IL-6) family cytokines include a common signal transducing chain (gp130) and a ligand specific chain. The ligand specific part of the IL-6 receptor is found either in the cell membrane or in body fluids in soluble form. The soluble form can be generated by proteolytic cleavage of the membrane bound protein or by alternative splicing at the mRNA level. Although the soluble receptors are usually competetive with those bound in the membrane, and thus, they act as antagonists, however binding of soluble IL-6R (sIL-6R) to gp130 can induce an intracellular signal. Since almost all nucleated cells express gp130, the sIL-6R plays a key role in the regulation of the IL-6 mediated cellular responses, and it often becomes the central factor of the IL-6 mediated local and systemic events. sIL-6R became as important factor in the effects of IL-6 as the cytokine itself.

In our experiments we investigated the mechanism of the generation of the soluble IL-6R and we examined the effects of its presence.

Our results are as follows:

1. We confirmed that sIL-6R can be generated also by alternative splicing. We established an RT-PCR method to detect alternatively spliced sIL-6R mRNA.
2. In the cell lines we used, we demonstrated that alternative splicing of the sIL-6R is influenced by the IL-6 ligand itself, and by oncostatin-M (OSM), which uses the same signal transducing pathway as IL-6. OSM, using gp130 for signal transduction, enhances expression of either membrane bound, or alternatively spliced soluble IL-6R expression in HepG2 human hepatoma and in MDA-MB435 human mammary carcinoma cell lines.
3. We showed that sIL-6R plays a role in the pathomechanism of inflammatory bowel disease and rheumatoid arthritis.
4. We first demonstrated the sIL-6R induced gene expression pattern by the novel macroarray method. We examined the expression of 580 human genes in HepG2 human hepatome cell line, in which we increased the endogenously expressed amount of IL-6R with additional exogenic sIL-6R. Our results showed that the increase in density of IL-6R is followed by characteristic changes in gene expression pattern of the cells. We drew the conclusion from our experiments that in the presence of sIL-6R is important in interactions among cytokines:

meanwhile it widens the repertoire of IL-6 responsive cells, it changes their gene expression pattern at the same time.

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

ACT	- ? 1-antikimotripszin
ADAM	- a disintegrin and metalloproteinase; metalloproteináz család
APRE	- acute phase response element; STAT3 köto enhancer régió
ASO	- antiszenz oligonukleotid
Btk	- B cell tyrosine kinase
cdc	- cell division cycle (sejtciklus szabályozó gén)
CIS3	- cytokine inducible SH2 protein; JAK inhibitor; SOCS3
CNTF	- ciliary neurotrophic factor
CNTF-R	- ciliary neurotrophic factor receptor
CREB	- cAMP response element binding protein
CRE-BP1	- cAMP response element binding protein 1. típus
CRF	- corticotropin releasing factor
CRP	- C-reaktív protein
CT-1	- kardiotrofin – 1
CTGF	- connective tissue growth factor
DEPC	- dietil-pirokarbonát
DMSO	- dimetil-szulfoxid
EGF	- epidermal growth factor
FCS	- fetal calf serum (magzati borjúsavó)
Fes	- feline sarcoma virus oncogene homolog
FMLP	- N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanin
GDNF	- glial cell-line derived neurotrophic factor
GM-CSF	- granulocyta-macrophag colony stimulating factor
HCG	- human chorion gonadotropin
Hck	- hemopoietic cell kinase
HDC	- hisztidin dekarboxiláz
HDGF	- hepatoma derived growth factor
HSF	- hepatocita stimuláló faktor; IL-6
HTLV	- human T-sejtes leukémia vírus-1
IBD	- inflammatory bowel disease
ICAM-1	- intercellular adhesion molecule - 1
IFN-? 2	- interferon-? 2; IL-6
IL-1	- interleukin-1
IL-1RI	- I. típusú interleukin-1 receptor
IL-2R	- interleukin-2 receptor
IL-3	- interleukin-3
IL-6	- interleukin-6
IL-6R	- interleukin-6 receptor
IL-8	- interleukin-8
IL-11	- interleukin –11
JAB	- JAK binding protein; JAK inhibitor
JAK	- Janus kináz; tirozin-kináz
KO	- knock out; „génkiütött”
LIF	- leukemia inhibitor factor
LIF-R?	- LIF-receptor ? alegység
MAPK	- mitogen activated protein kinase
MTT	- 3 - ?4,5 -Dimethylthiazol -2- yl? -2,5-diphenyltetrazolium bromid
NF-IL6	- nuclear factor-IL-6
NK sejtek	- natural killer sejtek
OSM	- oncostatin M
p52	- DNS sérülést javító fehérje
PDGF?	- platelet derived growth factor ? alegység
PKA	- protein kináz A
PKC	- protein kináz C
PMA	- forbol 12-mirisztát 13-acetát
PMBC	- perifériás mononukleáris vérsejtek
PvuII	- Proteus vulgaris eredetu restrikciós endonukleáz

RA	- rheumatoid arthritis
raf	- raf –oncogene homolog; szerin-treonin protein kináz
ras	- rous avian sarcoma viral oncogene homolog; momomer G-fehérje
SCID	- severe combined immunodeficiency
SH2	- scr (Drosophila scratch homolog 1, zinc finger protein) homológ domén
SHP2	- SH2 domént hordozó tirozin foszfatáz-2
sIL-6R	- szolubilis interleukin-6 receptor
SLE	- szisztémás lupus erythematosus
SOCS	- supressor of cytokine signaling; JAK inhibitor
SSI	- STAT-induced STAT-inhibitor
SNP	- single nucleotide polymorphism
STAT	- signal transducers and activators of transcription
TAPI	- TNF? proteáz inhibitor
TBE	- tris-borát-EDTA puffer
Tec	- nem receptor tirozin-kináz
TGF-?1	- transforming growth factor beta 1
TIMP-1	- tissue inhibitor of metalloproteases-1
TNF?	- tumor necrosis factor-alpha
TYK	- tyrosine kinase (JAK – családba tartozó kináz)
VCAM-1	- vascular cell adhesion molecule -1
VEGF	- vascular endothelial growth factor
WSXWS	- triptofán-szerin-X-triptofán-szerin (az X tetszoleges aminosavat jelöl)

2. BEVEZETÉS

Az immunológiai folyamatokban kulcsszerepet betölto – elsosorban parakrin módon ható - mediátorok hatékonysága egyrészt mennyiségük, másrészt hatásuk idejének szabályozásán múlik. A citokinek által közvetített sejt-, immun-, és gyulladásos reakciókat két fo szinten lehet módosítani: a citokin génjének az aktiválásával és az effektor szakaszban, a citokin – receptor módosításával. A hatás kiváltásában a receptornak ugyanolyan fontos szerep jut, mint a jelenlévo citokinnek.

A dolgozatban az IL-6 citokin receptorának szolubilis formájával foglalkozom.

Az IL-6 nagyon sokféle eredetu sejt által termelt, nagyon sokrétu, pleiotróp citokinként jellemezheto (58). Hatásai közül kiemelendo, hogy egyrészt hemopoetikus faktor, de szerepet játszik a B-sejt és T-sejt differenciálódás különbözo stádiumaiban, a májsejtekre hatva az akutfázis reakció kialakulásában, az asztrociták által termelt IL-6 hat az idegrendszerre; nehéz olyan élettani funkciót találni, ahol valamiféle szerepe ne lenne (52, 146, 139, 122, 109). Az akutfázis reakció esetében nem is parakrin módon ható citokinként, hanem inkább a hormonokra jellemzoen, szisztémásan fejti ki hatását (5). Az élettani funkciók - a differenciálódás, a sejtosztódás vagy a gyulladásos folyamatok - szabályozása mellett központi szerepet tölt be számos betegség patogenezisében, egyrészt, mint pro- másrészt, mint anti-inflammatorikus citokin (2).

A humán ligandspecifikus IL-6 receptornak egy 340 aminosavat tartalmazó ligandköto -, és egy 80 aminosavat tartalmazó intracelluláris része van (9). A receptor extracelluláris részt tartalmazó, szolubilis formája ugyanolyan aktív, mint a membránkötött változat. Mindketto aktivitásához azonban elengedhetetlen egy 130 kDa méretu fehérje, ami az IL-6 receptor sejten kívüli részével kölcsönhatásba lépve a jelátvitelt teszi lehetové (136). Ez a jelátvivo egység a gp130 molekula. Az IL-6 receptor és a gp130 csak a citokin jelenlétében kapcsolódik egymással, de a komplex kialakulása után több jelátviteli út is aktiválódhat (45). Ez teszi lehetové, hogy az IL-6 nagyon sokféle biológiai hatást vált ki a különbözo sejttípusokon. Természetesen számos esetben nem tekintheto egyedüli kiváltó anyagnak, hiszen csak egyik résztvevoje a sejtek muködését szabályozó citokin hálózatnak.

A szolubilis IL-6R felfedezése és szérumból, vizeletbol való kimutatása után forradalmian megváltozott az IL-6 által kiváltott gyulladásos folyamatok, vagy gyulladáscsökkento folyamatok megítélése (95). Bár szolubilis receptorokat több hormon és más citokin esetében is leírtak már, ezek általában a membránkötött

receptorral versengenek a ligandért, a ligandot megkötve nem teszik azt hozzáférhetové a membránkötött forma számára. A citokinek hatásait gátolják, hatásukat tekintve antagonisták. A szolubilis IL-6 receptor (sIL-6R) épp ellenkezoleg, agonistaként viselkedik. A szolubilis IL-6R az IL-6-ot alacsony affinitással köti, majd a sIL-6R/IL-6 komplex együttesen hozzá tud kapcsolódni a membránkötött gp130 molekulához, és azzal komplexet alkotva jelátviteli folyamatot tud kiváltani (51). Mivel a gp130 molekula egy kilenctagú citokincsalád közös jelátviteli egysége, ezért mai ismereteink szerint minden szervezetben eloforduló sejten expresszálódik. Ez egyben azt is jelenti, hogy az IL-6/sIL-6R kettos bármilyen sejttípuson képes választ kiváltani, olyanokon is, amelyek nem termelnek endogén IL-6R-t (102). Az a tény, hogy nagyon sok betegség esetében kimutatták a sIL-6R emelkedett szintjét, arra utal, hogy termelodése, valamint hatása velejárója a betegségek lefolyásának (48, 160, 117, 133). Jelenléte, az IL-6 hatásának kiterjesztése révén, alapvetoen befolyásolhatja mind a lokális, mind a szisztémás, IL-6 által kiváltott folyamatokat, azok egyik legfobb szabályozójává léphet elo. Az élettani funkciók szabályozásában és számos betegség patogenezisében a sIL-6R ezért ugyanolyan fontos szereplové vált, mint az általa megkötött citokin.

Keletkezése két módon mehet végbe. Egyik esetben a sejtfelszíni forma lehasításával keletkezik, amely folyamatban endogén, vagy baktériumok által termelt exogén metalloproteázok vesznek részt (151, 142). A másik esetben génexpressziós szinten történik változás: az IL-6 receptort kódoló mRNS alternatív hasítása egy transzmembrán régiót nem tartalmazó, rövidebb, fehérjeszinten szolubilis receptorként megjeleno változatot eredményezhet (49).

Jelátvitellel foglalkozó munkacsoportunk vizsgálatai az IL-6 által kiváltott jelátviteli jelenségekre, az IL-6 hisztamin hatását befolyásoló szerepére, illetve az IL-6/sIL-6R komplex által kiváltott hatásokra irányultak. Ez utóbbi témához kapcsolódik dolgozatom, amely a szolubilis IL-6 receptor IL-6-ot módosító hatásainak vizsgálata mellett, az alternatív „splicing” útján létrejövo szolubilis receptor különbözo körülmények hatására megváltozó megjelenésének vizsgálatára is irányult.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

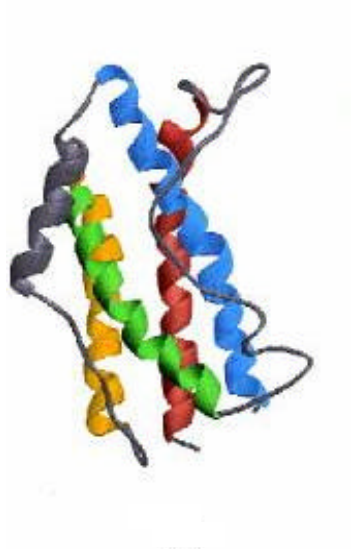
3.1. Az IL-6 receptor családba tartozó citokinek

Az IL-6 receptorcsaládba azok a citokinreceptorok tartoznak, amelyek közös gp130 jelátviteli láncon keresztül fejtik ki hatásukat. Jelenleg kilenc citokin ligandot ismerünk, amelyek receptora gp130-ot tartalmaz: az *interleukin-6* (IL-6) és két változata: a *Kaposi sarcoma associated human herpes virus 8 interleukin-6* (KSV-IL-6), és a *Rhesus macaque rhadinovirus interleukin-6* (Rm-IL-6); a *leukemia inhibitory factor* (LIF); az *oncostatin M* (OSM); a *ciliary neurotrophic factor* (CNTF); az *interleukin-11* (IL-11); a *cardiotrophin-1* (CT-1); és a *cardiotrophin-like novel neurotrophin-1*-nek nevezett citokin (CLC/NN-1) (163, 139, 10). Nagyon valószínu, hogy a genom kutatások eredményeként további ligandokat fognak találni az eddig megismert gp130 citokinek mellé.

3.1.1. Az IL-6 biológiai hatásai

Az IL-6 helikális szerkezetu glikoprotein, molekulasúlya 20-30 kDa, attól függoen, hogy mely sejttípus termeli. A különbözoség a poszttranszlácionális módosítások eredménye, amely nem befolyásolja a citokin biológiai aktivitását. A molekula háromdimenziós szerkezetében az N- és C-terminális szakaszok egymás közelében helyezkednek el, így a molekula egy hurkot képez (1. ábra).

A gp130-as citokinek közé sorolják, mivel jelátvitele a membránkötött 130kD molekulasúlyú glikoproteinen keresztül valósul meg. Pleiotróp hatású citokin, amelyet nagyon sokféle sejttípus termel - monociták/makrofágok, endotél sejtek, fibroblasztok, keratinociták, aktivált T- és B-limfociták, mezangiális sejtek, glia sejtek, kondrociták, oszteoblasztok, simaizom sejtek, granulociták, hízósejtek és sokféle tumorsejt -, és amely nagyon sokféle célsejtre hat. A célsejt típusától függoen lehet sejtosztódást serkento, gátló, differenciálódást, sejtaktivitást elosegíto hatása, amelyet az 1. táblázat foglal össze.



1. ábra: **Az IL-6molekula térszerkezete**

Négy ? hélixbol és az ezeket összeköto hurkokból áll. A négy hosszú ? -helix piros, zöld, sárga és kék, az összeköto szakaszok szürkék.

Heinrich, 1998. (43)

Azt, hogy az IL-6 igen sokféle szerepet tölt be az élettani folyamatok során, tükrözi korábbi elnevezéseinek sokfélesége: IFN-? 2, hepatocita stimuláló faktor (HSF), citotoxikus T-sejt differenciációs faktor, B-sejt differenciációs faktor, B-sejt stimuláló faktor-2. Mivel - ahogy elozo nevei is mutatják - a gyulladásos folyamatok kialakulása során szerepe van a T-limfociták aktiválásában és megsokszorozódásában, a B-sejtek differenciálódásában, és a májsejtek akutfázis fehérje termelésének indukálásában, ezért pro-inflammatorikus, gyulladásserkento citokinnek nevezheto. Ezzel szemben, különbözo betegségekben – például endotoxin által kiváltott szeptikus sokkban (148) - az IL-6 a gyulladásos válaszreakciókkal szemben védelmet is nyújt, tehát ez esetben anti-inlammatorikus, gyulladásgátló citokinnek tekintheto. Gyulladásgátló hatását támasztja alá, hogy a gyulladásos citokinek expressziójának csökkentésével, illetve ezzel egyidejuleg az IL-1R antagonisták, valamint a szolubilis TNF? receptor expressziójának serkentésével gátolja a pro-inflammatorikus citokinek hatását (119, 145).

1. táblázat: az interleukin-6 biológiai hatásai (155, 149, 52, 106, 151, 138)	
Cél: Sejt-, szövettípus	**I. növekedésserkentés**
Myeloma/plasmocytoma sejtek (149, 139)	Növekedésserkentés autokrin módon
Kaposi szarkóma sejtek (81)	Osztódás
Vese mezangiá lis sejtek (139)	Osztódás
Keratinociták (98)	Osztódás
Fibroblasztok (27)	Osztódás
	II. növekedésgátlás
Mieloid leukémiás sejtvonal in vitro (150	Növekedésgátlás, makrofág-szeru sejtekké differenciálódás
Bizonyos karcinóma vonalak in vitro (pl. emlo karcinóma) (151)	Növekedésgátlás
Bizonyos melanoma sejtek in vitro (71), melanociták in vitro (135)	Növekedésgátlás
	III. immunológiai szabályozás
B-limfociták (155, 138)	Plazmasejtté érés, immunglobulin termelés (IgM, IgG, IgA)
T-limfociták (139)	Osztódásserkentés, IL-2 termelés fokozása, IL-2R kifejezodésének serkentése, citotoxikus T-sejtté differenciálódás
NK sejtek (72)	Aktivitásserkentés
Makrofágok (2)	Aktiváció, fagocitózis serkentés (ugyanakkor osztódásgátlás)
	IV. vérképzés
Mieloid progenitor sejtek (52)	IL-3 függo osztódás erosítése
Megakariociták (52)	Érés és poliploidizáció
	V. Akut-fázis fehérje szintézis
Májsejtek (131, 122, 31, 108)	Akut-fázis fehérje szintézis serkentése: jelentosen megno a haptoglobin, a C3 komplement komponens, az alfa-2 makroglobulin termelése, jelentõsen csökken az albumin szintézis, glükokortikoid receptor expressziójának fokozása
Hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely (101, 21, 22)	Hipotalamikus CRF fokozása révén ACTH termelés, ezáltal glükokortikoid termelés serkentés: IL-6 termelés csökken, IL-6R expresszió limfoid-, mieloid, májsejteken no
	VI. Csont metabolizmus
Oszteoblasztok (26)	Autoregulációs hatás
Oszteoklaszt prekurzorok (66)	Oszteoklasztok kialakulása
	Csontfelszívódás indukálása (44)
	VII. idegrendszer
Perifériás idegsejtek (109)	differenciálódás
PC12 sejtek in vitro (93)	Neurális differenciálódás
Hipotalamusz-hipofízis rendszer (126)	ACTH termelés mellett, prolaktin, növekedési hormon, sárgatest serkento hormon termelés serkentése
	VIII. embrionális fejlodés
Trofoblasztok (88)	LIF-fel együtt növekedésserkentés
Placenta (94)	Trofoblasztok HCG szekréció serkentése
	IX. keringési rendszer
Endotél sejtek in vitro (11)	PDGF termelés serkentése
Endotél sejtek (115)	Motilitás serkentése (angiogenezis elosegítése)
Vaszkuláris simaizom sejtek (23)	negatív inotropikus hatás

Az IL-6 termelodését nagyon sok tényezo befolyásolja, különbözo mediátorok (hisztamin), más citokinek (IL-1, TNF?), hormonok (ACTH, kortikoszteroidok) (86). A kortikoszteroidok és az IL-6 kapcsolata külön kiemelendo. Az IL-6 hatása az endogén glükokortikoidok révén kettos szabályozás alatt áll. Egyrészt csökkentik az IL-6 expresszióját, ugyanakkor növelik az IL-6 receptor mennyiséget. Bár így kevesebb ligand áll rendelkezésre, de a nagyobb számban kifejezodo receptor miatt hatékonyabb és hosszabb hatást tud kifejteni (22). Ez egyrészt az IL-6 gerjesztette folyamatok elhúzódását, másrészt az IL-6 kiváltotta védofunkciók kiteljesedését okozza. Az IL-6 fokozza a kortikoszteroidok termelodését. Az IL-6 kortikoszteroid szintézis fokozódó hatása révén a szervezet szintjén gyulladás gátló, míg lokálisan – ízületben, bélben - egyes destruktív folyamatok erosítése révén inkább gyulladásfokozó hatású.

Az intézetünkben rendelkezésünkre álló HDC KO egérmodellen in vivo is igazoltuk a sejtvonalakon in vitro már elért eredményeket, miszerint a hisztamin befolyásolja az IL-6 termelodést. Mivel a HDC az egyetlen ismert enzim, ami a hisztamin termelodéséért felelos, így hiányában, kísérleti állatainkban – hisztamin mentes diéta mellett - nem található meg maga a hisztamin sem. Az ilyen HDC -/- állatok szérumában a kontrollnál alacsonyabb IL-6 szintet mértünk, míg az állatok májsejtjeinek IL-6R és gp130 mRNS szintje szignifikánsan emelkedett.

Bár alapveto élettani muködéseket szabályoz, az IL-6 ennek ellenére nem tekintheto létfontosságú citokinnek, csak a sejtek muködését szabályozó, erosen redundáns citokinhálózat egyik résztvevojének, (a vérképzés szabályozásában az IL-3-mal, a korai embrionális fejlodés szabályozásakor a LIF-fel, az akut-fázis reakció kiváltásában az IL-1-gyel együtt hat). Ezt támasztja alá az a tény, hogy IL-6 KO egerek életképesek és csak enyhe rendellenességeket mutatnak (62).

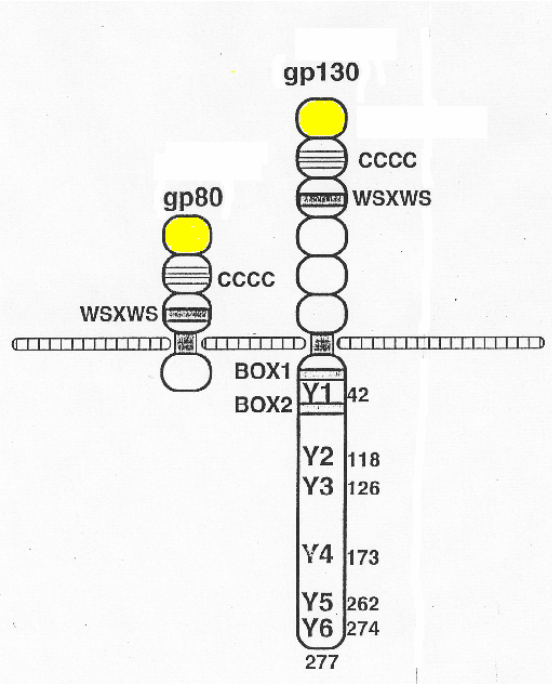
3.1.2. Az IL-6 receptor

Az IL-6 receptora a többkomponensu receptorok közé tartozik. Sejtfelszíni receptor komplexe két alegységet tartalmaz: az IL-6 köto, 80 kD méretu gp80 (CD126), és a jelátvitelért felelos, 130 kD méretu gp130 (CD130) molekulát (136). Az IL-6 három receptorkötohellyel rendelkezik: egy az IL-6R-t köti, a második és a harmadik két szignáltranszdukciós gp130 alegységhez kötodik (128).

A humán interleukin-6 receptor egy 339 aminosavból álló extracelluláris részt, egy 28 aminosavból álló transzmembrán területet és egy 82 aminosavból álló citoplazmatikus

farkat tartalmaz. Extracelluláris részén egy immunglobulin-szeru domén mellett két III. típusú fibronektin domént tartalmaz, amelyek mindegyike hét ? lemezbol áll. Ezek egymással ellentétesen elhelyezkedve formálják a „hordó-alakú” ligandköto helyet (9). A két domént összekapcsoló területen található egy triptofán-szerin-X-triptofán-szerin (WSXWS) aminosav motívum, aminek fontosságát kiemeli, hogy hiányában/mutációja esetén nem képes ligand kötésre a receptor. Ugyanilyen alapveto szereppel bír a szomszédos doménben található négy cisztein konzervált helyzete, ezek hiánya is a receptorfunkció elvesztésével jár (2) (2.ábra). A receptor citoplazmatikus farkán nem található ilyen katalitikus domén, a jelátvitelben sincs szerepe, ezért ennek a régiónak hiánya nem befolyásolja a citokinre adott sejtválaszt. Így a jelátvitelben egy másik, az IL-6R-hoz kapcsolódni képes, több citokinreceptor felépítésében is szerepet játszó molekula, a gp130 vesz részt. Ez a 130 kDa molekulasúlyú glikoprotein a receptorkomplex ? alegysége a 80 kDa-os ? -nak nevezett alegység mellett. A gp130 molekula felépítésében ugyancsak részt vesz a citokinreceptor családra jellemzo III. típusú fibronektin domén, a négy cisztein és a WSXWS motívum (2.ábra).

2. ábra: **Az interleukin-6 receptor és a gp130 szerkezete**

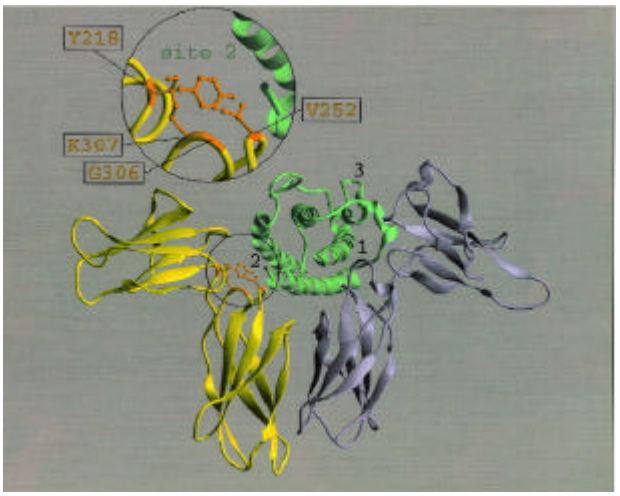


Az IL-6R extracelluláris része tartalmazza az immunglobulin-szeru domént (sárga szín) és a citokin receptor családra jellemzo szerkezetet, amely két III. típusú fibronektin doménbol áll: itt található meg a WSXWS (triptofán-szerin-X-triptofán-szerin) aminosav motívum, és a CCCC : négy konzervált elhelyezkedésu cisztein aminosav. A gp130 extracelluláris része szintén tartalmazza ezt a szerkezetet.

(Akira nyomán (2))

Nyugalomban az IL-6 receptor két alegysége a membránban egymástól távolabb helyezkedik el, csak IL-6 jelenlétében tudnak egymáshoz kötodni. Az IL-6 a sejt felszínén eloször a gp80 (? -alegység) specifikus IL-6 köto fehérjelánchoz kapcsolódik. Ez a bekötodés két gp130 (? -alegység) membránfehérje homodimerizációját váltja ki. Az IL-6 receptorát tanulmányozó munkacsoportok között megoszlanak a nézetek, hogy ezután a dimerizáció után azonnal aktiválódik a jelátviteli út (43), vagy egy újabb IL-6/gp80 komplex kapcsolódása következik, így alakítva ki a hattagú jelátviteli komplexet (45). Ez utóbbi álláspontot támasztja alá a tény, hogy a gp130 az IL-6 két különbözo részéhez képes kötodni, de csak miután a ligand eloször egy harmadik kötohellyel kapcsolatot létesített a jelátvitelben szerepet nem játszó IL-6R-ral.

3. ábra: **Az IL-6 kötohelyei és kapcsolata az IL-6R-ral és gp130-cal**



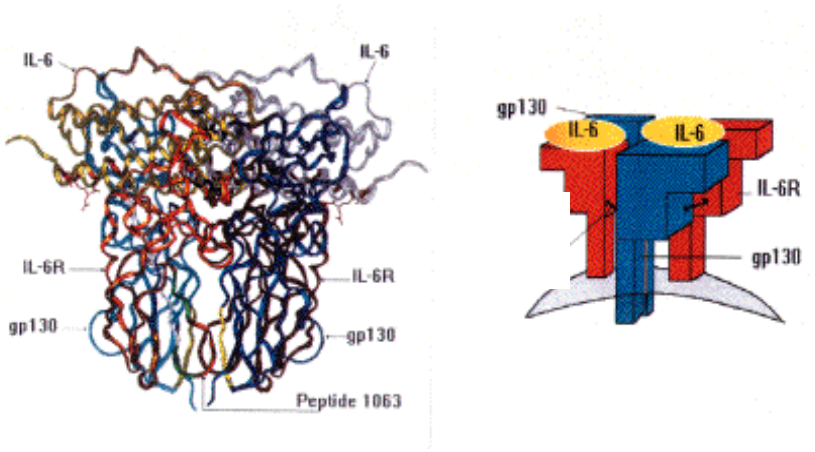
Az IL-6 zöld, az IL-6R lila, a gp130 sárga színu.

1: az IL-6 IL-6R köto helye, 2 és 3: az IL-6 gp130 kötohelyei. Narancssárgával a gp130 IL-6 kötésében szerepet játszó aminosavak láthatók.
(Heinrich 1998. (43))

Ezért mivel az IL-6 egy kötohellyel köt az IL-6R-hoz és két kötohellyel képes két gp130-hoz kötni (3. ábra), ezeken a helyeken két külön gp130 molekulát „fog meg”, a két ligand pedig keresztköti a gp130 molekulákat (10, 4. ábra). Grotzinger

munkacsoportja szerint mindkét komplex kialakulása lehetséges (37), szerintük a két gp130-at tartalmazó tetramer struktúrához egy újabb IL-6/IL-6R kettos hozzákapcsolódásával alakul ki a hexamer szerkezet. A két komplex közül azonban csak a tetramer szerkezetben alakul ki a két gp130-nak a jelátvitelhez szükséges konformációja.

4. ábra: **Az IL-6 receptorkomplex szerkezete**



balra: a hexamer feltételezett térszerkezete

jobbra: az IL-6R (piros), gp130 (kék), IL-6 (narancssárga) hexamer sematikus ábrázolása

(az ábra eredetije:bioinfo.weizmann.ac.il/_ls/michel_revel/ michel_revel.html)

Akár a tetra-, akár a hexamolekuláris komplex játszik szerepet az IL-6 hatásának érvényesülésében, maga az IL-6 citokin bekapcsolódása teszi lehetové a komplex kialakulását.

Az IL-6R heterodimer komplex szerepét az IL-6 hatásának lehetové tételében munkacsoportunk is igazolta antiszensz oligonukleotidok (ASO) alkalmazásával. Munkacsoportunk korábbi eredményei azt mutatták, hogy májsejtekben IL-6 hatására az egyik elsoként expresszálódó gén a junB transzkripciós faktor génje (51).

Megállapítottuk, hogy az IL-6R specifikus ASO nem, vagy kismértékben csökkenti a junB expressziót, míg a gp130-specifikus ASO erosebb gátló hatással bírt. Az IL-6 citokin májsejteken zajló jelátvitelében tehát elsosorban az általános gp130 transzdukciós lánc megléte a limitáló tényezo, míg a citokinkötésért felelos IL-6R mRNS kiküszöbölése nem változtatott lényegesen a citokin által kiváltott válaszon. A gp130 minden szervben elofordul: a szívben, vesében, lépben, májban, tüdoben, placentában és agyban (116). Ezzel szemben a vele rokon membránkötött IL-6R expressziója bizonyos sejttípusokra – elsosorban májsejtekre, fehérvérsejt populációkra – korlátozott. Az élettani folyamatokban betöltött központi szerepét bizonyítja, hogy a gp130 KO egerek még embrionális korban elpusztulnak (161).

Bár a gp130-at elsoként az IL-6R jelátvitelben szerepet játszó komponenseként fedezték fel, a gp130 több más citokinreceptorral együtt is elofordul. Így mind az IL-6, mind az ugyanebbe a „gp130 családba" tartozó citokin receptorának jelképzésében nélkülözhetetlen lánca. A gp130-t használó citokinek: az IL-6 mellett az ossejtek osztódásához nélkülözhetetlen leukémia gátló faktor (LIF); az egyes tumorokat gátló oncostatin M (OSM), a vérképzésben és B-sejt differenciálódásban szerepet játszó IL-11; a szívmuködés szabályozásában szerepet játszó kardiotrofin-1 (CT-1); a ciliáris neurotrofikus faktor (CNTF) neurokin, és egy újonnan felfedezett neurotrofin-1/B-sejt stimuláló faktor-3-nak elnevezett mediátor (123). Az IL-6R cDNS szekvenciájához a CNTF-R-é mutatja a legnagyobb homológiát (17).

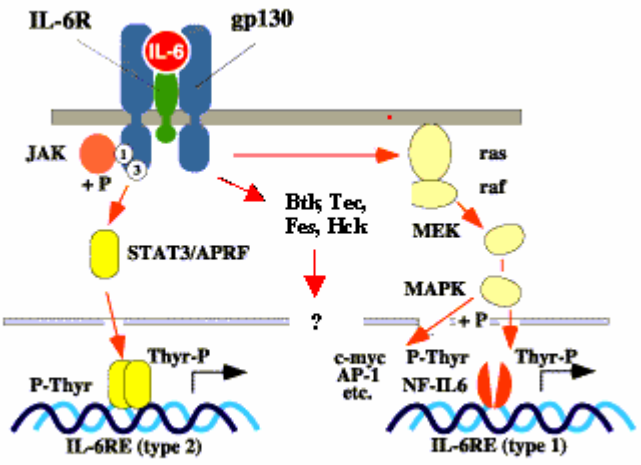
Az IL-6 receptor komplex mindkét alegysége, a gp130 és a gp80 lánc is elofordul mind membránkötött, mind szolubilis formában (sgp130, sIL-6R) (114, 154).

3.1.3. Az IL-6 jelátvitele

Mai tudásunk alapján a gp130 citokinreceptor család esetében a jelátvitel kétféle fo aktivációs utat jelent, de a gp130 „alternatív" jelátviteli útjairól is jelentek meg közlemények: Matsuda és munkacsoportja a Btk kináz, a Tec kináz, és a Fes tirozinkináz, Ernst és munkatársai a Hck kináz gp130-on át zajló aktivációjáról számolnak be (77, 78, 20).

A fo utak közül az egyik a JAK-Stat aktivációs rendszert használja, míg a másik adaptorfehérjéken keresztül zajló elágazó út erosíti a fo JAK-Stat vonalat (45) (5. ábra).

5. ábra: **Az IL-6 jelátviteli útjai**



A JAK tirozinkinázok által foszforilált Stat fehérjék homo-, vagy heterodimer formában tirozinon foszforilálódnak, majd a magba jutva a DNS-hez kötodnek. A ras-raf jelátviteli rendszer a MAP kinázon át NF-IL6, AP-1, c-myc... transzkripciós faktorok DNS-hez kötodését váltja ki

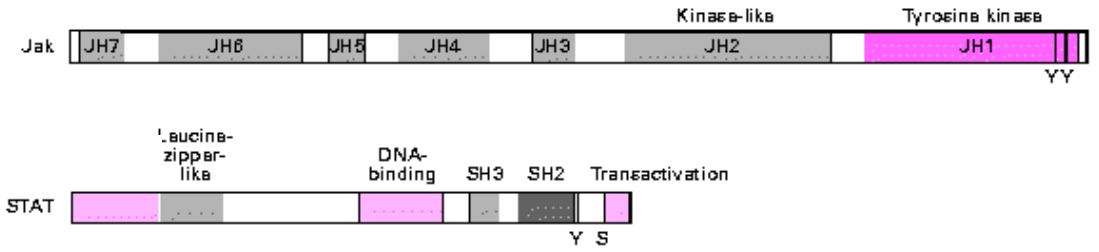
(Bendtzen (1996) nyomán)

A JAK tirozinkinázokon át zajló Stat aktiváció a következoképpen megy végbe (42): a gp130 jelátviteli receptor alegység citoplazmatikus részéhez kötodnek az inaktív JAK1, JAK2 és TYK2 tirozinkinázok. Az IL-6 indukálta homodimerizáció nyomán a két gp130 alegység egymáshoz közel kerül és a JAK/TYK enzimek egymás, illetve a gp130 láncok intracelluláris tirozinjait foszforilálják. A foszforilált citoplazmatikus részek ezek után további adaptorfehérjékkel alkotnak átmeneti komplexeket, lehetové téve a fo jelátviteli út mellett alternatív jelképzési lehetoségeket.

A kezdeti lépéseket követoen Stat molekulák - elsosorban Stat1 és Stat3 - SH2 doménjükkel kapcsolódnak a tirozinon foszforilált gp130-hoz. A JAK kinázok a gp130-hoz kötött Stat-ok tirozinjait ugyancsak foszforilálják. Ezután a foszforilált Stat-ok a gp130-ról leválva, SH2 doménjeikkel felismerve és megkötve a foszforilált tirozinokat, hetero- (Stat1-Stat3), majd homodimereket (elsosorban Stat3-Stat3) alkotnak. A Stat

dimerek további (PKC-, PKA-függo) szerinfoszforilácion mennek keresztül, ami lehetové teszi sejtmagba jutásukat, és DNS-hez - foként APRE enhancer elemekhez - kötodésüket. Az IL-6 által kiváltott, Stat közvetített génexpressziót korai illetve késoi gének aktiválódása jelzi: elobbire a c-fos, a c-myc (64), a junB protoonkogén, utóbbira számos akutfázis fehérje megjelenése a példa (43). A Stat és JAK szerkezetét a 6. ábra mutatja be.

6. ábra: **A JAK és Stat molekulák felépítése**



A foszforilálható tirozin (Y) és szerin (S) aminosavakat fekete vonalak jelölik.
Heinrich 1998. (43)

Az IL-6 a klasszikus Stat1/3 mellett a Stat5 aktivációját is eloidézheti. A Stat5 jellemzoen glükokortikoid receptorhoz kötodo transzkripciós faktor, ami gátolja a glükokortikoid receptor muködését, ezzel gátolva a kortikoszteroidok IL-6 szint csökkento hatását (22).

A Stat-ok által nemcsak a jelátvitel serkentése, hanem gátló szabályozása is megvalósul. A Stat3 közremuködésével keletkezo Stat-inhibitorok: SSI, SOCS, JAB a jelátviteli út különbözo pontjain fejtenek ki gátlást (3).

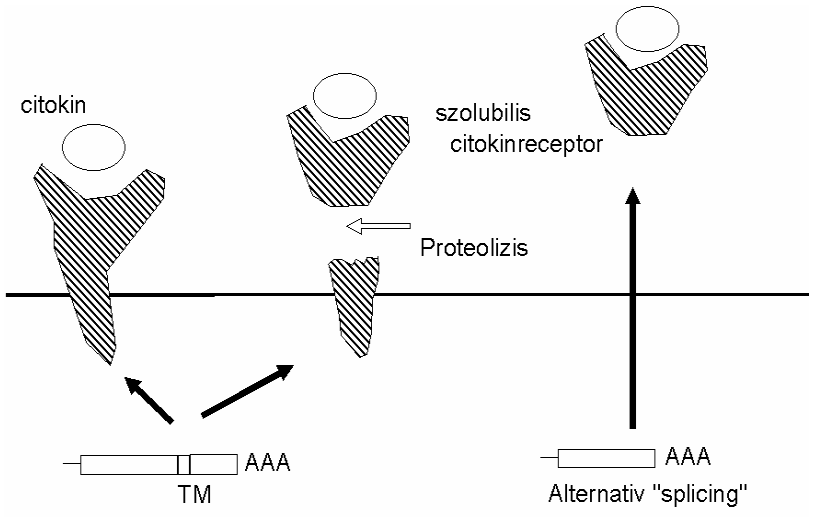
A JAK/Stat út mellett gp130-on keresztül a ras – raf – MAP-kináz jelátviteli út is aktiválódik. A JAK1/JAK2 által foszforilált gp130-hoz az SHP2 tirozin foszfatáz kapcsolódni képes, ezután a JAK-ok foszforilálják az SHP2-t is, amely Grb2-n keresztül kapcsolódik a ras-hoz. Ezen a jelátviteli kaszkádon át nagyon sok, egymástól eltéroen aktiválódó kapcsolófehérje teszi lehetové változó összetételu jelátviteli komplexek létrejöttét és így a sejtekben esetenként eltéro transzkripciós aktivitást.

A ras-dependens MAP-kináz jelátviteli út elsosorban az IL-6 hatásra osztódásnak induló sejttípusokban jellemzo és végso soron az NF-IL6, az AP-1 (c-jun és c-fos) és C/EBP? transzkripciós faktorok keletkezéséhez vezet, amelyek foleg az I. típusú IL-6 reszponzív elemhez (RE) kapcsolódnak a gének regulátor régióiban (96).
Az IL-6 az akutfázis reakció során a májsejtekben a II. típusú IL-6 RE-hez (APRE-hez) kötodo Stat-ok és az I. típusú IL-6 RE-hez köto transzkripciós faktorok más-más fehérjék expresszióját váltják ki. I. típusú IL-6 RE-t tartalmaz a CRP, a hemopexin A és a haptoglobin génje, APRE található a fibrinogén, az ? 2 makroglobulin, az ? 1-savas glikoprotein és a haptoglobin génjeiben (a haptoglobin génjének regulátor része mindkét transzkripciós faktort köti) (40, 57, 15,156).

3.1.4. A szolubilis IL-6 receptor keletkezése és biológiai hatásai

A sejtfelszínen membránhoz kötve elhelyezkedo alacsony affinitású, 80 kDa, specifikus IL-6 köto receptor alegység 468 aminosavból épül fel (158). A biológiailag aktív szolubilis IL-6R 50-55 kDa-s molekula nem tartalmazza a transzmembrán domént. Foképp a membránkötött forma proteolízisével és a membránról való leválásával („shedding”) keletkezik (91, 89). Ugyanakkor keletkezésének másik módja a receptor mRNS alternatív hasítása (alternatív „splicing”) (137, 49, 114) (7. ábra).

7. ábra: **Szolubilis citokinreceptorok keletkezési módjai**



A receptorok között elég ritka, hogy mindkét keletkezési módon létrejöhet a szolubilis forma. A kétféle módon keletkezo szolubilis IL-6R fehérjének így legalább kétféle különbözo változata létezik, de máig nem tisztázott, hogy e kétféle változat befolyásolja-e a receptor hatékonyságát.

A szolubilis IL-6 receptort eloször 1989-ben mutatták ki humán mintán, eloször vizeletben (44), majd nem sokkal rá HIV fertozöttek szérumában (46).

A szolubilis receptorok közös jellemzoje, hogy a ligandot a membránkötött formához hasonló affinitással tudják megkötni, hatásmechanizmusukban azonban igen eltéroen viselkedhetnek. Lehetnek antagonisták, mivel a ligandot megkötik a membránkötött receptor elott, így a citokin nem tud jelet kiváltani a célsejten. Ilyen a gp130 szolubilis formája, amely tehát negatívan befolyásolja a sejtek IL-6-ra adott válaszát. Másrészrol a szolubilis receptorok lehetnek agonisták, ami a többkomponensu receptoroknál a ligandspecifikus alegységekre jellemzo: ezek a szolubilis receptorok a ligand megkötése után képesek a másik, membránhoz kötött jelátviteli alegységhez kötodni, s így a sejtben jelátviteli kaszkádot indítani. Ide tartozik a szolubilis IL-6 receptor is. Az agonistaként ható szolubilis receptorok az IL-6 receptorán kívül jelenleg a szolubilis CNTF receptor, a szolubilis IL-11 receptor, a szolubilis GDNF receptor és - eddig ugyan csak humán dermális fibroblaszton jelentkezett agonista hatása -, a szolubilis IL-1 receptor. Az IL-6, a CNTF és az IL-11 ugyanazt a jelátviteli rendszert használja, míg a GDNF és IL-1 más-más jelátvivo rendszerekhez tartoznak (16, 8, 147, 129).

A szolubilis IL-6R a sejtfelszínen megtalálható formához hasonlóan ugyancsak a sejtfelszíni gp130-cal kötodve fejti ki hatását. Mivel gp130 szinte minden magvas sejten elofordul, jelenlétében az addig IL-6-ra nem érzékeny sejtek IL-6 érzékennyé válnak. Ezért, mint az IL-6 hatását hatékonyan növelo természetes, in vivo körülmények közt ható agonista faktort tarthatjuk számon. Az eredetileg endogén módon IL-6 receptort expresszáló sejteken ugyanakkor gátló hatást fejthet ki, mivel vetélkedik a sejtfelszíni receptorral a – különösen a gyulladási reakció elején - kis mennyiségben megtalálható IL-6-ért. Erre a gátlásra a jelátviteli úton szerepet kapó Stat dimerizáció és a korai génként expresszálódó a junB mRNS mennyiségének követésével találtak bizonyítékokat (51). Bár a sIL-6R jelátvitele esetén eddig még nem mutatták ki a JAK/Stat út mellett a ras-raf utat, az, hogy a szolubilis receptoron keresztüli IL-6 hatás serkenti bizonyos sejtek osztódását, arra utal, hogy a MAPK kaszkád is aktiválódik, csakúgy, mint a membránkötött receptor közvetítésével (53). Elvileg bármely membránkötött IL6R-t expresszáló sejt – májsejtek, különbözo fehérvérsejt populációk

- képes képezni sIL6R-t, vagy sejtfelszíni proteolízissel, vagy a receptor mRNS alternatív hasításával. A sejt felszínérol való leválás a stimulus után mindig sokkal gyorsabban bekövetkezo folyamat (30-120 perc) (54), mint az alternatív mRNS hasítással létrejövo változat de novo keletkezése: az RNS-„splicing”, a leolvasás és a fehérje sejtbol való kikerülése 8-24 órát vesz igénybe (12). A kétféle sIL-6R nemcsak keletkezési módjában, sebességében különbözik egymástól, hanem a keletkezésüket befolyásoló szabályozó faktorok sem azonosak. A kétféle módon keletkezett sIL-6R fehérjeszinten, C-terminális aminosav-szekvenciájában sem egyezik meg egymással. A sIL-6R mind alternatív mRNS hasítással, mind a membránkötött forma „shedding” mechanizmusú leválásával egyazon sejttípuson is kialakulhat (142).

A sIL-6R létrejöttének egyik módja a sejtfelszíni IL-6R-ról proteolízissel való leválás („shedding”) (91). Az endogén proteázok proteolitikus hasító helyét a receptor C-terminális aminosav analízisével közvetlenül a transzmembrán domén elott találták meg (90). Az azonban még mindig nem tisztázott, hogy mely(ek) azok az enzim(ek), amely(ek) a hasítást végzik.

A „shedding” stimulátorai endogén, vagy baktériumokból származó - Serratia marcescens, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Listeria monocytogenes - exogén metalloproteázok. Vollmer és munkacsoportja kimutatta, hogy a bakteriális proteázok nem ugyanazon a helyen hasítják az IL-6R-t, mint az endogén proteázok (152). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a sejtfelszíni receptor többféle helyen történo lehasításával is kialakulhatnak biológiailag aktív szolubilis receptorok. Humán monocitákon a PMA, különbözo bakteriális exotoxinok, mint a streptolysin O. vagy az E. coli hemolysinje, perceken belül stimulálja in vitro a „shedding” bekövetkeztét. A PMA aktiválja a proteinkináz-C enzimet (92). A PMA hatására a membránkötött proteinkináz-C (PKC) izotípusok mellé további citoplazmatikus PKC-k plazmamembránhoz vándorlását figyelték meg. A PMA megkötése az enzim aktív helyének foszforilációját vonta maga után, ami az IL-6R? „sheddingjéhez” vezetett (143).

A „sheddinget” in vivo szepszisben, HIV fertozésben és reperfúziós sérülésekben mutatták ki bakteriális FMLP indukálta neutrofil granulocitákból. Jones és munkacsoportja kimutatta, hogy az ily módon indukált akutfázis reakció során mintegy 500-szorosára megemelkedett CRP szint – amelyért a májsejtekre ható megemelkedett mennyiségu IL-6 felelos -, elosegíti a sejtfelszíni proteolízist (54).

Az endogén metalloproteázok közül valószínuleg az ADAM enzimcsalád tagjai játszanak szerepet az IL-6R „sheddingjében” is (143).

A „sheddinget” különbözo sejttípusokon in vitro gátolja a TIMP-3, a hydroxamát-alapú metalloproteináz inhibitorok: BB-94 (39), TAPI metalloproteáz inhibitor és az O – fenantrolin (1,10-phenantrolin) (12, 152), de meglepo módon a neutrofil granulociták sIL-6R képzését nem befolyásolja (54). Utóbbi megfigyelés arra utal, hogy a TAPI-val gátolható proteolízis mellett más proteolitikus utak is léteznek.

A szolubilis IL-6R keletkezésének másik módja az mRNS alternatív hasítása, melynek eredményeként egy rövidebb, a transzmembrán régiót kódoló részt nem tartalmazó RNS változat jön létre. A hasított RNS változatban a hasítás miatt kialakuló frame-shift az eredeti receptorétól eltéro aminosavak beépülését eredményezheti. Ilyen például az in vivo mononukleáris sejtek által termelt egyik sIL-6R változat esetében a 3’ - eredetileg citoplazmatikus - végen jelenlévo GSRRRGSCGL (gly-ser-arg-arg-arg-gly-ser-cys-gly-leu) szekvencia (49). Ez ellen a jellegzetes szekvencia ellen termeltetett antitestekkel kimutatható az alternatív „splicing” révén létrejött sIL-6R változat fehérje szinten is, mind in vitro (49), mind in vivo (48).

Az még nem tisztázott teljesen, hogy mely faktorok vezetnek az IL-6R alternatív „splicing” folyamatához. Néhány faktorról vannak adataink, miszerint elosegítik az alternatív hasítást. A dexametazon, egy szintetikus glükokortikoid alternatív „splicing” folyamatát elosegíto hatása arra utal, hogy a természetes glükokortikoidok szerepet játszhatnak az alternatív „splicing” révén kialakuló sIL6R képzésében (12). Az IL-1?, az OSM in vitro hepatoma sejtvonalon (32, 12), a fitohemagglutinin in vitro T-sejtvonalon (49) idézi elo, illetve serkenti az IL-6R mRNS hasítását. Az alternatív „splicing” in vitro inhibitora hepatoma sejtvonalon a cycloheximid (12). In vivo és általános, bármely sejtre vonatkoztatható adataink jelenleg sem a „splicing” folyamatát serkento, sem az azt gátló faktorok tekintetében sincsenek.

A sIL-6R szerepét önmagában nem igazán lehet megítélni, hatása többnyire az IL-6-tal kapcsoltan jelentkezik. Munkacsoportunk vizsgálatai szerint a sIL-6R a junB korai protoonkogén RNS-expresszióját önmagában, citokin ligand nélkül is kiváltja, de fehérjeszinten nem okozott változást (51). Ugyanakkor az a tény, hogy szolubilis IL-6 receptor jelenlétében az IL-6 életideje megno, és sokkal szélesebb sejt repertoárra képes hatni, a komplexet – és benne a szolubilis receptort – szinte az IL-6-tól különbözo citokinné alakítja (102).

Az IL-6/sIL-6R komplex osztódásserkento hatását Kaposi szarkóma sejteken (87), és synovialis fibroblasztokon (80), differenciálódást elosegíto hatását IL-1 indukálta prekurzorokból oszteoklasztokká alakuló sejtekben írták le eloször (141).

A hipotézist, miszerint a szolubilis receptor elosegíti az IL-6 hatásának a kiterjesztését, leginkább az IL-6/sIL-6R kettos transzgenikus egereken való in vivo megfigyelések támasztották alá. A kísérletekben megfigyelték, hogy az IL-6/sIL-6R komplex parakrin mediátorként fejti ki hatását (103), és más, erosebb hatással van a sejtekre, mint az IL-6 önmagában. A komplex hatására megnott a májsejtek osztódási kapacitása, ez hepatocelluláris hiperpláziához és a májsejtek transzformálódásához vezetett (75). A komplex hatására megemelkedett a plazmasejtek osztódási rátája, ami a csak IL-6 transzgenikus állatokéhoz képest korábban megjeleno és súlyosabb myeloma multiplex (MM) kialakulásához vezetett (120). Emellett a komplex aktiválta a csontvelon kívüli – májban, lépben zajló - felnottkori vérsejtképzodést is (105). Az in vivo állatkísérletek alapján bizonyítottnak látszik, hogy a sIL-6R az eredetileg IL-6-tal osztódásra nem serkentheto sejtek - hemopoetikus progenitor sejtek és májsejtek - osztódását eredményezte, ezenfelül felerosítette az IL-6 mitogén hatását a plazmasejtekre, elosegítve ezzel a myeloma multiplex kialakulását.

A csontveloi sztrómasejtek szintén nem expresszálnak IL-6R-t, de sIL-6R jelenlétében IL-6-válaszképessé válnak, s saját ligandjuk: az IL-6 termelésével és MMP-1/MMP-2 metalloproteináz termeléssel válaszolnak a sIL-6R hatásra (7).

Ex vivo köldökzsinór vérbol származó CD34+ ossejtek azon populációjában, amelyek eredetileg IL-6R negatívak voltak, az IL-6 sIL-6R (és SCF) jelenlétében dózisfüggoen emelte a megakariocitává alakulást. Eszerint - mivel a CD34+ sejtek dönto része nem expresszál IL-6R–t, a sIL-6R közvetíti az IL-6 hatását, így az IL-6 a sIL-6R-ral komplexben részt vesz a megakariocita képzésben (132).

Az IL-6 sIL-6R-ral komplexet alkotva az embrionális neuro-differenciációs folyamatokban is szerepet játszik. Taga munkacsoportja egy IL-6 és sIL-6R-t tartalmazó, kovalensen, linker nélkül összekapcsolt fúziós proteint hozott létre, FP6 néven. Az FP6, a LIF hatásához hasonlóan, az embrionális neuroepiteliális sejtek asztrocitákká való differenciálódását okozta (140).

Kimutatták, hogy a szolubilis receptort a perifériás vér mononukleáris sejtjei termelik (49), így a gyulladásos folyamatok erosítésében a magas helyi sIL-6R szintért felelos infiltráló fehérvérsejtek aktiválódása egyértelmuen nagy szerepet játszik.

A sIL-6R elosegíti a fehérvérsejteknek a gyulladás helyére vándorlását is: hatására adhéziós molekulák expresszálódnak mind az IL-6R-t nem expresszáló endotél sejteken, mind az erek simaizomsejtein. A sIL-6R simaizomsejtekre gyakorolt hatását Rose-John munkacsoportja ú.n. Hyper-IL-6-tal (H-IL-6) vizsgálta. A H-IL-6 kovalensen egymáshoz kötött IL-6-ot és sIL-6R-t tartalmazó fúziós fehérje, ami az FP-6-tól eltéroen linker régiót is tartalmaz. Humán aortából származó simaizom sejtek gp130 expressziója igen alacsony, de H-IL-6-tal inkubálva meglepo módon megemelkedett gp130 expressziójuk, ezzel egyidejuleg IL-6 termelésük is. A sejtek osztódási rátája hatszorosára emelkedett. Mindezek alapján a H-IL-6-nak autokrin serkento szerepére lehet következtetni, ami a simaizom sejtek gyulladásos folyamatoknak megfelelo állapotát eredményezi (61).

A sIL-6R, mint gyulladásos folyamatokban résztvevo mediátor szerepét alátámasztja, hogy kimutatták proteáz inhibitorok expressziójára gyakorolt hatását is. Az IL-6 önmagában alig, sIL6R jelenlétében viszont erosen növeli a porcsejtek és synovialis fibroblasztok TIMP-1 expresszióját (125).

Bár az oszteoklasztok toborzását az IL-6 önmagában is erosíti, a sIL-6R jelenléte a hatást tovább fokozza (26).

A sIL-6R-nak az IL-6-tot nemcsak erosíto, de gátló hatását is ismerjük: sIL-6R jelenlétében a pajzsmirigy muködését gátolja az IL-6 (159).

Az IL-6/sIL-6R biológiai hatásait a 2. táblázat foglalja össze.

A sIL-6R/IL6 komplexet a keringésbol a gp130 molekula távolítja el. Miután jelet indukált, a gp130-on keresztül endocitózisra kerül a komplex, majd a lizoszómákban degradálódik (34).

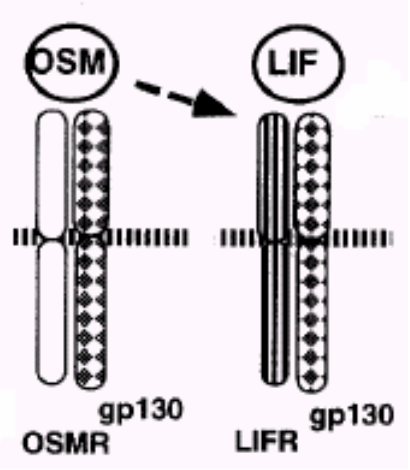
2. táblázat: **Az IL-6/sIL-6R komplex biológiai szerepe**

I. osztódásserkentés
Kaposi szarkóma sejtek (87)
Synovialis fibroblasztok (80)
Plazmasejtek kóros osztódásserkentése (120)
Hemopoetikus ossejtek serkentése felnott állat májában és lépében (105)
Májsejtek osztódásának serkentése és transzformálódásának elosegítése (75)
Vaszkuláris simaizomsejtek (61)
II. differenciálódás serkentése
Oszteoblasztok oszteoklaszttá differenciálódása (141)
CD34+ progenitor sejtek megakariocitákká differenciálódása (132)
Progenitor Schwann sejtek Schwann sejtté differenciálódása (38)
III. gyulladásos válasz
Májsejtek akut fázis fehérje szintézisének parakrin mediátora (73, 103)
porcsejtek és synovialis fibroblasztok TIMP-1 expressziójának serkentése (125)
Endotél sejteken adhéziós molekulák expresssziójának serkentése. (85)
Vaszkuláris simaizomsejteken adhéziós molekulák expressziójának serkentése (61)

3.2. Az oncostatin M

Az oncostatin M (OSM) az IL-6 típusú citokinek közé tartozik. Mind szerkezetében, mind biológiai hatásában a LIF-fel mutat rokonságot, mivel ugyanahhoz a receptor komplexhez – a szignáltranszdukció elindításában ugyancsak szerepet játszó LIF-R? és gp130 heterodimer - kötodnek (8. ábra). Az OSM-nek a fentin kívül van egy másik specifikus ? receptor alegysége, amivel szintén komplexet alkot a gp130. Az OSM mindkét esetben közvetlenül kötodik a gp130-hoz. Ez a kétféle receptor az IL-6 jelátviteléhez hasonlóan különbözo jelátviteli utakat aktiválhat: a gp130 dimerizációját követoen a JAK/Stat utat, illetve a ras-dependens MAPK utat (33).

8. ábra: **Az OSM receptorai**



Az OSM termeléséért aktiválódott T-limfociták, monociták/makrofágok, polimorfonukleáris sejtek felelosek (36), de a legújabb eredmények szerint az embrionális életben a fejlodo májban CD45+ hematopoetikus sejtek, bakteriális toxinokkal stimulált dendritikus sejtek, és bizonyos tumorsejtek is termelnek OSM-t (130, 118, 55).

Eredetileg tumor és nem tumor eredetu sejtek regulátoraként írták le (12), de hatása igen sokrétu: nagyon sokféle sejtben in vivo és in vitro egyaránt sokféle biológiai hatást vált ki (3. táblázat).

Az IL-6-hoz hasonlóan, pro-inflammatorikus és anti-inflammatorikus citokinként egyaránt jellemezheto. Elobbire az adhéziós molekulák (P-szelektin, E-szelektin, VCAM-1, ICAM-1) expressziójának kiváltása és a fehérvérsejtek vándorlásának elosegítése (84), utóbbira TNF? , GM-CSF, és az IL-8 termelodésének gátlása szolgáltat bizonyítékot (153).

3. táblázat: **Az Oncostatin M biológiai hatásai:**

I. növekedésserkentés
Fibroblasztok
Simaizom sejtek

Kaposi szarkóma sejtek	
Plasmacytoma sejtek	
II. növekedésgátlás	
Melanoma sejtek	
Glioma sejtek	
Cerebrális meningioma sejtek	
Szolid szöveti tumor sejtek	
Ép és tumoros emlosejtek	
Endotél sejtek	
III. „túlélési" faktor	
Sertoli sejtek és gonociták	
Oszteoklaszt sejtek apoptózisának gátlása	
IV. differenciálódás serkentése	
Glióma sejtek	
Emlosejtek	
Hemopoetikus tumor sejtek	
Embrionális májsejtek	
Endotél sejtek:	
V. differenciálódás gátlása	
Embrionális ossejtek	
VI. sejtválasz	
sejttípus	**hatás**
Általános	LDL-receptor mennyiség növelése
Porcsejtek	Proteoglikán szintézis szabályozása
Fibroblasztok	Plasminogen aktivátor expresszió
ECM	TIMP 1-3 és MMP hatás szabályozása
Kaposi szarkóma sejtek	Citokin termelés serkentés
Melanoma sejtek	Citokin termelés serkentés
Endotél sejtek	Citokin termelés serkentés Plazminogén aktivátor expresszió, Endotelin expresszió, Adhéziós molekulák expressziójának serkentése
Májsejtek és hepatoma sejtek (HepG2) in vitro	IL-6R „shedding", Akut fázis fehérjék termelésének szabályozása, citokróm p450 expresszió csökkentése

Rövidítések: OSM: Oncostatin M; LDL: low density lipoprotein; TIMP: szöveti MMP inhibitor; MMP: matrix metalloproteináz; IL-6R: interleukin-6 receptor (43, 33,55).

3.2.1. Az oncostatin M és az interleukin-6 kapcsolata

Az OSM és az IL-6 közös citokincsaládba tartoznak, mivel jelátviteli alegységük a gp130 transzmembrán glikoprotein mindkét citokin receptorának része. Az IL-6 család citokinjeinek hatásaiban felfedezheto hasonlóságok valószínuleg a receptoraikban eloforduló közös szignáltranszdukciós lánc jelenlétébol következnek. Az IL-6 egyik fo biológiai funkciójaként jellemezheto akut fázis fehérje termelést a májban a LIF, az IL-11 és az OSM is képes kiváltani (139, 110), e funkcionális redundanciának tudható be, hogy KO egerekben az adott citokinek hiánya nem teszi életképtelenné az egyedeket (62).

Az OSM a citokincsalád tagjai közül leginkább a LIF hatását képes kiváltani, mivel kapcsolódni tud a LIF receptorhoz. Humán hepatoma sejtvonalon in vitro kimutatták, hogy az OSM képes a gp130-hoz direkt módon - OSM-receptor hiányában – is kötodni (127). Mivel az IL-6/sIL-6R komplex is a gp130-hoz kötodik, az OSM antagonistája az IL-6-nak. Ugyanakkor a sgp130-hoz kötodo OSM meggátolja a sgp130/IL-6/sIL-6R komplex kialakulását, ami az IL-6 hatásának kifejtését gátolná. Ebben a tekintetben az OSM bár antagonista, mégis elosegíti az IL-6 hatékony muködését. A sejten belüli jelátviteli utak is közösek az IL-6 és OSM esetében, de amíg a Stat3 mindkét citokin hatására egyenlo mértékben, addig a Stat5 elsosorban OSM hatásra aktiválódik, az IL-6 csak kismértékben aktiválja a Stat5-t (67).

Bár a közös receptor alegység révén antagonistája egymásnak a két citokin, a sIL-6R közremuködésével számos esetben kooperálnak és együttesen fejtik ki élettani hatásukat: így a fertozésekre bekövetkezo válaszban, az akutfázis reakció kiterjesztésében.

A fertozésekre bekövetkezo gyulladásos válasz többek között az endotél sejtek közremuködésével jön létre. Az endotél sejtek a leukociták aktiválásával gyulladásos választ indíthatnak. Ennek során adhéziós molekulákat (E-szelektin, ICAM-1, VCAM-1) expresszálnak, valamint IL-6-ot, és IL-8-at bocsátanak környezetükbe. Az endotél sejteken megtalálható OSM-receptor is tartalmaz gp130 alegységet. A neutrofil granulociták a bakteriális FMLP vagy PMA hatására, a sejtfelszíni forma proteolitikus leválása révén sok sIL-6R-t hoznak létre. Az endotél által termelt IL-6 és a neutrofilek által termelt sIL-6R együttesen indukálja a gp130-at expresszáló endotél sejteket, ami a gyulladásos válasz további fokozódásához: retrográd szignalizációs hatás

érvényesüléséhez vezet. Az IL-6-nak önmagában - ha nincs IL6R a sejtfelszínen - nincs hatása. In vitro a sIL6R exogén hozzáadása önmagában is elég az endotél stimulushoz: az endotél által termelt IL-6 elegendo a komplexalkotáshoz. A limitáló tényezo nem az IL-6 citokin, hanem a sIL-6R (85).

Az OSM az endotélsejtek protein S szintézisét is megnöveli, ami az aktivált protein C kofaktoraként a véralvadásban vesz részt. A gyulladás helyén keletkezo sIL-6R az IL-6-tal összekapcsolódva ugyancsak S-protein szintézisre serkenti az endotélsejteket, így a sIL-6R-nak fontos szerepe lehet a gyulladás során a véralvadás szabályozásában (47).

Az akutfázis reakció kiterjesztésében szintén szerepet játszik az OSM. Azt, hogy a májsejtek IL-6R expresszióját emeli az OSM, Geisterfer és munkatársai már 1995-ben kimutatták, míg Cichy munkacsoportja kimutatta (32), hogy az OSM önmagában és dexametazonnal kombinálva is – additív módon - megemeli a HepG2 sejtek alternatív „splicing" révén eloállított sIL6R termelését is (12). Ennek fontos szerepet tulajdoníthatunk az akutfázis reakció során más, membrán IL6R-ral nem, de gp130 lánccal rendelkezo sejtek szenzitizálásában.

Az OSM-nek és az IL-6/sIL-6R komplexnek sok esetben szinergista hatása van. Alzheimer-kór esetében kimutatták, hogy az OSM indukálja a specifikusan agyban expresszálódó akutfázis fehérje, a betegségre jellemzo ?-amiloiddal együtt eloforduló ?1-antikimotripszin (ACT) expresszióját. Az ACT termeléséért felelos kortikális asztrocitákra az IL-6 önmagában nem hat, viszont sIL-6R jelenlétében ugyanúgy serkenti az ACT expressziót, mint az OSM. A két hatásnak a közös gp130-on át zajlik jelátvitele, ami az IL-6 receptor hiánya miatt, csak a szolubilis receptoron át közvetíti az IL-6 hatását (63). Emellett az OSM befolyásolja a központi idegrendszer asztrocitáinak IL-6 termelését (150), ami elengedhetetlen a sIL-6R muködéséhez.

3.3. Az IL-6 és szolubilis IL-6 receptor szerepe betegségek pathomechanizmusában

A legkülönbözobb daganatos, baktérium- és vírusfertozés okozta, immunhiányos és gyulladásos betegségekben mutatták ki az IL-6 és/vagy az sIL-6R megemelkedett szintjét, amely e betegségek pathogenezisében fontos mediátornak bizonyult.

Miután az IL-6 egyaránt pro-, és anti-inflammatorikus citokin, szerepe dönto fontosságú a gyulladásos betegségek folyamán. Nagyon sok esetben mint pro-inflammatorikus

citokin, gyulladásserkento hatású (4/A. táblázat), ugyanakkor csillapítja is a gyulladást (4/B táblázat). Az akut fázis reakcióban az IL-1 és TNF hatásait függeszti fel, a szeptikus sokkban az IL-11-el együtt fejt ki védo szerepet. A hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely aktiválásához nem szükséges az IL-6, viszont IL1? vagy bakteriális LPS okozta gyulladáskor a láz indukálásához szükséges az IL-6 expresszió növekedése a központi idegrendszerben (29). Az emelkedett IL-6 szint glükokortikoidok termelését váltja ki, ami az IL-6 termelés csökkenéséhez vezet, ugyanakkor emeli az IL-6R expressziót.

A csontveloi oszteoblasztok által termelt IL-6-nak fontos szerepe van a csontfelszívásban szerepet játszó oszteoklasztok stimulálásában, ugyanakkor az ösztrogén és a glükokortikoidok csökkentik az oszteoblasztok IL-6 termelését. Sokáig a szteroidszint csökkenése miatt a postmenopausas osteoporosis fo mediátoraként tartották számon az IL-6-ot: ovarektomizált állatok csökkent szteroidszintje mellett eroteljes IL-6 szint emelkedést, egyúttal fokozott csontleépülést tapasztaltak. Egér csontveloi oszteoblaszt sejtvonalakon in vitro kimutatták, hogy a szexuálszteroidok - 17? -ösztradiol és dihidrotesztoszteron –mind az IL-6R, mind a gp130 expresszióját csökkentik, ezzel gátolva az IL-6 serkentette oszteoklasztogenezist (70). Újabb kísérletek azonban a szteroidok IL-6 termelésére gyakorolt hatását illetoen egymásnak ellentmondó eredményeket mutatnak (19). Bár az életkor növekedésével együtt járó IL-6 szint emelkedést tapasztaltak postmenopausás nokben is, jelenleg nem állapítható meg egyértelmu kapcsolat az osteoporosis kialakulásának esélye és az IL-6 szint emelkedés közt (44). Az IL-6 mellett a szolubilis IL-6R emelkedett szintjét is több kórképben kimutatták, ami a sIL-6R betegségek pathogenezisében való részvételét, az IL-6 hatásának szabályozásában betöltött fontos szerepét támasztja alá (4/C. táblázat).

4. táblázat: **Az IL-6 és sIL-6R szerepe klinikai kórképekben.**

Betegségek, amelyek kialakulásában az IL-6 részt vesz (2, 29,113)		**4/C: Klinikai kórképek, amelyekben magasabb sIL-6R szintet mértek** (48, 160,117,133)
4/A: pro-inflammatorikus	**4/B: anti-inflammatorikus**	

citokinként	citokinként	
Akut gyulladásos állapotok	Akut-fázis reakció	
Meningitis		
Méhen belüli fertozodés		
Akut transzplantációs kilökodés		
Akut hasnyálmirigy gyulladás		
Égések		
Sebészeti trauma	Endotoxémia és szeptikus sokk	Posztoperatív traumák
Krónikus gyulladásos betegségek		
Rheumatoid arthritis	Rheumatoid arthritis	Rheumatoid arthritis
		Juvenilis chronicus arthritis
		Osteoarthritis
Pajzsmirigygyulladás		
Crohn betegség		Gyulladásos bélbetegségek
Alkohol okozta májgyulladás		
Acut hepatitis		
Bronchiális asthma	A tüdo gyulladásai	Asthma
Mesangiális glomerulonephritis		
Vesegyulladás	Vesegyulladás	
Systemas lupus erythematosus		
Paget-kór		
Polyarteritis nodosa		
Castleman-szindróma		
		Endometriosis
		Uveitis
		Basedow-kór
		Systemas sclerosis
Egyéb szisztémás betegségek		
Autoimmun inzulin-függo cukorbetegség		
Psoriasis		
Scleroderma		
Cachexia		
Keloidosis		
Érelmeszesedés		
Idegrendszeri kórképek		
Sclerosis multiplex		Sclerosis multiplex
Alzheimer-kór		

		Pszichotikus kórképek: skizofrénia és mániás állapotok
		Agyi sérülések
		Traumák utáni pszichológiai stressz állapota
Daganatos betegségek		
Myeloma multiplex		Myeloma multiplex
Leukémia		Felnott T-sejtes leukémia
Posztranszplantációs limfoproliferatív betegségek		
Kaposi-szarkóma		
Vese karcinóma		
Phaeochromocytoma		
Pleurális mesothelioma		
Cardialis mixoma		
Parotis adenoma		

A sIL-6R megemelkedett szintjét eloször vírusfertozésekben szenvedok esetén mutatták ki: HIV fertozöttek vérében és vizeletében (46). Megemelkedett szintje bizonyítottan szerepet játszik a leggyakoribb AIDS-szel együtt járó tumoros elváltozás, a Kaposi szarkóma kialakulásában. Bár a Kaposi szarkóma sejtek gp130 expressziója és IL-6-termelése magas, az IL-6R? alegységének csökkent expressziója miatt nem érzékenyek az IL6-ra, az IL-6 önmagában nem befolyásolja a Kaposi szarkóma sejtek mitótikus aktivitását. A szérumban azonban kimutatható a sIL-6R majd 30x-os növekedése. A két faktor: az IL-6/sIL-6R együttes hatása a sejteken megemelkedett mennyiségu gp130 felszíni receptor alegységen át már mitogén hatást fejt ki (87).

Az ugyancsak retrovírus okozta HTLV-1 fertozéssel együtt járó myelopathiában is magas keringo sIL-6R szintet találtak, érdekes módon ebben az esetben az alternatív „splicing" révén kialakult szolubilis receptort mutatták ki, míg az AIDS-betegek esetében nem volt eltérés az egészségesek alternatív „splicing" útján létrejött mRNS mennyiségéhez viszonyítva (48, 46).

Bakteriális fertozésekben (urogenitális fertozések, Meningococcus fertozés) is megno a keringo sIL-6R mennyisége, mivel a bakteriális metalloproteinázok elosegítik a sejtfelszíni forma „sheddingjét", ezzel az IL-6 hatásának elhúzódását és kiteljesedését okozva (152), de malériában is kimutatták a sIL-6R emelkedett szintjét (155).

A daganatos betegségekben a sIL-6R, osztódásserkento hatása kapcsán, része a betegség kialakulásának. Myeloma multiplex (MM) esetében régebben bizonyították, hogy az IL-6 egyike a B-sejtek fo növekedési faktorainak. Később bizonyították a sIL-6R agonista szerepét a betegség pathogenezisében, a betegek szérumában több mint kétszeres mennyiségu keringo sIL-6R szintet mutattak ki (193ng/ml), mint egészségesekben (90 ng/ml) (30). Greipp és munkatársai plazmoblasztos, rossz túlélési eséllyel jellemezheto, a nem plazmoblasztos típusnál jóval proliferatívabb MM esetén még magasabb sIL-6R szinteket mértek (227 ng/ml a 187 ng/ml-rel szemben) (35). Thabard és munkatársai kimutatták, hogy myeloma multiplexes betegek vérébol izolált natív myeloma sejtek által, és humán myeloma sejtvonal által termelt sIL-6R szint korrelál a betegség kialakulásával. Feltételezheto, hogy a sIL-6R által közvetített IL-6 hatás hasonló mértéku, mint a membránkötött IL-6R hatása. Miután az IL-6/sIL-6R erosebb hatással van a csontveloi tumorsejtek szaporodására és kiáramlására, mint az IL-6 önmagában, az sIL-6R megemelkedett szintje maga után vonja a betegség progresszióját és a rosszabb túlélési prognózist (142). A humán myeloma sejteket izolálva igazolták, hogy

a TIMP-3-nak gátló hatása van a „shedding” során keletkezo sIL-6R keletkezésére, azaz a nem-mátrix típusú metalloproteinázok szerepet játszanak a sIL-6R keletkezésében, így a betegség kialakításában (39).

Ugyanakkor Barillé és munkatársai kimutatták, hogy a sIL-6R-t expresszáló myeloma sejtek szomszédságában található csontveloi sztrómasejtek az sIL-6R jelenlétében reagálnak IL-6 hatásra. A komplex hatására az IL-6 (saját ligandjuk) termelésével felerosítik a hatást, ugyanakkor intenzív MMP1/ MMP-2 szekréciót folytatnak. Ez a két mátrix metalloproteináz a csontritkulásban és a tumorsejtek szétszóródásában játszik szerepet, azaz a myeloma multiplexszel együtt járó csontdestrukció kialakulásáért a sIL-6R-nak tulajdoníthatunk alapveto szerepet (7).

3.3.1. Az IL-6 és sIL-6R szerepe gyulladásos bélbetegségek pathomechanizmusában

A gyulladásos bélbetegségeket két nagy csoportra oszthatjuk: a Crohn betegségre (CD) és a colitis ulcerosára (UC). Mindketto a gastrointestinális rendszer krónikus gyulladásos megbetegedése, kóroktanuk máig nem ismert. Mindkét nemet azonos arányban érintik, kialakulásuk a korai felnott korra esik. Osztályozásuk alapja a gyulladás kialakulásának helye. CD-nél az epithelsejtek pusztulása másodlagosan jön létre a lamina propriában bekövetkezo gyulladásos folyamatok eredményeként. UC-ban a gyulladás az epitheliumban kezdodik, a mélyebb rétegekben a gyulladásos sejtek infiltrációja miatt következik be a szövetpusztulás. E betegségek kialakításában felmerül a szénhidrát gazdag táplálkozás, a megváltozó bélflóra baktériumai által termelt FMLP, és genetikai tényezok szerepe is. A genetikai hátteret vizsgálva számos immunológiai tényezonek a betegséghez való kapcsoltságát lehet megállapítani. A gyulladásos bélszövetben igen magas az MHC II kifejezodés, ezért jelentos a betegséggel asszociációt mutató különbözo HLA haplotípusok gyakori elofordulása (99). A lokálisan érintett szövetekben emelkedett limfo-plazmocitás infiltrációt találtak. Ezzel kapcsolatosan említendo meg, hogy a fehérvérsejtek migrációjában szerepet kapó adhéziós fehérjék közül a CD44 bizonyos exonjai gyakrabban fordulnak elo colitis ulcerosás betegek bélbiopsziás mintáiban (59). Az akutfázis reakció és gyulladás során az IL-6 mellett nagyon jelentos szabályozó funkciót tölt be a pro-inflammatorikus IL-1 citokin is. Természetesen eloforduló antagonistájának az IL-1ra-nak egy új, sokkal kevésbé hatékony genetikai variánsát találták meg colitis ulcerosában (76). A krónikus

gyulladásos állapot kialakulásáért, úgy tunik, hogy az immunreguláció zavarai is felelosek: IL-10 KO egérkísérletek alapján döntonek látszik a Th1 típusú limfocita populáció túlsúlya (68).

Régóta köztudott, hogy különbözo gyulladásos bélbetegségben (IBD) szenvedo betegek, colitis ulcerosasok (UC), Crohn-betegek (CD) vérplazmájában általában magas IL-6 szint mérheto, illetve kimutatták a keringo limfociták, és a gyulladt bélterület limfocitáinak IL-6-ra való érzékenységének növekedését (82). Mindezek alapján elmondható, hogy az emelkedett IL-6 szint jó aktivitási marker az IBD-ben, az IL-6 fokozott szekréciója meghatározó tényezo a betegség kialakulásában (74). Az IL-6 gén promoterében talált, a juvenilis arthritis és az Alzheimer kór kialakulására hatással bíró SNP polimorfizmust vizsgálva nem találtak összefüggést az IBD kialakulásával, valószínu tehát, hogy az IL-6 magas szintje nem genetikailag meghatározó tényezo (60, 25). Ugyanígy nem találtak összefüggést IL-6 génben máshol eloforduló polimorfizmusok és a betegség között (65).

SCID egér-modellt használva, a colitises állapot esetében kimutatták, hogy az anti-IL-6R monoklonális antitesttel kezelve az állatot, a betegség visszafejlodött (157). Az anti-IL-6R antitest kezelés hatására az állatok vastagbelében csökkent az ICAM-1, VCAM-1, IFN?, TNF? és IL-1? expressziója, ami az IL-6-nak a betegség kialakításában játszott alapveto szerepét támasztja alá.

Mind Crohn betegek, mind colitis ulcerosasok esetén a Stat3 fehérjék erosen foszforilált formáját mutatták ki, ugyanezt találták colitises egerekben is. Az IL-6 JAK-Stat-ot használó jelátviteli útján a JAK felelos a Stat3 foszforilálásáért. Egereken végzett kísérletekben a JAK muködését gátló fehérjéket vizsgálva kiderült, hogy a CIS3-nak Stat3 aktivitására gyakorolt negatív hatása a bélgyulladást csökkenti (134).

Az IL-6/sIL-6R együttes hatása a mucosa T-sejtjeit „megvédi” az apoptózistól: colitises állatmodellekben és Crohn betegek esetében in vivo kimutatták, hogy a lamina propria T-sejtjeit az IL-6/sIL-6R komplex a Stat3-at „használó” jelátviteli úton aktiválja, egyúttal bcl-2-n, bcl-xl-en át a T-sejtek apoptózisát gátolja (6). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az IL-6/sIL-6R komplex hozzájárul a krónikus bélgyulladás fenntartásához, és a Crohn betegek kezelésében a sIL-6R kiváltotta jelátviteli utak „blokkolása” fontos része lehet a terápiának.

IBD betegek szérumában kimutatták a sIL-6R megemelkedett szintjét is, az egészséges állapot szérum sIL-6R mennyiségéhez képest a szolubilis receptor fölöslegben volt megtalálható. A betegség aktív szakaszában szignifikánsan magasabb szérum sIL-6R

koncentrációt mértek, mint az inaktív szakaszban. Ugyanakkor a megemelkedett sIL-6R szint együtt járt a betegekben mért magasabb IL-6 szinttel és C-reaktív protein (CRP) szinttel is. A magas IL-6 szint következtében kialakult magas CRP szint a gyulladás szisztémássá válását bizonyítja. A mért IL-6 citokinmennyiség egy részét önmagában, más részét a sIL-6R-ral együtt, komplexben mutatták ki. Ezeknek az eredményeknek alapján feltételezhetjük, hogy a természetesen eloforduló sIL-6R-nak jelentos felerosíto hatása lehet az IL-6 függo immunfolyamatokra az IBD-ben (82).

3.3.2. Az IL-6 és sIL-6R szerepe rheumatoid arthritisben

A rheumatoid arthritis (RA) ismeretlen eredetu, autoimmun pathomechanizmusú szisztémás betegség. Elofordulása nokben gyakoribb, bármely életkorban kialakulhat, 16 éves kor elott kezdodo formáját juvenilis chronicus arthritis-nek nevezik. A betegség kifejlodéséért genetikai tényezok és környezeti tényezok egyaránt felelossé tehetok. Az RA-s betegek között gyakori a HLA DR4 hordozó, ennek bizonyos alléljei a betegség súlyosabb kifejezodésu formájával kapcsoltak. A betegség autoantigénje a mai napig nem ismert. Az ismeretlen antigén által aktivált T-sejtek infiltrálják a synovialis hártyát, amely másodlagosan immunszervvé változik. A synovialis sejtek fokozzák a T-sejtek aktivitását, a Th1/Th2 arány a Th1 irányba mozdul el. A Th1 citokinek stimulálják az aktivált synovialis sejteket, amelyek egyéb (TNF? , GM-CSF) citokinek mellett IL-6-t termelnek. Az IL-6 által aktivált B-sejtek rheumatoid faktort termelnek, mely immunkomplex képzése révén a komplement rendszert aktiválja, ami a folyamat felerosödéséhez vezet. Az ízületben lerakódó immunkomplexek fibrinkiválást, fibrinoid nekrózist, az ízületen kívüli immunkomplex-lerakódás rheumatoid vasculitist okoz. A felszaporodott, aktivált synoviális sejtek a porcborítással nem rendelkezo csontrészeket bontják, valamint fokozottan termelik a proteolitikus enzimeket tartalmazó synovialis folyadékot, mely tovább fokozza az ízületi destrukciót.

Rheumatoid arthritisben szenvedo betegek magas szérum és synovialis folyadék IL-6 koncentrációját, és az IL-6 központi szerepét a betegség kialakításában számos esetben kimutatták (97). Az IL-6 gén promoterében talált SNP polimorfizmus elemzések kimutatták, hogy a –174-es pozícióban levo ***C*** bázis, a ***G***-hez viszonyítva gyengébb transzkripciót eredményezett, ugyanakkor a -174***G*** a juvenilis chronicus arthritis szisztémás kialakulásával kapcsolt megjelenést mutatott (25).

RA-s autoimmun betegségben szenvedo betegek különbözo testfolyadékaiban a sIL-6R jelenlétét is kimutatták, (korábban mi is igazoltuk jelenlétét). Arthritisben szenvedo betegeknél az IL-6 és sIL-6R szint és az RA aktivitása között korreláció észlelheto (111), szisztémás juvenilis chronicus arthritisben az emelkedett szérum sIL-6R koncentráció a lázzal korrelált (56). Rheumatoid arthritisben valószínuleg nem az ízületi sejtek, hanem a gyulladáskor az ízületet elárasztó aktivált fehérvérsejtek felelosek a szolubilis IL-6R termeléséért, ugyanakkor még mindig tisztázásra vár, hogy a sIL-6R lokális forrásokból ered-e, vagy szisztémás eredetu (18).
Mindenesetre a sIL6R megnott mennyisége korrelál az ízületekbe áramló neutrofíl granulociták számával, s ily módon a sIL6R parakrin mediátorként, keletkezése helyén járul hozzá a gyulladás kialakulásához (85). Mivel az IL-6/sIL-6R komplex hatására az adhéziós molekulák expressziója endotélen és ér simaizomsejteken megno, ez újabb fehérvérsejtek ízületekbe való beáramlásával jár, amik sIL-6R termelésükkel öngerjeszto módon fokozzák a gyulladást (85, 61). Ugyanakkor in vitro humán primer porcsejteken és synovialis fibroblasztokon kimutatták, hogy a sIL-6R hatására no a sejtek TIMP-1 expressziója. Az így nyert TIMP-1 tartalmú felülúszóval hatékonyan tudták gátolni az IL-1-gyel kezelt synovialis fibroblasztok hatására kialakuló kollagénbontó hatást (125). Ez azt jelentheti, hogy bár az IL-6 magas szintje az oszteoklasztok aktiválásával jelentos szerepet tölt be az ízületben zajló destruktív folyamatok kialakításában, az IL-6-tal egyidejuleg jelenlévo sIL-6R védelmet nyújt ezekkel az ízületi lebontó folyamatokkal szemben.
Indirekt ELISA módszerrel munkacsoportunk is igazolta rheumatoid arthritisben (RA) és szisztémás lupus erythematosusban (SLE) szenvedo betegek plazmájában az sIL-6R jelenlétét, és RA betegek synovialis folyadékában szignifikánsan magasabb szintjét. In vitro körülmények között tenyésztett SLE-s és RA-s betegek limfocitáinak felülúszóját vizsgálva mind a kontroll, mind az SLE-s betegek sIL-6R termelése jelentosen megnott dexametazon, – azaz IL-6 expressziót gátló, de IL-6R expressziót növelo szintetikus glükokortikoid – jelenlétében. Az RA páciensek tenyésztett limfocitáinak felülúszójában azonban nagyon eros dexametazon indukálta sIL-6R csökkenést lehetett tapasztalni.
Jelenleg nem tudjuk megmagyarázni, hogy miért hat ilyen eltéro módon a dexametazon az SLE-s és RA-s betegek sIL-6R termelésére. Elképzelheto, hogy az SLE-s és RA-s limfocitákban a receptor sejtfelszíni proteolízise és az alternatív „splicing” molekuláris

mechanizmusainak szabályozása különbözik, de az RA-ban kialakuló Th1 túlsúly is befolyásolhatja a szérum sIL-6R szintek fenti különbözoségét.

4. HIPOTÉZISEK, CÉLKITUZÉSEK

1. A sIL-6R mRNS szintu kimutatása

Kísérleteink tervezésekor a szolubilis IL-6 receptor alternatív „splicing” révén keletkezo formájának mRNS szintu kimutatására nagyon kevés információval rendelkeztünk. Elso kísérletsorozatunkban a sIL-6R mRNS szintu kimutathatóságát kívántuk igazolni reverz transzkriptáz polimeráz láncreakcióval (RT-PCR).

2. sIL-6R alternatív „splicing” során létrejövo változatának kimutatása gyulladásos betegségekben

3. gp130 mRNS kimutatása gyulladásos betegségekben

Miután az IL-6 az akut fázis reakcióban betöltött szerepe majdnem hormonszeru hatást mutat, feltételeztük, hogy hatása kiteljesítéséhez a jelátvitelben szerepet játszó gp130 alegység expressziójának erosödése és a keringo sIL-6R hozzájárul. Miután az akut fázis reakcióban az IL-6 mennyiség ugrásszeruen megno, és gyulladásos betegségekben a testfolyadékok megemelkedett sIL-6R szintjét több betegségben is igazolták, hipotéziseink a következok voltak: Feltételeztük, hogy gyulladásos betegségekben a sIL-6R alternatív „splicing” révén létrejövo mRNS-ének mennyisége és a gp130 mRNS mennyisége is megno. Feltevéseink igazolására IBD-s, RA-s és SLE-s betegek perifériás vér mononukleáris sejtjeit és humán sejtvonalakat vizsgáltunk IL-6R és gp130 specifikus RT-PCR-rel.

4. Befolyásolja-e az IL-6 saját szolubilis receptorának alternatív „splicing” útján való létrejöttét?

Irodalmi adatok alapján tudjuk, és a fenti betegségekben is kimutatták - kimutattuk, hogy a gyulladásos állapot miatt az IL-6 megemelkedett mennyisége és a keringo sIL-6R mennyiségének megnövekedése egymást követoen kimutatható. Sejtvonalakon végzett kísérletekkel arra kerestük a választ, hogy az

IL-6 illetve a sIL-6R sejtkörnyéki jelenléte befolyásolja-e a sejtek IL-6R mRNS-ének alternatív „splicing” folyamatát.

5. Befolyásolja-e az OSM az IL-6R alternatív „splicing” folyamatát?

Mivel munkánk megkezdésekor Rose-John munkacsoportjától közlemények jelentek meg arra vonatkozólag, hogy az IL-6R alternatív „splicing” folyamatát befolyásolja az azonos receptorcsaládba tartozó OSM jelenléte, azt vizsgáltuk, hogy a mi kísérleti rendszerünkben is reprodukálhatók az eredmények.

6. Befolyásolja-e a sIL-6R jelenléte az IL-6 által kiváltott génexpressziót?

Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján feltételeztük, hogy a sIL-6R IL-6-tal együtt több gén expresszióját tudja kiváltani, mint az IL-6 önmagában. Kísérleti rendszerünkben feltételezéseink igazolására Differential Display módszert használtunk.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Sejtkultúrák

5.1.1. Perifériás vér mononukleáris sejtjei

Az IBD, RA és SLE betegek kiválasztása klinikai (és radiológiai) diagnózis szerint történt meg. Az IBD vizsgálatban 49 beteg vett részt: 9 UC-s, 39 CD-s, 1 később glutensensitiv enteropathiásnak diagnosztizált személy. Az autoimmun betegek vizsgálatában 13 aktív, 11 inaktív stádiumban lévo SLE-s, 8 aktív illetve 5 inaktív stádiumú RA-s személyt vizsgáltunk.

A betegek és önkéntes egészségesek alvadásgátolt perifériás vérébol izoláltunk mononukleáris sejteket. Az IBD betegek perifériás mononukleáris sejtjeit (PBMC) izolálás után rögtön felhasználtuk, az RA és SLE betegek mononukleáris sejtjeit 48 órán át 100 pM dexametazon jelenlétében, illetve anélkül RPMI 1640 táptalajban in vitro tenyésztettük tovább.

5.1.2. Sejtvonalak

Az in vitro kísérletekhez humán sejtvonalakat használtunk.

HepG2 humán hepatoma sejtvonalat RPMI 1640, 10 % FCS-t (Gibco) tartalmazó antibiotikumos (160 ? g/ml gentamycin) táptalajban tartottunk fenn.

MDA-MB435 emlokarcinóma sejtvonalat (107) ugyancsak 10% FCS-t és antibiotikumot (gentamycin) tartalmazó D-MEM (Sigma) médiumban tartottunk.

Valamennyi kezelés elott a sejteket 12 órán át szérummentes táptalajon, 37 ?C-on, 5% CO_2 mellett tartottuk, és a kezeléseket is szérummentes médiumban végeztük.

5.2. Mononukleáris sejt szeparálás

20 ml, heparinnal alvadásgátolt vért használtunk. Azonos térfogatú RPMI-vel higítva Ficoll-on (Pharmacia) grádiens centrifugálás végeztünk (2000g, 20°C, 20 perc), majd a limfocita-gyuru leszívása után a sejteket kétszer mostuk 1%-os PBS oldatban. A sejtek viabilitását 0,05%-os tripánkék oldattal vizsgáltuk. A Türk-oldattal festett sejteket Bürker kamrában számoltuk meg.

5.3. Alkalmazott kezelések

5.3.1. PBMC kezelése

Az IBD betegek perifériás mononukleáris sejtjeit (PBMC) izolálás után rögtön felhasználtuk, az RA és SLE betegek mononukleáris sejtjeit 48 órán át 100 pM dexametazon jelenlétében, illetve anélkül RPMI 1640 táptalajban in vitro tenyésztettük tovább.

5.3.2. Sejtvonalak kezelése

5.3.2.1. Az IL-6 ill. sIL-6R hatása az IL-6R transzkripcióra kísérleteinkhez:

A HepG2 sejteket in vitro 0,5-24 óráig kezeltük:

- 135 és 270 ng/ml humán rekombináns sIL6R-ral (Dr. Rose-John, Mainz ajándéka)
- 2, illetve 20 ng/ml humán rekombináns IL-6-tal (SIGMA)

A kezeléseket 6 lyukú szövettenyészto edényben, $3x10^6$ sejt/ml konfluens kultúrákon végeztük.

5.3.2.2. Az oncostatin M hatásának vizsgálatakor kísérleteinkhez:

HepG2, és MDA-MB435 emlokarcinóma sejteket használtunk. Az emlokarcinóma sejtvonalak közt parentális eredetu és agyi metasztázist adó sejtekbol származó tenyészet is rendelkezésünkre állt. Azért esett választásunk ezekre a sejtvonalakra, mert az IL-6 befolyásolja az emlokarcinóma sejtek morfológiáját és viselkedését (124), valamint elokísérleteink során a sejtekben eros sIL-6R mRNS expressziót detektáltunk.

A sejteket 2 – 48 óráig kezeltük:

- 250 ng/ml és 50 ng/ml humán rekombináns OSM-mel (Sigma)
- 0.5, 5, 10 ?g/ml monoklonális anti-humán OSM egér IgG2a antitesttel (Sigma)

A kezeléseket 6 lyukú szövettenyészto edényben, $2x10^6$ sejt/ml konfluens kultúrákon végeztük.

5.3.2.3. A génexpressziós kísérletekhez:

HepG2 sejteket ($5x10^6$) 24 óráig szérum mentes RPMI táptalajon tartottuk, majd szérum mentes RPMI médiumban kezeltük 2 órán át 100 ng/ml IL-6-tal (Promega, Madison,WI), 5 ?l 68 pg/ml sIL-6R-ral, illetve sIL-6R-ral és IL-6-al együttesen, a fent említettekkel azonos koncentrációkban.

5.4. RNS-izolálás

A PBMC sejtek és a sejtkultúra sejtek teljes RNS tartalmát savas guanidin tiocianát – fenol módszerrel izoláltuk (13), a vegyszereket a Sigma-tól szereztük be. Az RNS csapadékot felhasználásig 70%-os DEPC-ezett desztillált vizes etanolban kicsapva – 80 ºC-on tartottuk, majd steril DEPC-ezett desztillált vízben oldottuk vissza. (A felhasznált desztillált víz DEPC-cel való kezelése az RN-áz mentességet biztosította.) Az RNS koncentrációt Beckman DU-6 fotométerrel, 260 nm-es hullámhossznál mért abszorbanciából számoltuk. Perifériás vér limfocitáiból 5-12 ?g, sejtvonalakból 8-16 ?g össz-RNS-t vontunk ki.

5.5. Reverz transzkripció (RT) és polimeráz láncreakciót (PCR)

A reverz transzkripciót és a polimeráz láncreakciót Pharmacia Ataq Gene Controller vagy Hybaid Touch Down Temperature Cycling System készülékkel végeztük.

A használt reagensek a Promega és a Perkin-Elmer cég termékei.

A reverz transzkripcióhoz 20 ?l reakcióelegyhez 4 ?l 25 mM $MgCl_2$ –t, 2 ?l 10x puffert, 2?l 4x10 mM dNTP-t, 1?l RN-áz inhibitort (30 unit/?l), 1?l oligo-dT primert (50?M), 0,5 ?l MuLV reverz transzkriptázt (50 unit/?l), DEPC-ezett vizet és 1 ?g teljes RNS-t tartalmazó RNS-oldatot vettünk. A mintákat 30 percig 42 °C-on, majd 5 percig 99 °C-on inkubáltuk, majd –80 ºC-on lefagyasztottuk a kapott cDNS-t.

A PCR-reakció elegy desztillált vizet, 10x puffert (25mM), 1mM-os $MgCl_2$ –t, dNTP-ket (4x10mM), 0,2 ?l Taq polimerázt (5 unit/?l) és szenz-antiszenz primereket tartalmazott 50 ?l végtérfogatban reakciókként. A primereket a Pharmacia szintetizálta.

Az IL-6R cDNS-ének 811. bázispár-1195 bázispár közötti részének (83) felsokszorozásához használt primerek (20 pM koncentrációban):

szensz: 5’- aag gac ctc cag cat cac tgt gtc a –3’
antiszensz: 5’ - cct tca gag ccc gca gct tcc acg t – 3’.
A PCR reakcióhoz 10 ?l cDNS-t használtunk. A reakció menete a következo volt: 94 °C-on 4 perces denaturáció után következett a 35-ször ismételt felsokszorozás: 95°C-on 30 mp denaturáció, 63°C-on 1 perc „primer-annealing” és 72°C-on 1 perc polimerizáció; végül 72°C-on további 5 percig tartó elongációs lépés fejezte be a reakciót. A várt PCR temék hossza 385 bp.

A gp130 cDNS felsokszorozáshoz használt primerek (50 pM koncentrációban):
Szenz: 5’ – ctc gtg tgg aag aca ttg cct cct t – 3’
Antiszenz: 5’ – ttg gtc cca ctc taa gac agc ttc g – 3’.
A PCR reakcióhoz 2 ?l cDNS-t használtunk. A reakció menete a következo volt: 94 °C-os 4 perces denaturációt követte a 32-szer ismételt megsokszorozás: 95°C-on 30 mp denaturáció, 63°C-on 1 perc „primer-annealing” és 72°C-on 1 perc 30 mp polimerizáció; végül 72°C-on további 5 percig tartó elongációs lépés fejezte be a reakciót.
A kapott PCR termék 579 bp hosszú.

Belso kontrollnak glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) cDNS-ét használtuk. A használt GAPDH primerek (15 pmól koncentrációban):
szensz: 5’ – ggt atc gtg gaa gga ctc at – 3’
antiszensz: 5’ – acc acc tgg tgc tca gtg ta – 3’ (4).
A PCR reakcióhoz 2 ?l cDNS-t használtunk. A reakció menete a következo volt: 94°C 4 perc; 32-szer: 95°C 30 mp, 55°C 1 perc, 72°C 1 perc; végül 72°C 4 perc.
A kapott GAPDH PCR termék 321 bázispár hosszú.
(Az IBD betegekbol izolált RNS egy részénél belso kontrollként 28S rRNS-t használtunk.)

A PCR termékeket 0,01% etidium bromidot tartalmazó 2%-os agaróz gélen, mintánként 2-2 ?l futtatófestékkel futattuk meg 1x TBE pufferben, szétválásukhoz 45 percig 100V feszültséget alkalmaztunk. A kapott csíkok denzitometrálását és egymáshoz viszonyított mennyiségi meghatározását Scion Image program és MD ImageQuant Software Version 3.3 segítségével végeztük.

5.6. Endonukleázos emésztés

Az RT-PCR termékeket 0,01% ethidium bromidot tartalmazó 2%-os agaróz gélen (Sigma) szétválasztottuk. A gélelektoroforézis futtatást követoen a PCR termékeket izoláltuk az agaróz gélbol, és Pvu II (Sigma) emésztésnek vetettük alá: 1 ?l enzimet 2 ?l PvuII pufferrel és 17 ?l DNS-sel (PCR-termék) összerázva 37 ?C-on 2 órán át inkubáltuk. Az eredeti PCR terméket és a PvuII emésztett PCR terméket agaróz gélen, molekulasúly markerrel (Boehringer Mannheim VI. molekulasúly marker) újrafuttattuk.

5.7. Szekvenálás

A PCR terméket a pUC18 plazmid SmaI restrikciós enzim hasítóhelyére "blunt end" módszerrel ligáltuk. A plazmidot E. coli DH5? baktérium törzs segítségével felszaporítottuk. A plazmid tisztítása és denaturálása után, a szekvenálás Sanger módszere alapján történt, USB T7 Sequenase 2.0 kit-tel (Amersham) S^{35}-ATP-vel (Izotópintézet) és antiszensz, 3'? 5' komplementer primerrel.

5.8. Szérum/plazma IL-6 koncentráció mérése

IBD betegek és egészséges emberek szérum és - két esetet kivéve - az alvadásgátolt vér plazmájának IL-6 koncentrációját B9 hibridóma sejtvonalon végzett bioassay-vel mértük (1). A B9 egér myeloma sejtek az IL-6-tot mint növekedési faktort igénylik fennmaradásukhoz. A szérummintákat higítva B9 hibridóma sejtek 5% FCS tartalmú RPMI médiumába juttattuk. 72 órás inkubáció után az élo sejtszámot MTT–vel (Sigma) határoztuk meg.

5.9. Élo sejtek számának meghatározása MTT módszerrel

A 96 lyukú tenyésztoedényben lyukanként 200 ?l médiumban 10^4 sejthez 15 ?l MTT-t adtunk. 4 óra inkubáció után az élo sejtekben lila csapadék jelent meg. A lecentrifugált sejtekrol a médiumot leöntöttük, a csapadék feloldására lyukanként 100 ?l DMSO-t használtunk, majd fotométerben mértük az extinkciót.

5.10. sIL6R ELISA

A kezelt sejtvonalak felülúszóit –20 °C-on tartottuk felhasználásig.
A sIL-6R fehérje mennyiséget Quantikine human IL-6 sR ELISA kit-tel (R&D systems, Minneapolis, MN) határoztuk meg a gyártó utasításai szerint.

5.11. sIL-6R dot blot

A kezelt sejtvonalak felülúszóit –70 °C-on tartottuk felhasználásig. A higítatlan mintákból 10 ?l-t nitrocellulóz membránra (Schleicher and Schuell) cseppentve 10 percig száradni hagytuk. A megszáradt membránt ezután 0,1%-os Tween-20-at tartalmazó PBS-ben mostuk, a nem specifikus kötohelyeket 1 órán át 37?C-on blokkoltuk 1% BSA-t tartalmazó PBS-ben. Újabb 0,1%-os Tween-20-at tartalmazó PBS-es mosást követoen a membránokat 1 órán át nyúl poliklonális anti-IL-6R ellenanyaggal (Sigma) inkubáltuk (10 ug/ml PBS-Tween 20-ban oldva) szobahomérsékleten. 3-szoros PBS-Tween 20 mosást követoen második ellenanyagként tormaperoxidázzal konjugált anti-nyúl kecske antitestet (DAKO) (1: 1000 oldva PBS-Tween 20-ban) használtunk 1 órán át. PBS mosást követoen a peroxidáz szubsztrátjául szolgáló 0.4 mg/ml 3-amino-9-ethyl-carbasole-t (Sigma) és 0.01% H_2O_2-t tartalmazó acetát pufferes (pH=4.5) oldatot alkalmaztunk. A színreakciót csapvizes mosással állítottuk le. A megszáradt blottok optikai denzitását MD ImageQuant Software Version 3.3 segítségével mértük. Az sIL-6R fehérje mennyiségét NIH 3T3, IL-6R-ral transzfektált un. SIRI sejtvonal felülúszójának higítási sorához viszonyítva határoztuk meg.

5.12. Differential Display

5.12.1. A Differential Display elméleti háttere

A DNS chipek megjelenésével lehetoség nyílt arra, hogy egymással párhuzamosan nagy számú hibridizációs kísérletet végezzünk el. A legkorábban kifejlesztett technológiákban - amelyet mi is alkalmaztunk -, az oligonukleotid próbák nylon membránra rögzített macroarray-t alkotnak. Így - az azóta kifejlesztett fotolitográfiás

eljárással eloállított „valódi” chipekkel összehasonlítva (1 millió oligonukleotid / cm^2) jóval kevesebb -, maximum 6400 oligonukleotid felvitelére és hibridizálására van lehetoség. Az eljárás lényege röviden a következo: a próbákat tartalmazó membránt hibridizáltatjuk az általunk eloállított radioaktívan jelölt DNS-sel, vagy cDNS-sel. Ezután a membrán felszínén a jelölt minta kijelöli a hibridizációs helyeket. A „differential display” elnevezés arra utal, hogy a hibridizált mintánk a különbözo gének mennyiségi expressziójának függvényében különbözo erosséggel válik láthatóvá.

5.12.2. A Differential display kivitelezése

A macroarray hibridizációs analízist az Atlas™ cDNA expression array kit (Cat. No. 7740-1) (Clontech, Palo Alto, CA) segítségével végeztük el. A gyártó utasításai szerint jártunk el az 1 ?g Poly-A^+ mRNS izolálása, a ^{32}P-dATP jelenlétében zajló reverz transzkripció, a hibridizáció, a mosások és a humán cDNS expressziós array kivitelezése során. A kapott foltmintázat intenzitását AtlasImage™ 1.5 szoftver segítségével normalizáltuk pozitív és negatív háztartási génekhez.

6. EREDMÉNYEK

6.1. Az alternatív „splicing” révén keletkezett mRNS kimutatása

In vivo IBD-s betegek perifériás mononukleáris sejtjein és in vitro HepG2 sejtvonal sejteken az IL-6R génexpresszióját RT-PCR reakcióval vizsgálva, minden esetben felszaporítottunk egy kisebb, második PCR terméket is a várt, 385 bp hosszú IL-6R cDNS specifikus fragmentum mellett. A futtatáskor megjeleno második csíkot a PCR reakció körülményeinek változtatásával próbáltuk eltüntetni: megváltoztattuk a $MgCl_2$ koncentrációt, a PCR ciklusszámot, de a második csík konzekvensen megmaradt. Felmerült bennünk, hogy a kisebb termék esetleg az IL-6R mRNS hasítási változata, amit később bizonyítottunk is.

Indirekt bizonyításra restrikciós endonukleázos emésztést végeztünk. Emberi perifériás mononukleáris sejtekbol származó IL-6R RT-PCR termékeket PvuII restrikciós endonukleázzal emésztettünk. Azért esett választásunk erre az endonukleázra, mert:

- az általa felismert *cagctg* szekvencia elég hosszú ahhoz, hogy specifikus legyen,
- a receptor cDNS-nek transzmembrán régiónak megfelelo helyén kívül található,
- és csak egyszer fordul elo a 385 bp-nyi felsokszorozott PCR termékben, két 155 és 230 bp hosszú szakaszra bontva azt (9. ábra).

Az emésztés után mind a 385 bp-nyi szakaszt jelölo csík, mind a rövidebb terméket jelölo csík eltunt eredeti helyérol. A membránkötött receptor helyett két rövidebb, a várt 155 és 230 bp hosszú fragmenseket jelölo csíkok jelentek meg futtatáskor a gélen, a feltételezett szolubilis receptor emésztett változata feltehetoen a gélbol kifutó kis fragmenseket eredményezett (10. ábra). Ezzel indirekt módon bizonyítottuk, hogy a két termék tartalmazza ugyanazt a szekvenciát, tehát feltételezhetoen ugyanannak a génnek expressziós változatai.

9. ábra: **Az IL-6R specifikus primerek által határolt 385 bp-nyi cDNS szekvencia**

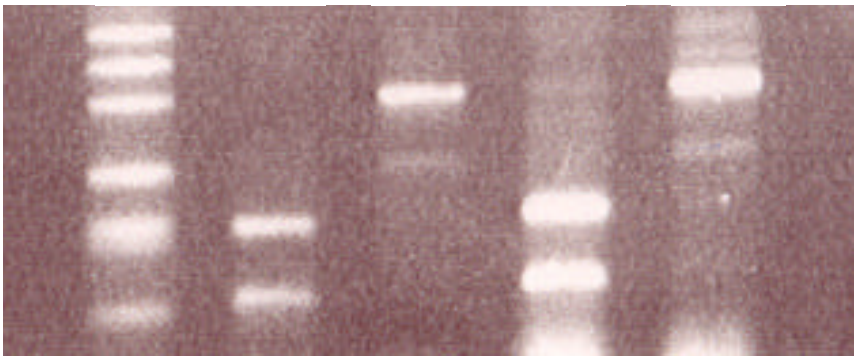
(811) AAG GAC CTC CAG CAT CAC TGT GTC AT[1]C CAC GAC GCC TGG AGC GGC CTG AGG CAC GTG GTG CAG CTC CGT GCC CAG GAG GAG TTC GGG CAA GGC GAG TGG AGC GAG TGG AGC CCG GAG GCC ATG GGC ACG CCT TGG ACA GAA TCC AGG AGT CCT C✍ **CA GCT G**✍ AG AAC GAG GTG TCC ACC CCC ATG CAG GCA CTT ACT ACT AAT AAA GAC GAT GAT AAT ATT CTC TTC AGA GAT TCT GCA AAT GCG ACA AGC CTC CCA GTG CAA GAT TCT TCT TCA GTA CCA CTG CCC ACA TTC CTG GTT GCT GGA GGG AGC CTG GCC TTC GGA ACG CTC CTC TGC ATT GCC ATT GTT CTG AGG TTC AAG AAG ACG TGG AAG CTG CGG GCT CTG AAG G[2] (1195)

✍ **CA GCT G** ✍ : Pvu II. hasítóhely

[1] szenz primer illeszkedési hely

[2] antiszenz primer illeszkedési hely

10. ábra: **PvuII emésztés eredménye IL-6R RT-PCR terméken**



M: molekulasúly marker

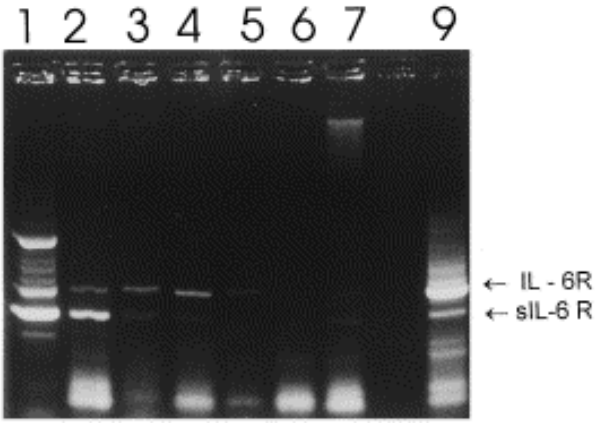
K1; K2: emésztetlen PCR termék

Pvu II 1; Pvu II 2: emésztett PCR termék

Feltevésünk direkt bizonyítására megszekvenáltuk a hosszabb és a rövidebb terméket is. A használt primer a transzmembrán domén közvetlen közelében eredetileg intracelluláris részt kódoló cDNS szakasszal komplementer. Többszöri szekvenálás után kapott eredmények is a két csík átfedo nukleotidsorrendjét igazolták (9. ábra). A rövidebb fragmens bázissorendje megegyezik a cDNS-sel.

Bizonyítást nyert tehát, hogy a rövidebb termék az IL-6 receptor alternatív „splicing" révén keletkezett szolubilis formájának mRNS-ét reprezentálja (10. ábra).

10. ábra**: IL-6 receptor mRNS RT-PCR termékei.**



A nyilak a teljes hosszúságú membránkötött IL-6R, és az alternatív „splicing" útján keletkezett rövidebb szolubilis forma cDNS-ét jelölik.

1-3 zseb: Gyulladásos bélbetegek perifériás vérének mononukleáris sejtjeibol

4-7 zseb: humán hepatoma, HepG2 sejtvonal sejtjeibol

9 zseb: molekulasúly marker

6.2. Perifériás vér mononukleáris sejtjeinek IL-6R komplex vizsgálata gyulladásos betegségekben

6.2.1. IBD betegek szérum IL-6 szint növekedése

A Crohn betegek esetében az egészségeseknél szignifikánsan magasabb szérum IL-6 szintet mértünk (11. ábra).

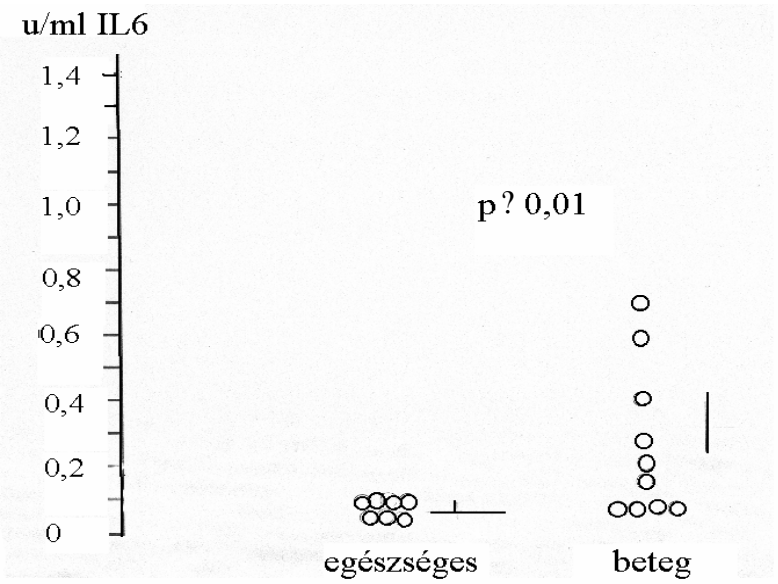
5 betegnél mértünk plazma IL-6 koncentrációt (1,13 U/ml, 1,3 U/ ml, 0,78 U/ml, 1,2 U/ml, 1,58 U/ ml) Átlagosan: 1,19**Hiba! A hivatkozási forrás nem**

található.0,4 U/ml-t, szemben a kontrollcsoport IL-6 szintjével, ami 0,2 U/ml alatt maradt.

Az IBD-s betegek szérum IL-6 szintjei (0,2 U/ml, 0,6 U/ml, 0,7 U/ml, 0,18 U/ml, 0,39 U/ml, 0,24 U/ml és négy esetben 0,2 U/ml alatt maradtak) nagyobb szórást mutattak, míg a kontrollcsoportnál az érték 0,2 U/ml alatt maradt.

A plazma IL-6 szintjében mért értékek tendenciájukban megegyeztek a szérumban mértekkel, de jóval nagyobb különbségeket mutattak. A szérum-plazma különbségek valószínuleg az alkalmazott módszer miatt adódtak: B9 sejteken a nem fehérjementes vérplazma másképp hathat a sejtszaporodásra.

11. ábra**: Az interleukin-6 szintje egészséges emberek** (n=7) **és Crohn betegek** (n=10) **szérumában**



6.2.2. Gyulladásos betegségben szenvedo betegek IL-6R és gp130 mRNS expressziója

Radiológiai vizsgálatokkal bizonyítottan gyulladásos bélbetegségben (IBD) szenvedo betegek perifériás vérébol izolált mononukleáris sejteket vizsgáltunk. A sejtek össz-RNS-ébol elvégzett RT-PCR eredményeként a betegek perifériás mononukleáris sejtjeiben mérsékelten emelkedett membránkötött IL-6R és szignifikánsan erosebb sIL-

6R expressziót kaptunk (12/A. ábra). A gp130 mRNS expresszió növekedés szintén igen kifejezett (12/B. ábra).

12. ábra: **Az IBD betegek perifériás vér mononukleáris sejtjeinek IL-6R és gp130 expressziója**

A: IL-6 receptor specifikus RT-PCR eredménye:

UC CD CD ? CD C C M

CD: Crohn-beteg; UC: Colitis ulcerosa-s beteg;

?: glutensensitiv enteropathia ; C: egészséges kontroll;

M: pozitív cDNS marker.

A felso nyilak a teljes hosszúságú membránkötött IL-6R-t jelölo PCR terméket (385 bp), az alsó nyilak a rövidebb sIL-6R PCR terméket mutatják.

B: 579 bp hosszú gp130 PCR termék

1 2 3 4 5 6 7 C C M

? gp130 mRNS

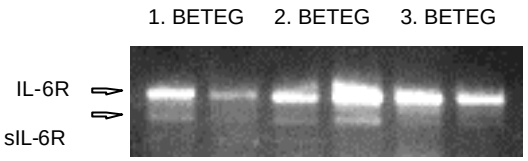
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: Colitis ulcerosa-s beteg

C: egészséges kontroll, M: pozitív marker

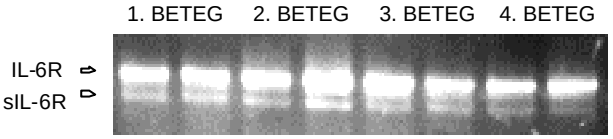
Miután munkacsoportunk korábbi eredményei szerint RA és SLE aktív szakaszában lévo betegek in vitro dexametazon jelenlétében 48 óráig tenyésztett limfocitáinak felülúszóiban jelentos különbség volt tapasztalható a termelt sIL-6R mennyiségében, a molekuláris háttér tisztázása végett RT-PCR-rel megvizsgáltuk az IL-6R mRNS mennyiségét is. RA betegeknél inaktív stádiumban kevésbé, aktív stádiumban eros membránkötött és sIL-6R mRNS expressziót találtunk (13. ábra). Kimutattuk, hogy a sIL-6R átíródik, csakúgy, mint a membránkötött változat, viszont nem találtunk különbséget a dexametazonnal vagy anélkül tenyésztett sejtek IL-6R mRNS szintjében, sem a membránkötött, sem a szolubilis változatot illetoen (14. ábra).

13. ábra: **RA-s betegek perifériás vér mononukleáris sejtjeinek IL-6R expressziója**

Reumatoid arthritis betegek inaktív stádium

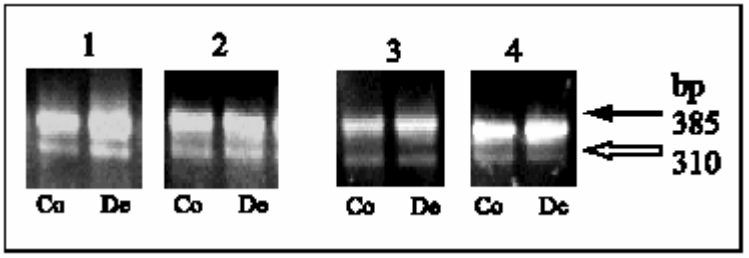


Reumatoid arthritis betegek aktív stádium



(Reprezentatív minták)

14. ábra: **RA-s és SLE-s betegek in vitro 48 óráig tenyésztett perifériás vér mononukleáris sejtjeinek IL-6R expressziója**



felso teli nyíl: membránkötött IL-6R

alsó üres nyíl: szolubilis IL-6R

1: aktív SLE, 2: inaktív SLE , 3: aktív RA , 4: inaktív RA

Co: kezeletlen, De: 100pM dexametazonnal kezelt

(Reprezentatív minták)

6.3. Az OSM hatása a sIL-6R keletkezésére HepG2 és MDA-MB435 sejtvonalon

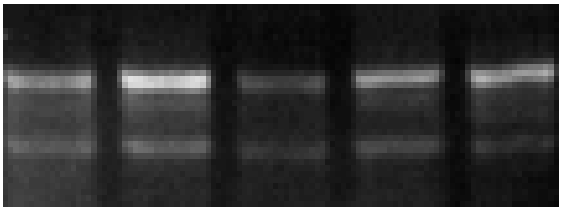
MDA-MB435 parentális, MDA-MB435 agyi metasztázist adó humán emlokarcinóma és HepG2 humán hepatoma sejteket 12 órás széruméheztetés után 50ng/ ml és 250 ng/ ml OSM-mel kezeltük 0,5, 2, 18, 24 és 48 órán keresztül.

HepG2 sejteknél 30 perces OSM inkubáció után a membránkötött IL-6R expressziója megemelkedett, a sIL-6R mRNS mennyiségben nem találtunk változást (nincs ábra). A sejteket 18 óráig kezelve, 50 ng/ml OSM hatására mind a sejtfelszíni és szolubilis IL-6R mRNS-ének mennyisége megnövekedett (15/A ábra). A magasabb 250 ng/ml-es OSM kezelés érdekes módon inkább gátolta a HepG2 sejtek IL-6R mRNS-ének expresszióját. Hasonló eredmények születtek 24 és 48 órás inkubáció után és fehérje szinten is (nincs ábra).

A dot blot eredmények szerint a HepG2 sejtek 2 órás inkubációja után sIL-6R fehérje az OSM kezeletlen kontrollban a sejtek felülúszójából egyáltalán nem mutatható ki, 50 ng/ml OSM hatására minimális mennyiség, 250 ng/ml OSM hatására az 50 ng-os kezeléshez viszonyítva 2-3x-os mennyiség detektálható (16/A. ábra). A HepG2 sejtek, OSM hatásra, dózisfüggoen több sIL-6R fehérjét szecernáltak a felülúszóba. Az RT-PCR eredmények szerint az OSM kezelések a 30 perces inkubációhoz hasonlóan 2 óra alatt is csak az IL-6R membránkötött formáját emelték, a sIL-6R RNS mennyiség változása nem volt mérheto (16/B ábra). A fehérjeszinten kimutatható változásnak hátterében így feltehetoen nem az alternatív „splicing” befolyásolása, hanem esetleg a „shedding” növelése, vagy az alternatív „splicing” révén létrejött forma posztranszkripciós átalakításának, szecernálásának elosegítése áll.

Az MDA-MB435 sejteket 48 órán át OSM-mel kezelve, az OSM mindkét koncentrációban erosen stimulálja a sIL-6R mRNS képzodést MDA-MB 435 emlokarcinóma sejtvonalon (17. ábra), de a hatás 24 órás és rövidebb ideig tartó kezelésnél nem mutatható ki (nincs ábra).

15. ábra: **18 órás OSM kezelés hatása HepG2 IL-6R expressziójára**

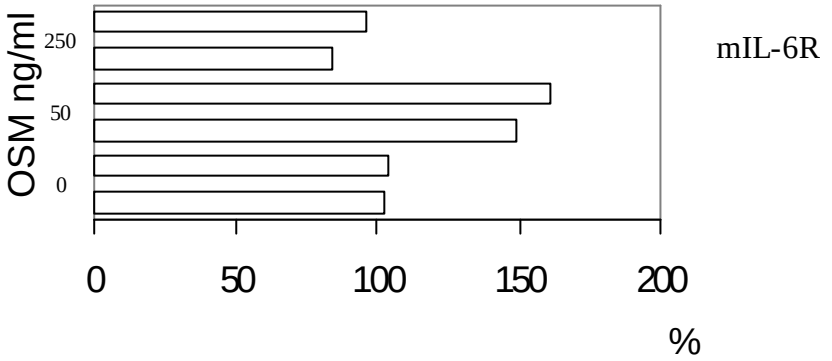


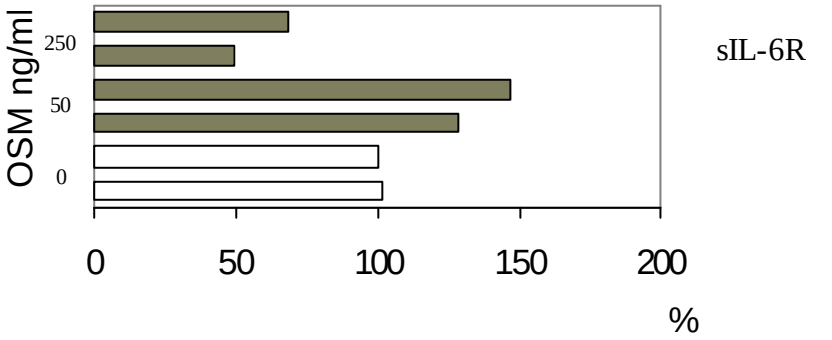
IL-6R

sIL-6R

1 2 3 4 5

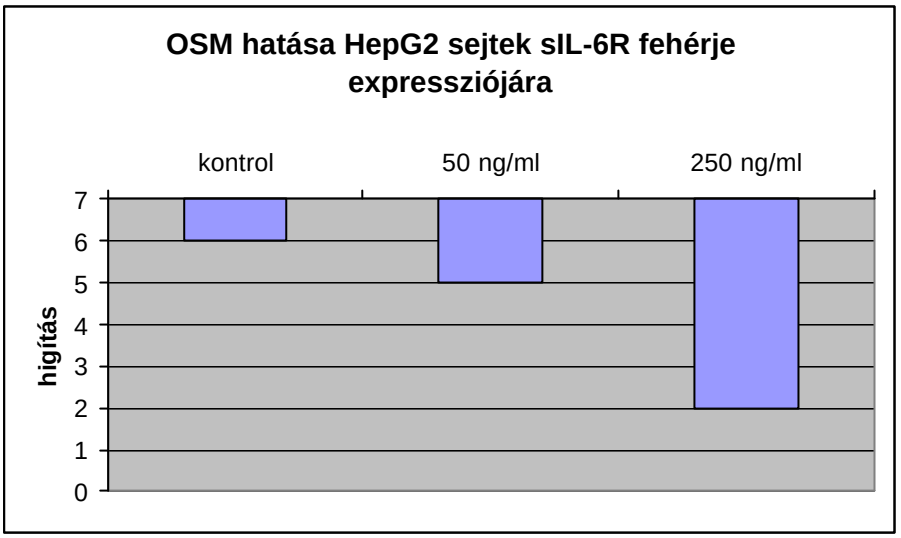
A: RT-PCR analízis: az IL-6R membránkötött formáját kódoló mRNS (üres nyíl, 385 bázispár) és a rövidebb sIL-6R-t reprezentáló második csík (fekete nyíl) HepG2 humán hepatoma sejtvonalon. 1. sáv: 50 ng/ml; 2. sáv: 250 ng/ml humán rekombináns OSM; 3., 4. sáv: kezeletlen kontroll, 5. sáv IL-6R cDNS marker.



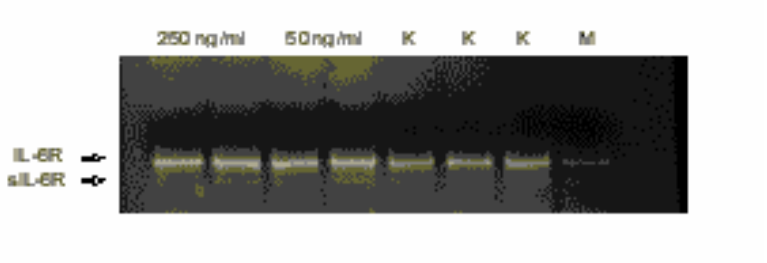


B: OSM hatása a membránkötött (mIL-6R, felso panel) és szolubilis (sIL-6R, alsó panel) IL-6R génre HepG2 sejteken.

16. ábra: **HepG2 sIL-6R termelése 2 órás OSM kezelés hatására**

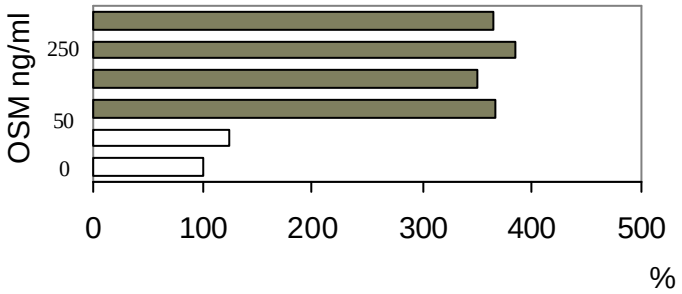


A: Dot blot eredmények NIH 3T3 SIRI sejtvonal felülúszójának higítási sorához viszonyítva



B: az RT-PCR eredmények az mRNS expressziót mutatják

17. ábra: **OSM hatása a szolubilis IL-6R fehérje expresszióra MDA-MB435 humán emlokarcinóma sejteken**



sIL-6R ELISA eredmények (reprezentatív mintákon bemutatott eredmények.)

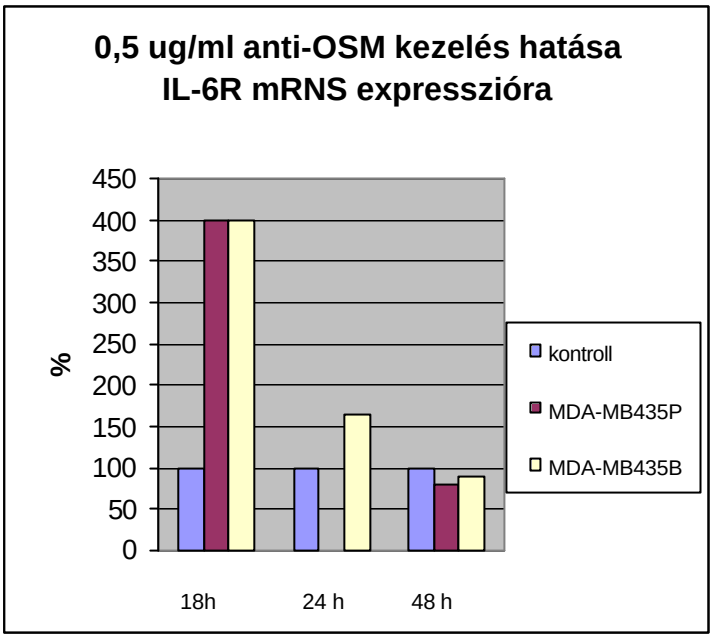
Irodalmi adatok szerint különbözo emlotumor sejtvonalak OSM-t expresszálhatnak (14), ezért felmerült annak a lehetosége, hogy az endogén módon termelodo OSM befolyásolja az eredményeket. (Májsejtek irodalmi adatok szerint nem termelnek OSM-t, csak OSM receptort expresszálnak (55).)

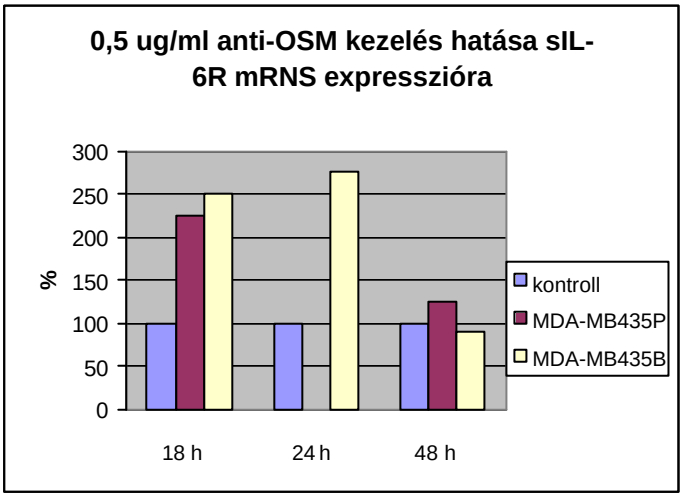
Ennek vizsgálata érdekében az MDA-MB435 sejteket 12 órás széruméheztetés után 0.5, 5, 10 ?g/ml anti-OSM antitesttel kezeltük, hogy az endogén OSM hatását kiküszöböljük.

Elokísérletként U266 sejteket kezeltünk 24, 48 órán át 0,5, 5 és 10 ?g/ml anti-OSM-mel, mivel ez a myeloma sejtvonal eros IL-6R és sIL-6R expressziót mutat és irodalmi adatok szerint bizonyos myeloma sejtvonalak OSM-t termelnek (28). A kezelés eredménye: az antitest dózisfüggoen emeli a membránkötött IL-6R expressziót és dózisfüggoen gátolja a szolubilis IL-6R mRNS expressziót (nincs ábra).

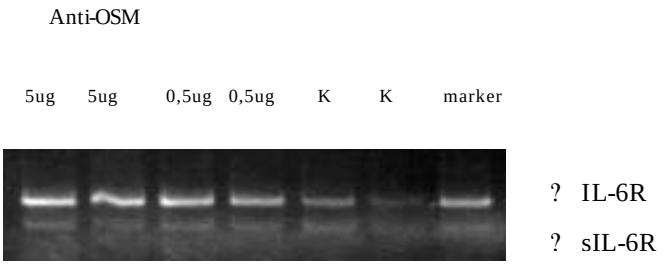
A kétféle, parentális eredetu és agyi metasztázist adó MDA-MB435 sejtvonalon ugyanazt az eredményt kaptuk, miszerint az antitestkezelés következtében a szolubilis IL-6R mennyiség megnott. Az RT-PCR termékeken az IL-6R mind membránkötött, mind szolubilis formájára specifikus expressziós értéket a GAPDH expressziós értékekhez normalizáltuk. 0,5 ?g/ml koncentrációban 18 és 24 órás kezelések alatt a feltételezett endogén OSM-t „hatástalanítva” eredményeink szerint a sIL-6R mRNS szint 2-3-szorosára nott, majd 48 órával a kezelés után, a kontrollhoz képest nem mutattunk ki expressziós változást (18/A. ábra). Így feltételezheto, hogy az antitest adása után 48 órával már termelodött saját OSM. Ugyanezek a kezelések a membránkötött forma mRNS–ének kifejezodését hasonlóképp befolyásolták. A transzmembrán domént tartalmazó IL-6R RNS mennyisége 18 órás inkubáció alatt jobban nott amint az endogén OSM hatását legátoltuk, mint a szolubilis IL-6R-é (18/B ábra). A 24 órás inkubáció viszont a sIL-6R RNS-nek a membránkötött IL-6R-hoz viszonyított nagyobb arányú növekedésével járt együtt.

18. ábra: **Anti-OSM kezelés hatása IL-6R génexpresszióra.**





A: RT-PCR eredmények MDA-MB435P parentális emlotumor sejtvonalon és MDA-MB435B agyi áttétet adó emlotumor sejtvonalon. Az OSM gátlása 18 órás kezelés során mindkét vonalon négy-, illetve kétszeresére emelte mind a membránkötött, mind a szolubilis receptor expresszióját. 24 órás anti-OSM kezelésnél csak a szolubilis receptor expresszió emelkedett, a membránkötötté nem.



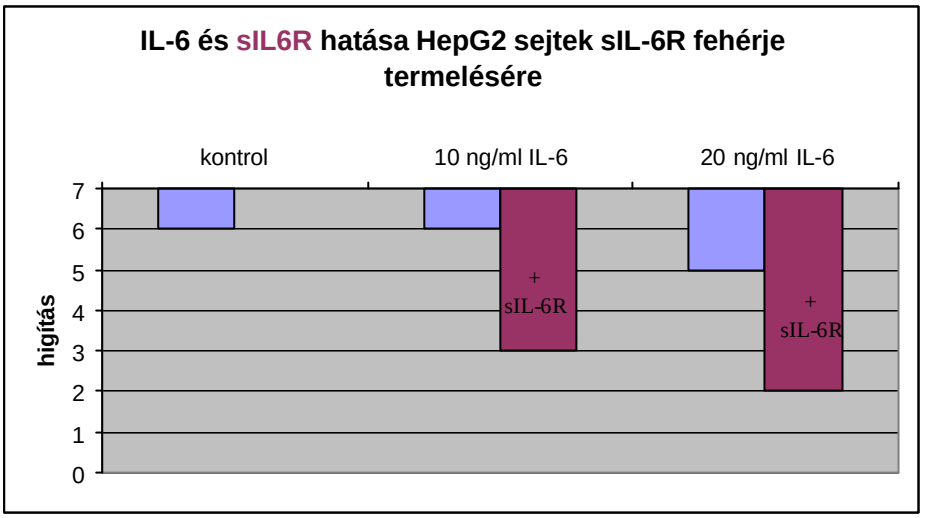
B: 18 órás anti-OSM kezelés hatása MDA MB435B sejtek IL-6R mRNS expressziójára
(K: kezeletlen kontroll)

MDA-MB435 sejtvonalon tehát az exogén OSM 24 órán belül nem, hanem hosszabb ido múlva, 48 óra elteltével fejtette ki sIL-6R expresszió növelo hatását, míg az endogén OSM gátlásával 24 órán belül hasonló sIL-6R expresszió növekedést lehetett kimutatni. Az exogén OSM 50 ng/ml-es koncentrációban a HepG2 májsejteken az MDA-MB435 sejtekénél hamarabb, már 24 órán belül kifejtette sIL-6R expresszió növelo hatását.

6.4. Az IL-6 illetve az sIL-6R hatása az sIL-6 receptor keletkezésére

HepG2 sejteken RT-PCR-rel mértük a génexpressziós, illetve dot blottal határoztuk meg a fehérjeszintu változásokat. IL-6, illetve IL-6 és sIL-6R egyideju hozzáadásával vizsgáltuk a változásokat rövid inkubációs ido (30 perc) alatt. 10 ng/ml IL-6 nem, míg 20 ng/ml IL-6 adása a kontrollhoz képest önmagában és sIL-6R-ral együtt adva is megemelte a felülúszóban a sIL-6R fehérje mennyiségét (19/A. ábra).
Ugyanezeknek a sejteknek IL-6R RNS-ében is megváltozott expressziót találtunk: 30 perces 10 illetve 20 ng/ml IL-6 kezelés is emelte a membránkötött receptor RNS mennyiségét, a hozzájuk adott 135 ng/ml sIL-6R azonban csak kisebb expressziós változást idézett elo (19/B. ábra).

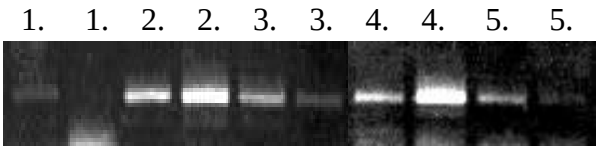
19. ábra**: IL-6 és sIL-6R kezelés hatása HepG2 sejtek IL-6R expressziójára**



A: Dot blot eredmények a standard higítási sor értékeiben megadva. Az alkalmazott sIL-6R koncentráció minden esetben 135 ng/ml volt.

B:

Interleukin-6 receptor specifikus RT-PCR IL-6-tal és sIL-6R-ral kezelt HepG2 sejteken



1. kontroll
2. 10 ng IL-6/10^6 sejt
3. 10 ng IL-6 + 130 ng sIL-6R/10^6 sejt
4. 20 ng IL-6 /10^6 sejt
5. 20 ng IL-6 + 130 ng sIL-6R /10^6 sejt

6.5. IL-6, sIL-6R és IL-6 + sIL-6R együttes hatására bekövetkezo génexpressziós mintázat változás HepG2 hepatoma sejtvonalon

Kísérleteinkben humán HepG2 sejteket használtunk, amelyek maguk is expresszálnak IL-6 receptort. A sejteken állandóan expresszálódó IL-6R-on át bekövetkezo citokinhatást növeltük további sIL-6R hozzáadásával. Eredményeink azt mutatják, hogy a sIL-6R jelenlétében a sejt génexpressziós mintázatában bekövetkezett jellegzetes változások zajlottak le.

Az általunk használt macroarray kit-en 578 humán gén expressziójának változását követhettük nyomon.

A paneleket IL-6-tal, sIL-6R-ral és a ketto kombinációjával kezelt HepG2 cDNS-ekkel egyaránt hibridizáltuk.

23 gén esetében, ahol a kezeletlen kontrollban konstitutív expresszió nem volt kimutatható, az IL-6 és sIL-6R együttes adása aktivációt váltott ki. (5. táblázat). Ezek a gének a sejtciklusban szerepet játszó fehérjék, onkogének (pl. fos-related antigen), citokinek (pl. hepatoma derived growth factor), receptor prekurzorok (pl. IL-2R beta, inzulin és ösztrogén receptor) kódolásáért felelosek. Különösen magas expressziót indukált az IL-6/sIL-6R együttes alkalmazása egy transzkripciós represszor, az NF-X1 esetében.

Említésre méltó expressziós növekedést váltott ki az IL-6/sIL-6R kezelés hatása a kezeletlen kontrolhoz képest másik 18, konstitutívan is expresszálódó génben is. Ezek onkogének (c-myc: 6.4-szeres emelkedéssel), citokinek (VEGF: 7.5-szeres, hepatocyte growth factor like protein: 3.6-szoros emelkedés), receptorok (tiroid hormon receptor: 15.7-szeres, EGF-receptor: 4-szeres, SAS [transmembrane 4 superfamily protein]:11.7-szeres emelkedés), a cAMP jelátviteli út több eleme (CREB: 5.9-szeres, ATF-4 cAMP dependens transzkripciós faktor: 8.3-szoros emelkedés) (6. táblázat). Jóval kevesebb, mindössze 5 gén esetében tapasztaltunk génexpresssszió csökkenést a kezeletlen kontrolhoz képest az IL-6/sIL-6R együttes hatására (pl. 81%-os gátlás egy DNS repair fehérje, illetve a ribonukleáz/angiogenin inhibitor [RAI] gyakorlatilag teljes gátlása).

5. táblázat: **IL-6 és sIL-6R együttes adásakor aktiválódó gének**

A változást a negatív kontroll génexpressziós átlagához (100%) viszonyítva adtuk meg.

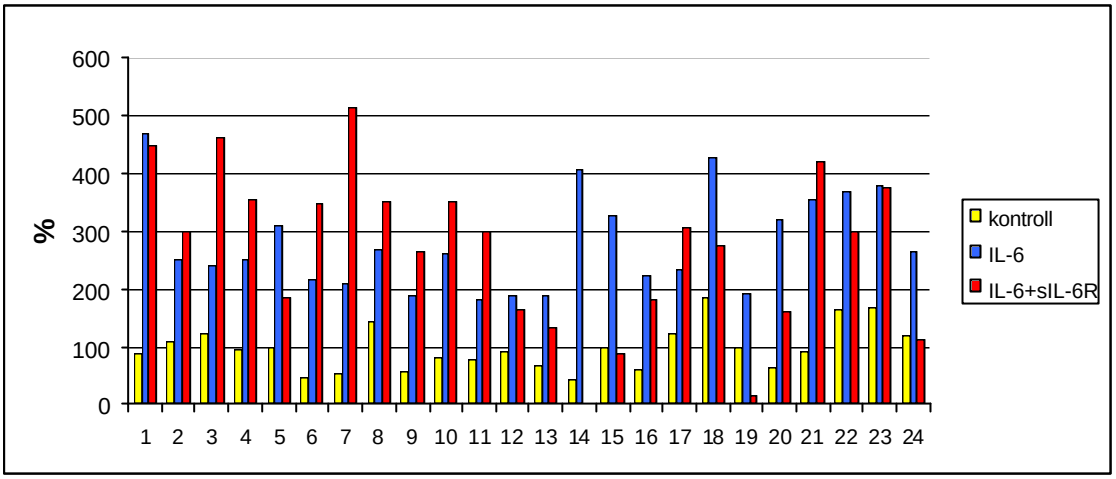
gén	**mRNS szint változás**
Prohibitin (PHB)	263
Transforming protein (RHO12)	212
Fos related antigen 2 (FRA2)	272
EB1 protein	311
Cell division cycle protein 25A (cdc25A)	190
G2 mitotic specific cyclin A	278
G1/S specific cyclin D1	282
Cyclin dependent kinase 4 inhibitor	199
G1/S specific cyclin E	196
C-1	207
Cell division cycle protein 25B (cdc25B)	234
Helix-loop-helix protein 1 R21	179
DNA-binding protein SMBP-2, glial factor (GF-1)	208
CACCC box DNA binding protein	216
DNA bindig protein 116 (HIP116)	194
Estrogen receptor (hSNF2b)	190
Transcriptional repressor NF-X1	490
RNA polymerase II elongation factor SIII p15 subunit	285
Homeobox protein B7 (HOXB7)	213
Inulin receptor precursor	279
Interleukin-2 receptor beta subunit precursor	252
Hepatoma derived growth factor	234

6. táblázat: **sIL-6R és IL-6 együttes adásának hatására megváltozott expressziójú gének.** A változást a nem kezelt kontrollhoz (100 %) viszonyítva adtuk meg.

gén	**mRNS szint változás**
c-myc oncogene	640
Thyroid hormon receptor	1057
Tumor suppressor LUCA1, hyaluronoglucosaminidase	457
DNA-binding protein inhibitor (ID-1)	621
Prothymosin alpha	610
Bullous pemphigoid antigen 1	306
Transmembrane 4 superfamily protein	1177
G1/S-specific cyclin D3	1572
Cyclin H	395
G2/mitotic specific cyclin B1	777
Erythrocyte urea transporter	705
cAMP response element binding protein 1 (CRE-BP1)	625
cAMP-response element binding protein (CREB)	588
cAMP-dependent transcription factor ATF-4	827
Nuclear factor 45 (NF-45)	492
Epidermal growth factor receptor	400
Vascular endothelial growth factor precursor	753
Hepatocyte growth factor like protein	358
cAMP dependent protein kinase type beta 1	22
Growth arrest/DNA damage inducible protein (GADD 153)	28
DNA damage repair/recombination protein 52	19
Inhibitor of apoptosis protein (IAP3)	0
Ribonuclease/angiogenin inhibitor (RAI)	0

Azoknál a géneknél, ahol a kezeletlen kontroll génexpressziójához képest az IL-6-nak önmagában jelentos serkento hatása volt tapasztalható, a sIL-6R hozzáadása általában nem befolyásolta számottevoen a citokin egyedüli hatását. Két gén expressziója esetén azonban a sIL-6R jelenléte jelentos génmuködés serkentést váltott ki (egy DNS-köto protein inhibitor és a D3 ciklin esetén), míg négy másik génnél a kontroll expressziós szintjéig hatástalanította a citokin hatását (az apoptózisban szerepet kapó CD40L, és mikroszomális glutation transzferáz, valamint két citokin prekurzor: a PDGF?-é és a CTGF-é) (20. ábra).

20. ábra: **IL-6 és sIL-6R kezelés hatása a génexpresszióra** Az értékeket az átlag expresszióhoz (100%) viszonyítva adtuk meg. A pirossal kiemelt gének esetén az IL-6-tal együtt adva a génmuködést jelentosen additívan serkenti, vagy csökkenti a sIL-6R.



1. cAMP-dependent transcription factor ATF-4
2. tumor suppressor LUCA1, hyaluronoglucosaminidase
3. DNA-binding protein inhibitor (ID-1)
4. prothymosin alpha
5. bullous pemphigoid antigen 1
6. transmembrane 4 superfamily protein
7. G1/S-specific cyclin D3
8. cyclin H
9. G2/mitotic specific cyclin B1
10. erythrocyte urea transporter
11. cAMP response element binding protein 1 (CRE-BP1)
12. transducin beta 2 subunit 2
13. STAT-6
14. CD40L
15. microsomal glutathion S-transferase
16. nuclear factor 45 (NF-45)
17. epidermal growth factor receptor
18. ICAM-1
19. platelet derived growth factor B subunit precursor
20. insulin-like growth factor binding protein 1
21. vascular endothelial growth factor precursor
22. fibroblast growth factor receptor 1 precursor
23. hepatocyte growth factor like protein
24. connective tissue growth factor precursor

Azoknak a géneknek az esetében, ahol a kezeletlen kontrolhoz képest jelentos az IL-6 és sIL-6R együttes hatása, általában azt tapasztaltuk, hogy a sIL-6R jelenléte tovább növeli az IL-6 önmagában kifejtett hatását is (22. ábra). Néhány gén esetében az IL-6-nak önmagában alig van, vagy egyáltalán nem mutatható ki hatása, míg a sIL-6R-ral együtt adva a génaktiválás nagyon jelentos (CREB, c-myc, tiroid hormon receptor).

Eredményeink szerint a sIL-6R-ral (önmagában) történt kezelés hatására a gének zömének expressziója nem változott. Csak egy gén van (cAMP-response element binding protein, CREB-P1), amelynek az expressziója jelentosen megemelkedett, tíz másik géné viszont erosen lecsökkent a sIL-6R–ral történt kezelés hatására (7. táblázat). A gátlás meglehetosen eros (70-100%), különösen az apoptózis inhibitor IAP3 gén, a hEGR1 early growth response protein és egy ets transzkripciós faktor, az NERF2 esetében.

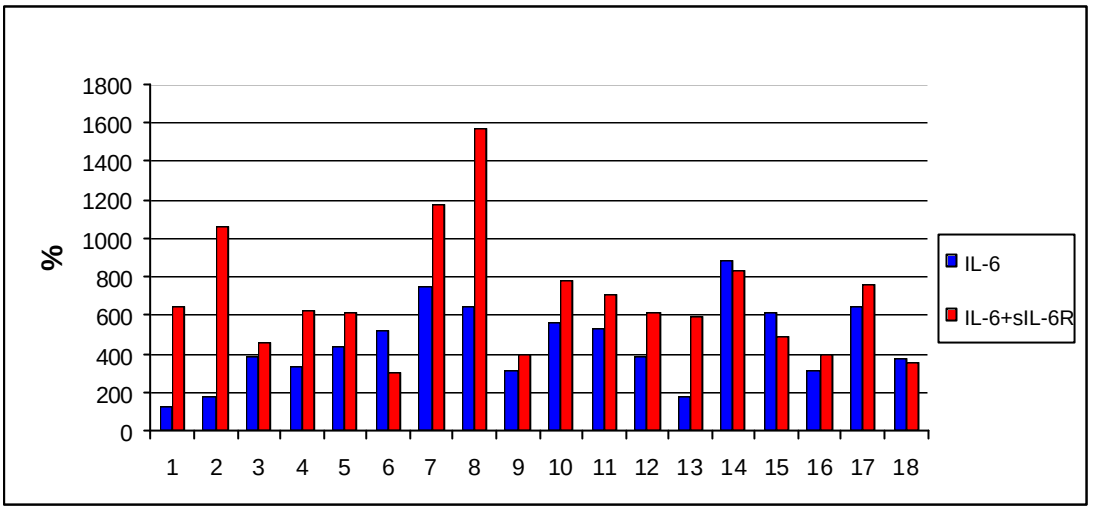
7. táblázat: **HepG2 sejtek génexpressziós változása sIL-6R-ral való kezelés után** Atlas macroarray differential display analízis. A változást a nem kezelt kontrollhoz (100 %) viszonyítva adtuk meg.

gén	**mRNS szint változás**
cAMP response element binding protein (CRE-BP1)	454
cAMP dependent protein kinase type I beta regulatory subunit (PRKAR1B)	16
RecA-like protein (HsRad51)	21
DNA damage/repair recombination protein 52	33
Ataxia teleangiectasia protein (ATM)	31
Delta like protein precursor (DLK)	29
Endothelin 2 (ET2)	23
Ribonuclease/angiogenin inhibitor (RAI)	30
Inhibitor of apoptosis protein 3 (IAP3)	0
Early growth response protein 1 (hEGR1)	0
Ets transcription factor (NEFR2)	0

22. ábra: **Az IL-6 és sIL-6R együttes hatására bekövetkezo génexpresszió.**

Az értékeket a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (100%) adtuk meg.

A pirossal kiemelt géneknél az IL-6 csak a sIL-6R-tal együtt fejti ki génexpresszió növelo hatását.



1. c-myc oncogene
2. thyroid hormon receptor
3. tumor suppressor LUCA1, hyaluronoglucosaminidase
4. DNA-binding protein inhibitor (ID-1)
5. prothymosin alpha
6. bullous pemphigoid antigen 1
7. transmembrane 4 superfamily protein
8. G1/S-specific cyclin D3
9. cyclin H
10. G2/mitotic specific cyclin B1
11. erythrocyte urea transporter
12. cAMP response element binding protein 1 (CRE-BP1)
13. cAMP-response element binding protein (CREB)
14. cAMP-dependent transcription factor ATF-4
15. nuclear factor 45 (NF-45)
16. epidermal growth factor receptor
17. vascular endothelial growth factor precursor
18. hepatocyte growth factor like protein

Azoknál a géneknél, ahol a kontrollhoz képest a sIL-6R önmagában negatívan befolyásolta a génexpressziót, mind az IL-6 egyedüli, mind sIL-6R jelenlétében kifejtett

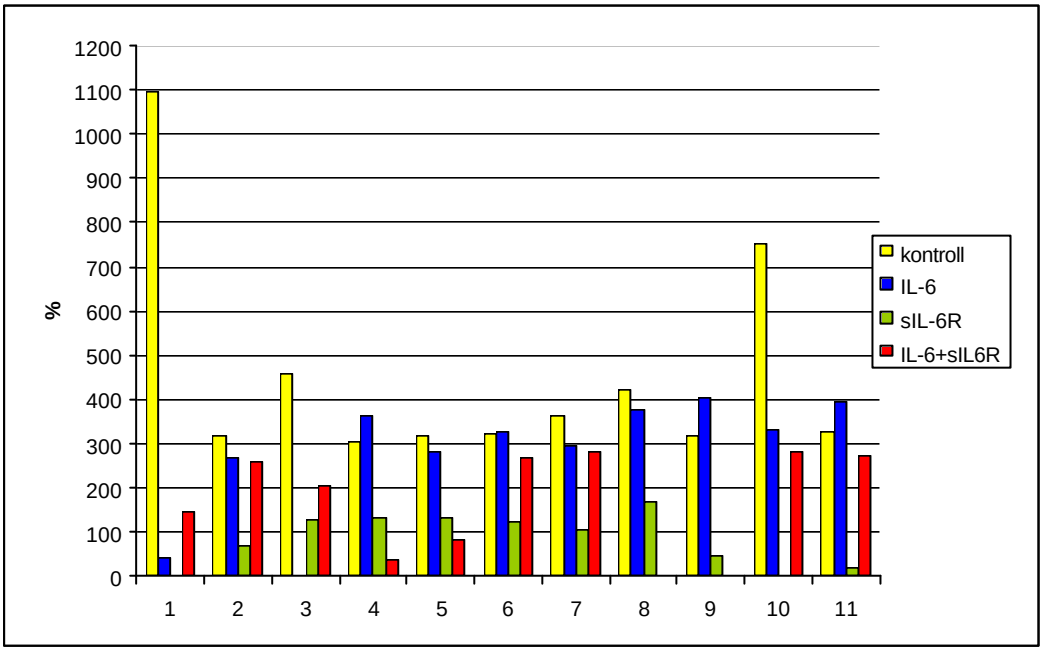
hatása általában nem hatott a génexpresszióra, így a sIL-6R-nak magának tulajdonítható gátló szerep. Ez alól képez kivételt egy, a cAMP jelátviteli útban szerepet játszó protein kináz, és egy DNS repair proteinnel homológ fehérje, amelyeknek az expresszióját a citokin, a receptor, és a ketto együttes hatása egyaránt gátolja. További négy gén esetén a sIL-6R gátló hatása a citokin jelenlétében is megmarad (21. ábra).

21. ábra: **sIL-6R kezelés hatására lecsökkeno génexpresszió**

Az értékeket az átlag expresszióhoz (100%) viszonyítva adtuk meg.

A zöld oszlopokban a csak sIL-6R-ral történt kezelés eredménye látható.

A pirossal kiemelt géneknél a sIL-6R gátló hatása az IL-6-tal együtt adva is megmarad.

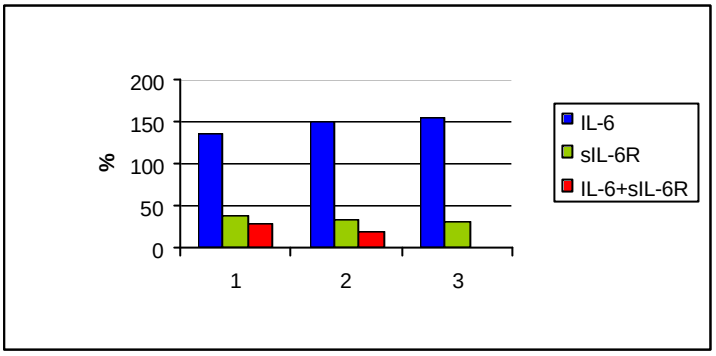


1. cAMP dependent protein kinase type beta 1
2. MAPKAP kinase
3. DNA-repair protein RAD51 homolog
4. DNA damage repair/recombination protein 52
5. ataxia teleangiectasia protein (ATM)
6. delta-like protein precursor
7. endothelin 2
8. ribonuclease/angiogenin inhibitor (RAI)
9. inhibitor of apoptosis protein 3
10. early growth response protein 1 (hEGR1)
11. ets transcription factor

A sIL-6R csak három gén expressziója (a C/EBP inhibitor GADD 153, egy DNS repair enzim és egy ribonukleáz inhibitor) esetén gátolta jelentosen az IL-6 önmagában génaktiváló hatását (23. ábra).

23. ábra: **sIL-6R hatására bekövetkezo, az IL-6 hatását csökkento génexpresszió**

Az értékeket a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (100%) adtuk meg.



1. growth arrest/DNA damage inducible protein (GADD 153)
2. DNA damage repair/recombination protein 52
3. ribonuclease/angiogenin inhibitor (RAI)

7. MEGBESZÉLÉS

A többkomponensu IL-6 receptor specifikus citokinköto része, a gp80 alegység a szervezet sejtjeinek csak egy részén expresszálódik a membránon. A gp130 jelátviteli alegység azonban ismereteink szerint, bár különbözo mennyiségben, de valamennyi magvas sejt felszínén expresszálódik. Az IL-6R szolubilis formája egyaránt képes a citokin megkötésére és a gp130–hoz való kapcsolódásra, ezért a szolubilis IL-6R az agonistaként ható szolubilis receptorok közé tartozik. Az összes többi szolubilis formában eloforduló citokinreceptor közül csak a szolubilis CNTF receptor, a szolubilis IL-11 receptor és a szolubilis GDNF receptor fejt ki a liganddal összekapcsolódva ugyanilyen agonista hatást a célsejten. Legújabban a szolubilis IL-1RI-rol írták még le, hogy humán dermális fibroblasztokon agonista hatása van, az „általános" sejtekre kifejtett antagonista hatás mellett (129). Figyelemre méltó, hogy a CNTF és az IL-11 ugyanazt a jelátviteli rendszert használja, mint az IL-6, míg a GDNF és IL-1 más jelátvivo rendszereket aktiválnak (16, 8, 147). Minden más citokin esetében a szolubilis receptor antagonista hatású, mivel a ligand megkötéséért kompetícióban áll a sejtfelszíni formával (41).

Az exogén sIL-6R/IL-6-ból és endogén gp130-ból álló komplexek ugyanúgy a hagyományos JAK/Stat jelátviteli utat használják, mint az IL-6R-t expresszáló sejtek endogén komplexei (139, 51). A ligand megkötése után kialakuló sIL-6R/IL-6 komplexek azokra a sejtekre is hatnak, amelyek nem expresszálnak mérheto mennyiségu endogén gp80-t. Így a korábban IL-6-ra nem fogékony sejtek – „IL-6R-negatív" sejtek –a szolubilis IL-6R jelenlétében IL-6-tal aktiválhatók, vagyis az sIL-6R kiszélesíti az IL-6-ra érzékeny sejtek választékát. Ennél fogva a keringésben jelenlévo IL-6/sIL-6R komplexet egy újabb, az IL-6 mellett eloforduló heterodimer citokinként is lehet jellemezni (53). Az sIL-6R keletkezési körülményeinek felderítése különösképpen azért indokolt, mert úgy tunik, a sIL-6R jelenléte egy sor élettani folyamat megváltozásában játszik szerepet. A szolubilis receptor jelenlétében az IL-6 hatása kiterjesztodik, hiszen a csak gp130-t expresszáló sejteken is képes választ kiváltani. Az IL-6 szolubilis és membránkötött receptoron keresztül létrejövo hatásaiban megfigyelheto különbségek egyes betegségek patogenezisében szerepet kaphatnak, tekintve, hogy számos különféle betegségben megváltozott szérum sIL-6R szintet mértek. A vérplazma megemelkedett sIL-6R szintje néhány daganatos és autoimmun betegség, illetve fertozés patogenezisében (pl. rheumatoid arthritis, szisztémás lupus

erythematosus és HIV-vel együtt járó betegségek) (58, 2, 114, 46) azt mutatják, hogy a sIL-6R-nak jelentos patofiziológiai szerepet tulajdoníthatunk. Fontos, hogy elkülönítsük a lokálisan megemelkedett sIL-6R szintet a szisztémásan megjeleno sIL-6R szint emelkedéstol. Egyes kórképekben, mint például a myeloma multiplex, a szisztémásan megemelkedett sIL-6R szint hozható összefüggésbe a betegség kialakulásával (69). Ugyanakkor rheumatoid arthritisben a szinoviális folyadék megemelkedett sIL-6R szintje korrelál az ízületbe áramló fehérvérsejtek tömeges megjelenésével és a csontfelszívódás mértékével, ami a sIL-6R lokális hatására utal (140, 18). Annak kiderítése, hogy mi szabályozza a sIL-6R koncentrációt, a betegségek kialakulása során mikor termelodik, mely faktorok módosításával játszik szerepet a betegségek kialakításában, nagyon fontos kérdések.

A szolubilis IL-6 receptor képzodésének kétféle módja ismert: általában a sejtfelszíni proteázok (többnyire metalloproteinázok) aktiválódásával fehérje szinten; másrészt az IL-6R mRNS alternatív hasításával RNS szinten alakulhatnak ki. Az elobbi esetben a sejtfelszíni receptor extracelluláris része válik le a „hagyományosan" kihorgonyzott fehérjérol, utóbbi esetben pedig egy már hiányos, a transzmembrán domént nem tartalmazó fehérje keletkezik. Mindkét módon létrejött szolubilis IL-6 receptor fontos szerepet játszik az IL-6 élettani hatékonyságában, mivel megnövelik biológiai fél-életidejét (103). Ez a tény két fontos kérdést vet fel: hogyan keletkezik a szolubilis IL-6 receptor, illetve mi a következménye a szolubilis IL-6 receptor jelenlétének.

Arról, hogy (pato)fiziológiásan mi szabályozza a proteolízissel keletkezo sIL-6R, illetve az alternatív „splicing" révén kialakuló sIL-6R mRNS megemelkedett szintjét nagyon keveset tudunk. A membránkötött IL-6R expressziójának szabályozásában nagyon sok faktor vesz részt: citokinek, mint az IL-1, az OSM, a LIF, valamint maga az IL-6 is (32, 144). Egy szintetikus glükokortikoid származék, a dexametazon dózisfüggoen erosíti az IL-6R génexpressziót (79). A biogén aminok közül a hisztamin szintén befolyásolja az IL-6R kifejezodését, attól függoen, hogy H1 vagy H2 receptoron fejti ki hatását, a hisztamin hatására megemelkedik vagy csökken a sejtfelszíni IL-6R mennyiség (79). A szolubilis IL-6R képzodése és a sejtfelszíni forma keletkezése nem párhuzamosan zajló folyamatok, az IL-1 például emeli a sIL-6R-t kódoló mRNS mennyiséget, miközben csökkenti a membránkötött forma expresszióját (32, 144).

Kísérleteink tervezésekor a szolubilis IL-6 receptor alternatív „splicing" révén keletkezo formájának mRNS szintu kimutatására nagyon kevés információval rendelkeztünk.

Kísérleteinkben a sIL-6R mRNS szintu kimutathatóságát kívántuk igazolni, illetve különbözo rendszerekben az alternatív „splicing” révén keletkezo forma expressziós változásainak nyomonkövetését céloztuk meg. Ezenfelül a sIL-6R génexpresszióra gyakorolt hatását kívántuk vizsgálni.

Az általunk használt RT-PCR reakcióban eloször mutattuk ki együtt az IL-6 receptor membránkötött formájának RNS-e mellett a transzmembrán régió nélküli, alternatív „splicing” révén létrejött szolubilis IL-6 receptor RNS-ét is. A sIL-6R alternatív „splicing” révén keletkezett formájának kimutatása az eddig használt ELISA módszer mellett, a keletkezés mechanizmusára ad felvilágosítást.
Vizsgálatainkat humán eredetu sejtvonalakon és autoimmun betegségben szenvedo emberek perifériás limfocitáin végeztük. Minden általunk választott sejtben különbözo mértékben expresszálódik a membránkötött ligandspecifikus alegység és a jelátvitelért felelos gp130 is.
A kísérleti eredmények alapján minden általunk választott rendszerben a sIL-6R mRNS-ének expressziója alacsonyabb, mint a membránkötött formáé.

A röviden IBD-nek nevezett gyulladásos vastagbélbetegségek évtizedek óta a gasztroenterológus kutatók és klinikusok érdeklodésének homlokterében állnak, a betegség pathogenezisének jobb megismerése végett. Az IBD két krónikus megjelenési formája a colitis ulcerosa és a Crohn-betegség. Az állatmodelles kísérletek eredményei és a genetikai információk bovülése szerint a nyálkahártya szerkezete és az immunológiai státus – HLA antigének, adhéziós molekulák - genetikai meghatározottsága nagymértékben befolyásolja a betegség kialakulását. A lokális IL-6 génexpresszió emelkedése a gyulladt szövetekben, a megemelkedett IL-6 szint következményeként a máj által termelt akutfázis fehérjék (pl. CRP) jellegzetes változása a vérben az IBD jellegzetes markereinek tekintheto.
Radiológiai vizsgálatokkal bizonyítottan gyulladásos bélbetegségben (IBD) szenvedo betegek perifériás vérének vizsgálatakor igazoltuk, hogy a betegek szérumában magas IL-6 szint mérheto. Bizonyítottuk, hogy a perifériás vér izolált mononukleáris sejtjein megemelkedett sejtfelszíni gp130, és sejtfelszíni IL-6R mennyiség található. Kimutattuk, hogy a specifikus ligandköto IL-6R nemcsak membránkötött, hanem alternatív „splicing” kialakuló formájának RNS szintje is kifejezetten magasabb IBD-ben. Az emelkedett IL-6 szint és a receptorkomplex minden tagja génexpressziójának

növekedése egybeeso és összekapcsolódó események. Kísérleteink alapján feltételezhetjük, hogy a perifériás vér limfocitáinak IL-6-ra való érzékenysége az sIL-6R alternatív „splicing” létrejött formája megjelenésével, és a gp130 expresszió erosödésével, megnövekszik a gyulladás hatására. Mindez az IL-6 hatás elhúzódó érvényesülését szolgálja. Mivel a gp130 nemcsak az IL-6, hanem további hat citokin receptorkomplexében játszik szerepet a jelátvitelben, megemelkedett expressziója az összes ilyen citokin reaktivitását befolyásolhatja az IBD-ben.

A rheumatoid arthritis (RA) szisztémás autoimmun betegség, az IBD-hez hasonlóan ismeretlen eredetu. A betegség kifejlodéséért genetikai tényezok és környezeti tényezok egyaránt felelossé tehetok, de az bizonyított, hogy az IL-6 központi szerepet játszik a betegség kialakításában.. Az ismeretlen antigén által aktivált Th1-sejtek az izületekben infiltrálják a synovialis hártyát, az aktivált synovialis sejtek egyéb (TNF? , GM-CSF) citokinek mellett IL-6-t termelnek. Az IL-6 által aktivált B-sejtek rheumatoid faktort termelnek, mely immunkomplex képzése révén a komplement rendszert aktiválja, ami a folyamat felerosödéséhez vezet. Számos esetben a betegek különbözo testfolyadékaiban a sIL-6R jelenlétét is kimutatták (korábban mi is igazoltuk jelenlétét), a betegeknél az IL-6 és sIL-6R szint és az RA aktivitása között korreláció észlelheto (111), ugyanakkor még mindig tisztázásra vár, hogy a sIL-6R lokális forrásokból ered-e, vagy szisztémás eredetu (18).
Indirekt ELISA módszerrel munkacsoportunk is igazolta RA és szisztémás lupus erythematosusban (SLE) szenvedo betegek plazmájában az sIL-6R jelenlétét, és RA betegek synovialis folyadékában szignifikánsan magasabb szintjét.
Inaktív stádiumban lévo RA betegek perifériás vérébol származó tenyésztett limfociták gyengébb, az aktív stádiumból származó limfociták eros membránkötött és sIL-6R mRNS expressziót mutattak, ami jelentos limfocita aktivációra utal. Meglepo módon a dexametazon hatása az IL-6R membránkötött formájának mRNS szintu hasítására nem mutatott ilyen egyértelmu változásokat. In vitro dexametazon kezelés az egészségesekbol származó limfocitákban fokozta az sIL-6R fehérje termelodést, ugyanakkor rheumatoid arthritisben szenvedo betegek limfocitáin gátolta. Ugyanakkor mRNS szinten az RA betegek sIL-6R mennyisége nem volt alacsonyabb a kontrollénál, dacára a fehérje szinten bekövetkezett látványos csökkenésnek. sIL-6R kifejezodést (79). Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy az sIL-6R kifejezodés nagyon összetett szabályozás alatt álló folyamat, mivel mind az mRNS szinten bekövetkezo

alternatív hasítás, mind a fehérjeszintu keletkezésben szerepet játszó metalloproteinázok helyi aktivációja vagy gátlása befolyásolja.

Humán mintákon végzett kísérleteinkben IBD és RA betegségekben szenvedo emberek perifériás mononukleáris sejtjein kimutattuk az alternatív „splicing” révén keletkezo sIL-6R expressziót. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a „splicing” megnövekedett mértéke kimutathatóan hozzájárul e betegségek patogenezisében szerepet játszó sIL-6R készlethez.

Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy az IL-6 megemelheti saját receptorának expresszióját myeloma sejtvonalon (144). Miután az IBD és RA betegek vérplazmájában megemelkedik az IL-6 és sIL-6R koncentráció, valamint a betegek perifériás vérének mononukleáris sejtjeinek vizsgálatakor eros sIL-6R expressziót tapasztaltunk, felmerült bennünk a kérdés, hogy az IL-6-nak és a sIL-6R-nak van-e hatása az IL-6R mRNS alternatív „splicing” folyamatára.

Következo kísérleteinkben ezért arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a sIL-6R alternatív „splicing” révén kialakuló formájának keletkezésében szerepet játszik-e ligandja, illetve autokrin módon befolyásolja–e a „splicing” erosségét a szolubilis forma. Irodalmi adatok alapján alá kívántuk támasztani azt a megfigyelést is, hogy az IL-6 citokincsalád egyik tagja, az OSM befolyásolja az alternatív „splicing” mértékét az IL-6R esetében (12). Mivel az OSM receptor komplexében szintén megtalálható a gp130 lánc, a jelenség egy új szabályozási út lehetoségét veti fel.

In vitro kísérleteinkben az egészséges emberekben mért szérum IL-6, sIL-6R és OSM koncentrációknál nagyobb, bizonyos betegségekben eloforduló koncentrációkban alkalmaztuk az anyagokat. (Az IL-6 normál szérumkoncentrációja kevesebb, mint 3 pg/ml, a sIL-6R-é 70-90 ng/ml, míg OSM gyakorlatilag nem mérheto, kevesebb mint 0,1 pg/ml (113, 112, 30, 35).

Kísérleteinkben humán hepatoma és emlokarcinóma sejtvonalakat használva azt tapasztaltuk, hogy az OSM általában megemeli, vagy épp ellenkezoleg némileg csökkenti a membránkötött és szolubilis IL-6R mRNS- és fehérjeszintu kifejezodését. Mind a folyamatok kinetikája, mind az optimális dózis erosen sejtspecifikus.

Az, hogy HepG2 hepatoma sejtek 2 órás OSM kezelésre koncentrációfüggoen termelik az sIL-6R-t, míg RNS szinten nem mutatható ki változás a génexpresszióban, arra utal, hogy az OSM ilyen rövid távú hatása nem az alternatív „splicing” folyamatát befolyásolja, hanem az alternatív „splicing” útján létrejött forma poszt-transzkripciós

átalakítását, szecernálását segíti elo, esetleg a „shedding” mértékének növelését idézi elo. A sejteket 18, 24 vagy 48 óráig kezelve, a kisebb dózisú OSM megemelte mind a membránkötött, mind a szolubilis IL-6R mRNS mennyiséget is.
MDA-MB435 sejteken csak hosszabb, 48 órás OSM inkubáció stimulálta a sIL-6R képzodést, ugyanakkor 48 órával OSM elleni antitest adása után nem tapasztaltunk a kontrollhoz képest változást. Sem 24 órás, sem annál rövidebb OSM kezelés ezeken a sejteken nem okozott számottevo változást az IL-6R mRNS mennyiségében, míg a feltételezett endogén OSM ellen adott antitest 24 órás, vagy rövidebb inkubációs ido alatt mind a transzmembrán domént tartalmazó, mind a sIL-6R mRNS szintjének 2-3-szorosára való emelkedését okozta. Megfigyeléseink tehát arra engednek következtetni, hogy az emlokarcinóma sejtvonalon az OSM befolyásolja az IL-6R génexpresszióját, hatásának rövid ideig tartó felfüggesztésére az IL-6R expresszió fokozódik, míg hosszabb távú hatása szintén emeli az IL-6R expressziót.

Az IL-6-tal és sIL-6R-ral kezelt HepG2 sejtek az IL-6 hatására (sIL-6R–ra elhanyagolható mértéku) megemelkedett membránkötött IL-6R RNS expressziót mutattak, ugyanakkor sIL-6R RNS-eik expressziójában nem láttunk számottevo változást. Fehérjeszinten némi növekedést tapasztaltunk a sejtek által termelt sIL-6R mennyiségben. A sIL-6R hozzáadásával bekövetkezett látványos fehérjeszint emelkedésnél valószínuleg a kezelés során hozzáadott sIL-6R mennyiséget mértük, semmint a sejtek által valójában termelt fehérjét, az IL-6 hatására bekövetkezett változás mértéke igen csekély. Miután sem fehérje-, sem RNS szinten nem tudtuk megbízhatóan kimutatni a sIL-6R szint emelkedését, csak azt a következtetést vonhatjuk le, hogy HepG2 sejtvonalban a sIL-6R nem, csak az IL-6 növeli az IL-6R expressziót, de csak a membránkötött, eredeti RNS szintézisét illetoen.

Egy újabb kísérletrendszerünkben arra a kérdésre kerestük a választ, mi a funkcionális jelentosége az IL-6R-t expresszáló sejtekben a receptorszám sIL-6R-ral való további növelésének. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a szolubilis IL-6 receptor jelenlétében az IL-6 célsejt repertoárja kiszélesedik, hiszen nemcsak az IL-6R-t expresszáló, hanem a csak gp130 jelátviteli alegységet hordozó sejtekre is képes hatni (85). Korábban munkacsoportunk is alátámasztotta azt a megfigyelést, hogy a sIL-6R a sejtek közötti „ transz-szignalizációban” szerepet játszik, vagyis azok a sejtek, amelyek nem expresszálják a ligandspecifikus IL-6R alegységet, sIL-6R/IL-6 komplex hatására

képessé válnak az IL-6 specifikus válasz adására (50). Megfigyeléseik szerint in vitro Jurcat limfocita sejtvonalban nem mutatható ki az IL-6R jelenléte, és a sejtek nem reagálnak IL-6 kezelésre. Ugyanezek a sejtek sIL-6R és IL-6 együttes hatására IFN? -t kezdtek termelni.

cDNS expressziós macroarray vizsgálatainkban IL-6R-t és gp130-t is expresszáló, IL-6-t nem termelo humán hepatoma sejteket használtunk. A gének széles választékát tanulmányozva arra a kérdésre kerestünk választ, mi a funkcionális jelentosége az IL-6R szám további növelésének. Vizsgálataink alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy a receptorszám mennyiségi megváltozása alapjában változtathatja meg a génexpressziós mintázatot, azaz a májsejtek fenotípusát.

Ezeken a sejteken specifikus ligandköto receptora jelenlétében az exogén IL-6 választ indukál. Irodalmi adatok szerint májeredetu sejteken, így az általunk használt HepG2-n is, a sejtfelszíni gp130 expresszió nagyobb mértéku, mint az IL-6R alegységé (28, 121). A szolubilis receptor agonista hatását is azzal magyarázzák, hogy az IL-6 által elfoglalt sejtfelszíni IL-6R-gp130 komplexek mellett az IL-6/sIL-6R komplex találhat még szabad gp130 molekulákat. Kísérleteinkben is azt tapasztaltuk, hogy az IL-6 szolubilis IL-6 receptor jelenlétében több gp130 molekulán át fejtheti ki hatását, mintha csak a membránkötött IL-6R-t használná. Az IL-6/sIL-6R komplex a jelentos mértékben (min. 200%) megváltozott expressziójú géneknél az esetek dönto többségében más gének expresszióját változtatta meg, mint az IL-6 önmagában. Azaz mivel az IL-6/sIL-6R több szabad gp130 molekulához kötodhet, mint az IL-6 önmagában, a sejteknek lehetosége adódott a saját receptor mennyiség által megengedettnél több IL-6 megkötésére, „kihasználására”. Több, mint 20 olyan erosen expresszálódó gént találtunk, amelyek ezt megelozoen egyáltalán nem íródtak át. Mivel még messze nem tudjuk megmagyarázni, hogy mi ennek a génexpressziós változásnak a következménye a májsejtek életében, néhány példa már arra enged következtetni, hogy alapveto fenotípusváltozáson esnek át a sejtek. Így például a HDGF expressziója alapveto változást idézhet elo a szomszédos sejtek osztódási sebességében, az IL-2R ? alegysége, az inzulin és az ösztrogénreceptorok kifejezodése megnöveli a májsejtek „ligand-érzékenységét”. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az IL-6R májsejteken kifejezodo állandó szintje nem teszi lehetové, hogy ezeknek az újonnan expresszálódott géneknek a jelátviteli útja aktiválódjon. Más szóval a sejtek egyfajta mennyiségi küszöbbel szabják meg az IL-6 által aktiválódó gének választékát. Mindezen felül sok egyéb eleve expresszálódó gén mRNS mennyisége emelkedett (18 db), illetve csökkent (5 db) a több IL-6R

jelenlétében. Ez arra utal, hogy a sejtek érzékenysége egyrészt emelkedett (pl. a c-myc onkogén, vagy a trijódtironin receptor esetében) vagy csökkent (pl. a p52 vagy az apoptózis inhibitor protein-3 esetében). Ez utóbbi ketto változásának következménye a sejtek apoptózisának növelése, ezzel is alátámasztva az IL-6 biológiai jelentoségét.

A megfigyelt hatásbeli különbségek szerint az IL-6/sIL-6R az IL-6-tól eltéroen viselkedo faktorként, új citokinként jellemezheto.

A HepG2 sejtek nem termelnek IL-6-t, ezért mikor sIL-6 receptorral önmagában (külsoleg adott IL-6 nélkül) kezeltük a sejteket, semmiféle hatást nem vártunk. Ugyanakkor munkacsoportunk korábbi kísérletei alapján azt a megfigyelést tettük, hogy a sIL-6R önmagában, ligandja nélkül is hatásos a junB, egy korai protoonkogén expressziójában az általunk is használt HepG2 sejteken (51). Eredményeink alapján megerosíthetjük a sIL-6R önmagában való hatását: a megváltozott expressziójú gének esetében meglepo módon egy gén (a CRE-BP1) a kontrollhoz képest 4,5-szeresére nott expressziót mutatott, míg 10 más gén erosen gátlódott. Ezekre a génekre gyakorolt hatását tekintve a sIL-6R az IL-6 hatásával megegyezo irányban befolyásolta a génexpressziót, de hatása erosségében felülmúlta az IL-6-ét. Összehasonlítva az IL-6/sIL-6R komplexnek ezekre a génekre gyakorolt hatásával a szolubilis receptor önmagában megközelítette annak hatáserosségét. Jelenleg nincs ésszeru magyarázat a sIL-6R ilyen „IL-6-független” hatására. Úgy tudjuk, hogy a gp130 alegységhez alapvetoen csak a sIL-6R/IL-6 komplex kapcsolódik hozzá, és a sIL-6R önmagában nem. Ezért különbözo eredetu sejttípusokon további biokémiai- (receptorkötési és jelátviteli) és sejtbiológiai vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy a „magánzó” sIL-6R muködési módját felderítsük.

A génexpresssziós mintázat kiértékelése teljesebb bioinformatikai hálózatot és több adatot igényel. Mindenesetre ezen a szinten is egyértelmuvé vált, hogy a szolubilis IL-6 receptor jelenléte erosen megváltoztatja egy sejt fenotípusos megjelenését. Arra a megállapításra juthatunk, hogy a szolubilis IL-6 receptor keletkezési körülményeinek és biológiai jelentoségének felderítése hozzájárul a citokin – sejt kölcsönhatások mint a sejtmuködés alapveto szabályozó elemének (41, 104, 100) további megértéséhez.

8. KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteinkben a sIL-6R mRNS szintu kimutathatóságát kívántuk igazolni, illetve célunk az alternatív „splicing” révén keletkezo forma expressziós változásainak nyomonkövetése volt különbözo rendszerekben. Ezenfelül a sIL-6R génexpresszióra gyakorolt hatását kívántuk vizsgálni. Megállapíthattuk, hogy a „splicing” megnövekedett mértéke hozzájárul a gyulladásos betegségek patogenezisében szerepet játszó sIL-6R készlethez. Megfigyeléseink szerint egyes sejttípusok esetében a keringo IL-6 és az azonos citokinreceptor családba tartozó OSM befolyásolja az IL-6R génexpresszióját, ezen belül a sIL-6R alternatív „splicing” útján való létrejöttét. Az alternatív „splicing” révén létrejövo sIL-6R detektálása - proteolízis inhibitorok jelenlétében és hiányában - mRNS szinten RT-PCR-rel és fehérje szinten ELISA módszerrel további információkat adhat a sIL-6R keletkezésének szabályozására különbözo sejttípusokban.

Génexpressziós vizsgálatainkból kiderült, hogy a sejtekhez adott IL-6 sIL-6R-ral együtt adva, az eros expressziós aktivitást mutató gének közül más gének expresszióját váltotta ki, mint az IL-6 önmagában. A megfigyelt hatásbeli különbségek szerint az IL-6/sIL-6R az IL-6-tól eltéroen viselkedo faktorként, új citokinként jellemezheto.

9. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. **PvuII restrikciós endonukleázzal emésztve, majd szekvenálva igazoltuk, hogy az mRNS alternatív hasítása (alternatív „splicing”) szerepet játszik az sIL6R keletkezésében.**

2. **RT-PCR reakcióval együtt tudjuk vizsgálni az IL-6R hasítatlan és alternatív „splicing” során létrejött mRNS mennyiségének változásait.**

3. **Kimutattuk, hogy gyulladásos bélbetegségekben a sIL-6R alternatív „splicing” útján létrejövo mRNS mennyisége megno a betegek perifériás vérének mononukleáris sejtjeiben.**

4. **Kimutattuk, hogy gyulladásos bélbetegségekben a gp130 mRNS mennyisége megnövekedik a betegek perifériás vérének mononukleáris sejtjeiben. A megemelkedett sIL-6R és emelkedett IL-6 szinttel együtt e változások az IL-6 hatásának eredményesebb kifejezodését szolgálják, ami a citokin-szolubilis receptor-jelátviteli alegységnek a betegség patomechanizmusában betöltött szerepét támasztják alá.**

5. **Kimutattuk, hogy rheumatoid arthritisben szenvedo betegek perifériás vér limfocitáiban megemelkedik mind a membránkötött, mind a szolubilis IL-6 receptor mRNS mennyiség. Dexametazon hatására nem változik az mRNS mennyiség.**

6. **Kimutattuk, hogy az OSM befolyásolja a membránkötött és szolubilis IL-6R mRNS- és fehérjeszintu kifejezodését, de mind a folyamatok kinetikája, mind az optimális dózis erosen sejtspecifikus.**

7. **Kimutattuk, hogy az IL-6 maga is erosíti saját membránkötött receptorának génexpresszióját, alternatív „splicing” útján létrejövo formájának expresszióját azonban nem befolyásolja.**

8. **Kimutattuk, hogy a sIL-6R IL-6-tal együtt több gén expresszióját tudja kiváltani, mint az IL-6 önmagában.**

9. **Kimutattuk, hogy a sIL-6R ligand nélkül is képes génexpressziós változásokat kiváltani.**

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetomnek, Falus András professzor úrnak, aki bevezetett a molekuláris biológia területére és lehetové tette, koordinálta, tanácsaival hosszú éveken keresztül segítette munkám elorehaladását.

Elsok között szeretnék köszönetet mondani dr. Tóth Sárának, dr. Szalai Csabának, Farkasné Nagy Krisztinának, dr. Igaz Péternek és Ördögh Juditnak, akiktol a sejttenyésztés és a molekuláris technikák elsajátításán kívül a molekuláris gondolkodásmódot is megtanultam.

Az IBD-s munkákon Makó Erno professzor úrral, dr. Dank Magdolnával és dr. Fenyvesi Andrással dolgoztam, köszönöm nélkülözhetetlen segítségüket.
Köszönetem illeti dr. Polgár Annát az RA és SLE betegek limfocita RNS-einek rendelkezésemre bocsátásáért.
Köszönöm dr. Stefan Rose-John-nak (Johannes Gutenberg Universität, Mainz, Németország), hogy a szolubilis IL-6 receptort rendelkezésünkre bocsátotta.
A sIL-6 ELISA elvégzéséért dr. Brózik Márta tudományos munkatársnak (Budai Irgalmasrendi Kórház) tartozom köszönettel.
Dr. Hegyesi Hargita nélkül a DD nem jött volna létre, köszönöm Neki.
Dr. Csikós Mártát a DD kiértékelo softver rendelkezésünkre bocsátásáért illeti köszönet.

Köszönöm Dr. Buzás Editnek, hogy bátorított, tanácsaival nagyban hozzájárult munkám elkészüléséhez.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani az egész Intézetnek és családomnak, a biztos hátországnak.

11. IRODALOMJEGYZÉK

(1) Aarden LA, De Groot ER, Schaap OL, Lansdorp PJ: Production of hybridoma growth factor by human monocytes. Eur. J. Immunol. 1987. 17:1411-16.

(2) Akira S, Taga T, Kishimoto T: Interleukin-6 in biology and medicine. Adv. Immunol. 1993. 54:1-78.

(3) Aman JM, Leonard WJ: Cytokine signaling: cytokine inducible cytokine inhibitors. Current Biol. 1997. 7:R 784-788.

(4) Apostolakos MJ, Schuermann WH, Framton MW, Utell MJ, Willey JC: Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction. Anal. Biochem. 1993. 213:277-84.

(5) Arai K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T: Cytokines: Coordinators and inflammatory responses. Annu. Rev. Biochem. 1990. 59:783-836.

(6) Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, Schutz M, Bartsch B, Holtmann M, Becke, C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schurmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF: 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. Nature Medicine 2000. 6:583-88.

(7) Barillé S, Collette M, Thabard W, Bleunven C, Bataille R, Amiot M: Soluble IL-6R? upregulates IL-6, MMP-1 and MMP-2 secretion in bone marrow stromal cells. Cytokine 2000. 12:1426-1429.

(8) Baumann H, Wang Y, Morella KK, Lai CF, Dams H, Hilton DJ, Hawley RG, Mackiewicz A: Complex of the soluble IL-11 receptor and IL-11 acts as IL-6-type cytokine in hepatic and nonhepatic cells. J. Immunol. 1996. 157:284-90.

(9) Bazan JF : Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990. 87:6934-6938.

(10) Bravo J, Heath JK: Receptor recognition by gp130 cytokines. The EMBO Journal 2000. 19:2399-2411.

(11) Calderon TM, Sherman J, Wilkerson H, Hatcher VB, Berman JW: Interleukin 6 modulates c-sis gene expression in cultured human endothelial cells. Cell Immunol. 1992. 143:118-26.

(12) Cichy J, Rose-John S, Potempa J, Pryjma J, Travis J: Oncostatin M stimulates the expression and release of the IL-6 receptor in human hepatoma HepG2 cells. J. Immunol. 1997. 159:5648-53.

(13) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 1987. 162:156-159.

(14) Crichton MB, Nichols JE, Zhao Y, Bulun SE, Simpson ER: Expression of transcripts of interleukin-6 and related cytokines by human breast tumors, breast cancer cells, and adipose stromal cells. Mol. Cell. Endocrinol. 1996.118:215-20.

(15) Dalmon J, Laurent M, Courtois G: The human beta fibrinogen promoter contains a hepatocyte nuclear factor 1-dependent interleukin-6-responsive element. Mol. Cell Biol. 1993.13:1183-93.

(16) Davis S, Aldrich TH, Ip NY, Stahl N, Scherer S, Farruggella T, DiStefano PS, Curtis R, Panayotatos N, Gascan H, Chevalier S, Yancopoulos GD: Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. Science 1993. 259:1736-9.

(17) Davis S, Aldrich TH, Valenzuela DM, Wong VV, Furth ME, Squinto SP, Yancopoulos GD: The receptor for ciliary neurotrophic factor. Science 1991. 253:59-63.

(18) Desgeorges A, Gabay C, Silacci P, Novick D, Roux-Lombard P, Grau G, Dayer JM, Visher T, Guerne PA: Concentrations and origins of soluble interleukin-6 receptor-? in serum and synovial fluid. J. Rheumatol. 1997. 24:1510-1516.

(19) Dovio A, Sartori ML, Masera RG, Racca S, Angeli A: Inhibitory effect of physiological concentrations of cortisol but not estradiol on interleukin (IL)-6 production by human osteoblast-like cell lines with different constitutive IL-6 expression. Cytokine 2001. 15:47-52.

(20) Ernst M, Gearing DP, Dunn AR: Functional and biochemical association of Hck with the LIF/IL-6 receptor signal transducing subunit gp130 in embryonic stem cells. EMBO J. 1994. 13:1574-1584.

(21) Falus A, Rákász E, Biró J: Neuroendocrine immunology – Regulatory interactions of inflammatory cytokines and hypothalamo-pituitary-adrenal axis. The Immunologist 1993.1/2:40-42.

(22) Falus A, Taga T, Hibi M, Murakami M, Kishimoto T: Regulation of interleukin-6 receptor and gp130 expression in human cell lines of lymphoid and myeloid origin. Cytokine 1992. 4:495-499.

(23) Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL: Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. Science 1992. 257:387-9.

(24) Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff JPG, Kallen K-J, Wollmer A, Grotzinger J, Rose-John S: A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. Nat. Biotechnol. 1997. 15:142-5.

(25) Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S: The effect of novelpolymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic onset juvenile chronic arthritis. J. Clin. Invest. 1998. 102:1369-1376.

(26) Franchimont N, Rydziel S, Canalis E: Interleukin 6 is autoregulated by transcriptional mechanisms in cultures of rat osteoblastic cells. J. Clin. Invest. 1997. 100:1797-803.

(27) Fries KM, Felch ME, Phipps RP: Interleukin-6 is an autocrine growth factor for murine lung fibroblast subsets. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1994. 11:552-60.

(28) Gabay C, Silacci P, Genin B, Mentha G, Le Coultre C, Guerne PA: Soluble interleukin-6 receptor strongly increases the production of acute-phase protein by hepatoma cells but exerts minimal changes on human primary hepatocytes. Eur. J. Immunol. 1995. 25:2378-83

(29) Gadient RA, Patterson PH: Leukemia Inhibitory Factor, Interleukin 6, and Other Cytokines Using the GP130 Transducing receptor: Roles in Inflammation and Injury. Stem Cells 1999. 17:127-137.

(30) Gaillard JP, Bataille R, Brailly H, Zuber C, Yasukawa K, Attal M, Mauro N, Taga T, Kishimoto T, Klein B: Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy. Eur. J. Immunol. 1993. 23:820-4.

(31) Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H: Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. 84:7251-5.

(32) GeisterferM, Richards CD, Gauldie J: Cytokines oncostatin M and interleukin 1 regulate the expression of the IL-6 receptor (gp80, gp130). Cytokine. 1995. 7:503-9.

(33) Gómez-Lechón MJ: Oncostatin M: signal transduction and biological activity. Life Sciences. 1999. 65:2019-30.

(34) Graeve L, Korolenko TA, Hemman U, Weiergräber O, Dittrich E, Heinrich PC: A complex of the soluble interleukin-6 receptor and interleukin-6 is internalized via the signal transducer gp130. FEBS Letters. 1996. 399:131-134.

(35) Greipp PR, Leong T, Bennett JM, Gaillard JP, Klein B, Stewart JA, Oken MM, Kay NE, Van Ness B, Kyle RA: Plasmablastic Morphology – An Independent Prognostic Factor With Clinical and Laboratory Correlates: Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Myeloma Trial E9486 Report by the ECOG Laboratory Group. Blood. 1998. 91:2501-2507.

(36) Grenier A, Dehoux M, Boutten A, Arce-Vicioso M, Durand G, Gougerot-Pocidalo MA, Chollet-Martin S: Oncostatin M production and regulation by human neutrophils. Blood. 1999. 93:1413-1421.

(37) Grotzinger J, Kernebeck T, Kallen KJ, Rose-John S: IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer,tetramer or both? Biol. Chem. 1999. 380:803-13.

(38) Haggiag S, Chebath J, Revel M: Induction of myelin gene expression in Schwann cell cultures by an interleukin-6 receptor-interleukin-6 chimera. FEBS Lett. 1999. 2:1-5.

(39) Hargreaves PG, Wang F, Antcliff J, Murphy G, Lawry J, Russel R, Graham G, Groucher PI: Human myeloma cells shed the interleukin-6 receptor: inhibition by tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and hydroxamata-based metalloproteinase inhibitor. British Journal of Haematology. 1998. 101:694-702.

(40) Hattori M, Abraham LJ, Northemann W, Fey GH: Acute-phase reaction induces a specific complex between hepatic nuclear proteins and the interleukin 6 response element of the rat alpha 2-macroglobulin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. 87:2364-8.

(41) Heaney ML, Golde DW: Soluble cytokine receptors. Blood. 1996. 87:847-57.

(42) Heim MH: The JAK-STAT pathway: specific signal transduction from the cell membrane to the nucleus. Eur. J. Clin. Invest. 1996. 26:1-12.

(43) Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L: Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. Biochem. J. 1998. 334:297–314.

(44) Heymann D, Rousselle A-V: gp130 cytokine family and bone cells. Cytokine. 2000. 12:1455-1468.

(45) Hibi M, Nakajima K, Hirano T: IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. J. Mol. Med. 1996. 74:1-12.

(46) Honda M, Yamamoto S, Cheng M, Zasukawa K, Susyuki H, Osugi Y, Tokunaga T, Kishimoto T: Human soluble IL-6 receptor: It's detection and enhanced release by HIV infection. J. Immunol. 1992. 148:2175-80.

(47) Hooper WC, Phillips DJ, Evatt BL: Endothelial Cell Protein S Synthesis is Upregulated by the Complex of IL-6 and Soluble IL-6 Receptor. Thrombosis and Haemostasis. 1997. 77:1014-19.

(48) Horiuchi S, Ampofo W, Koyanagi Y, Yamasita A, Waki M, Matsumoto A, Yamamoto M, Yamamoto N: High-level production of alternatively spliced soluble interleukin-6 receptor in serum of patients with adult T-cell leukaemia/HTLV-1 associated myelopathy. Immunology. 1998. 95:360-369.

(49) Horiuchi S, Koyanagi Y, Zhou Y, Miyamoto H, Tanaka Y, Waki M, Matsumoto A, Yamamoto M, Yamamoto N: Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. Eur. J. Immunol. 1994.24:1945-8.

(50) Igaz P, Horváth A, Horváth B, Szalai C, Pállinger É, Rajnavölgyi É, Tóth S, Rose-John,S, Falus A: Soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R) makes IL-6R negative T cell line respond to IL-6; it inhibits TNF production. Immunol. Lett. 2000. 71:143-8.

(51) Igaz P, Tóth S, Rose-John S, Madurka I, Fejér Gy, Szalai Cs, Falus A: Soluble interleukin-6 receptor influences the expression of the protooncogene junB and the production of fibrinogen in the HepG2 human hepatoma cell line and primary rat hepatocytes. Cytokine. 1998. 10:620-626.

(52) Ishibashi T, Kimura H, Uchida T, Kariyone S, Friese P, Burstein SA: Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. 86:5953-7.

(53) Jones SA, Horiuchi S, Topley M, Yamamoto N, Fuller GM: The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. FASEB J. 2001. 15:43–58.

(54) Jones SA, Novick D, Horiuchi S, Yamamoto N, Szalai AJ, Fuller GM: C-reactive protein: a physiological activator of IL-6 receptor shedding. J. Exp. Med. 1999. 189:599-604.

(55) Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, Matsui T, Morikawa Y, Senba E, Nakashima K, Taga T, Yoshida K, Kishimoto T, Miyajima A: Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. The EMBO Journal. 1999.18:2127-2136.

(56) Keul P, Heinrich PC, Müller-Newen G, Müller K, Woo P: A possible role for soluble interleukin-6 receptor in the pathogenesis of systemic onset juvenile chronic arthritis. Cytokine. 1998. 10:729-734.

(57) Kim H, Baumann H: The carboxyl-terminal region of STAT3 controls gene induction by the mouse haptoglobin promoter. J. Biol. Chem. 1997. 272:14571-9 .

(58) Kishimoto T: The biology of interleukin-6. Blood. 1989. 74, 1-10.

(59) Kitano A, Oshitani N, Matsumoto T, Kobayashi K: CD44 variants in ulcerative colitis and Crohn's disease. Lancet. 1996. 348:266-7.

(60) Klein W, Tromm A, Griga T, Fricke H, Folwaczny C, Hocke M, Eitner K, Marx M, Epplen JT: The polymorphism at position –174 of the IL-6 gene is not associated with inflammatory bowel disease. Europian Journal of Gastroenterology & Hepatology. 2001. 13:45-47.

(61) Klouche M, Bhakdi S, Hemmes M, Rose-John S: Novel path to activation of vascular smooth muscle cells: up-regulation of gp130 creates an autocrine activation loop by IL-6 and its soluble receptor. J. Immunol. 1999. 163:4583-4589.

(62) Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Kohler G: Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. Nature. 1994. 368:339-42.

(63) Kordula T, Rydel RE, Brigham EF, Horn F, Heinrich PC, Travis J: Oncostatin M and the Interleukin-6 and Soluble Interleukin-6 Receptor Complex Regulate ? 1-Antichymotrypsin Expression in Human Cortical Astrocytes. J. Biol. Chem. 1998. 273:4112-4118.

(64) Korholz D, Gerdau S, Enczmann J, Zessack N, Burdach S: Interleukin 6-induced differentiation of a human B cell line into IgM-secreting plasma cells is mediated by c-fos. Eur. J. Immunol. 1992. 22:607-10.

(65) Koss K, Satsangi J, Welsh KI, Jewell DP: Is interleukin-6 important in inflammatory bowel disease? Genes Immun. 2000. 1:207-12.

(66) Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD: IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. J. Immunol. 1990. 144:4226-30.

(67) Kuropatwinski KK, De Imus C, Gearing D, Baumann H, Mosley B: Influence of Subunit Combinations on Signaling by Receptors for Oncostatin M, Leukemia Inhibitory Factor, and Interleukin-6. J. Biol. Chem. 1997. 272:15135-15144.

(68) Kühn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W: Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell. 1993. 75:263-74.

(69) Kyriakou D, Papadaki H, Eliopoulos AG, Foudoulakis A, Alexandrakis M, Eliopoulos GD: Serum soluble IL-6 receptor concentration ncorrelate with stages of multiple myeloma defined by serum beta-2-microglobulin and C-reactive protein. Int. J. Hematol. 1997. 66:3332-3340.

(70) Lin SC, Yamate T, Taguchi Y, Borba VZ, Girasole G, O'Brien CA, Bellido T, Abe E, Manolagas SC: Regulation of the gp80 and gp130 subunits of the IL-6 receptor by sex steroids in the murine bone marrow. J. Clin. Invest. 1997. 100:1980-90.

(71) Lu C, Vickers MF, Kerbel RS: Interleukin 6: a fibroblast-derived growth inhibitor of human melanoma cells from early but not advanced stages of tumor progression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. 89:9215-9.

(72) Luger TA, Krutmann J, Kirnbauer R, Urbanski A, Schwarz T, Klappacher G, Kock A,Micksche M, Malejczyk J, Schauer E, et al.: IFN-beta 2/IL-6 augments the activity of human natural killer cells. J. Immunol. 1989. 143:1206-9.

(73) Maczkiewicz A, Schooltink H, Heinrich PC, Rose-John S: Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. J. Immunol. 1992. 149:2021-7.

(74) MahidaYR, Kurlac L, Gallagher A, Hawkey CJ: High circulating concentrations of interleukin-6 in active Crohn's disease but not ulcerative colitis. Gut. 1991. 32:1531-4.

(75) Maione D, Di Carlo E, Li W, Musiani P, Modesti P, Peters M, Rose-John S, Delle Rocca C, Tripodi M, Lazzaro D, Taub R, Savino R, Ciliberto G: Coexpression of IL-6 and Soluble IL-6R causes nodular regenerative hyperplasia and adenomas of the liver. EMBO J. 1998. 17:5588-5597.

(76) Mansfield JC, Holden H, Tarlow JK, Di Giovine FS, McDowell TL, Wilson AG, Holdsworth CD, Duff GW: Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. Gastroenterology. 1994. 106:637-42.

(77) Matsuda T, Fukada T, Takahashi-Tezuka M, Okuyama Y, Fujitani Y, Hanazono Y, Hirai H , Hirano T: Activation os Fes tyrosine kinase by gp130, an interleukin-6 familiy cytokine signal transducer, and their association. J. Biol. Chem. 1995. 270:11037-11039.

(78) Matsuda T, Takahashi-Tezuka M, Fukada T, Okuyama Y, Fujitani Y, Tsukada S, Mano H, Hirai H, Witte ON, Hirano T: Association and activation of Btk and Tec kinases by gp130, a signal transducer of the interleukin-6 family of cytokines. Blood. 1995. 85:627-633.

(79) Merétey K, Falus A, Taga T, Kishimoto T: Histamine influences the expression of the interleukin-6 receptor on human lymphoid, monocytoid and hepatoma cell lines. Agents Actions. 1991. 33:189-91.

(80) Mihara M, Moriya Y, Kishimoto T, Ohsugi Y: Interleukin-6 (IL-6 induces the proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of soluble IL-6 receptor. Br. J. Rheum. 1995. 34:321-325.

(81) Miles SA, Rezai AR, Salazar-Gonzalez JF, Vander Meyden M, Stevens RH, Logan DM,Mitsuyasu RT, Taga T, Hirano T, Kishimoto T, et al.: AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. 87:4068-72.

(82) Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Ishida O, Ikeda H, Tsuruta O, Harada K, Tateishi H, Nishiyama T, Tanikawa K: Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6 Gut. 1995. 36:45-49.

(83) Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K: Cytokine receptors and signal transduction. Annu. Rev. Immunol. 1992.10:5-331.

(84) Modur V, Feldhaus MJ, Weyrich AS, Jicha DL, Prescott SM, Zimmermann GA, McIntyre TM: Oncostatin M is a proinflammatory mediator. In vivo effects correlate with endothelial cell expression of inflammatoty cytokines and adhesion molecules. J. Clin. Invest. 1997. 100:158-168.

(85) Modur V, Li Y, Zimmermann GA, Prescott SM, McIntyre TM: Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha. J. Clin. Invest. 1997. 100:2752-6.

(86) Molnár EL, Hegyesi H, Tóth S, Darvas Z, László V, Szalai C, Falus A: Biosynthesis of interleukin-6, an autocrine growth factor for melanoma, is regulated by melanoma-derived histamine. Semin. Cancer. Biol. 2000. 10:25-8.

(87) Murakami-Mori K, Taga T, Kishimoto T, Akamura S: The soluble form of the IL-6 receptor (sIL-6R alpha) is a potent growth factor for AIDS-associated Kaposi's sarcoma (KS) cells; the soluble form of gp130 is antagonistic for sIL-6R alpha-induced AIDS-KS cell growth. Int. Immunol. 1996. 8:595-602.

(88) Murray R, Lee F, Chiu CP: The genes for leukemia inhibitory factor and interleukin-6 are expressed in mouse blastocysts prior to the onset of hemopoiesis. Mol. Cell Biol. 1990. 10:4953-6.

(89) Müllberg J, Dittrich E, Graeve L, Gerhartz C, Yasukawa K, Taga T, Kishimoto T, Heinrich PC, Rose-John S: Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor. FEBS Lett. 1993. 332:174-8.

(90) Müllberg J, Oberthür W, Lottspeich F, Mehl E, Dittrich E, Graeve L, Heinrich PC, Rose-John S: The soluble human IL-6 receptor: Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. J. Immunol. 1994. 152:4958-4968.

(91) Müllberg J, Schooltink H, Stoyan T, Günther M, Grave L, Buse G, Maczkiewicz A, Heinrich PC, Rose-John S: The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. Eur. J. Immunol. 1993. 23:473-80.

(92) Müllberg J, Schooltink H, Stoyan T, Heinrich PC, Rose-John S: Protein-kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992. 189:794-800.

(93) Nakafuku M, Satoh T, Kaziro Y: Differentiation factors, including nerve growth factor, fibroblast growth factor, and interleukin-6, induce an accumulation of an active Ras.GTP complex in rat pheochromocytoma PC12 cells. J. Biol. Chem. 1992. 267:19448-54.

(94) Nishino E, Matsuzaki N, Masuhiro K, Kameda T, Taniguchi T, Takagi T, Saji F, Tanizawa O: Trophoblast-derived interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic gonadotropin release through IL-6 receptor on human trophoblasts. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1990. 71:436-41.

(95) Novick D, Engelmann H, Wallach D, Rubinstein M: Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. J. Exp. Med. 1989. 170:1409-14.

(96) Ogata S, Chauchan D, Teoh G, Treon SP, Urashima M, Sclossman RL, Anderson KC: IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. J. Immunol. 1997. 159:2212–2221.

(97) Ohsima S, Saeki Y, Mima T, Sasai M, Nishioka K, Nomura S, Kopf M, Katada Y, Tanaka T, Suemura M, Kishimoto T: Interleukin-6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. 95:8222-8226.

(98) Olaniran AK, Baker BS, Garioch JJ, Powles AV, Fry L: A comparison of the stimulatory effects of cytokines on normal and psoriatic keratinocytes in vitro. Arch. Dermatol. Res. 1995. 287:231-6.

(99) Orchard TR, Thiyagaraja S, Welsh KI, Wordsworth BP, Hill Gaston JS, Jewell DP: Clinical phenotype is related to HLA genotype in the peripheral arthropathies of inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2000. 118:274-8.

(100) Penix LA, Sweetser MT, Weaver WM, Hoeffler JP, Kerppola TK, Wilson CB: The proximal regulatory element of the interferon-gamma promoter mediates selective expression in T cells. J. Biol. Chem. 1996. 271:31964-72.

(101) Perlstein RS, Whitnall MH, Abrams JS, Mougey EH, Neta R: Synergistic roles of interleukin-6, interleukin-1, and tumor necrosis factor in the adrenocorticotropin response to bacterial lipopolysaccharide in vivo. Endocrinology. 1993. 132:946-52.

(102) Peters M, Jacobs S, Ehlers M, Vollmer P, Müllberg J, Wolf E, Brem G, Meyer zum Büschenfelde K-H, Rose-John S: The function of the soluble interleukin-6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6. J. Exp. Med. 1996. 183:1399-1406.

(103) Peters M, Odenthal M, Schirmacher P, Blessing M, Fattori E, Ciliberto G, Meyer zum Buschenfelde K-H, Rose-John S: Soluble IL-6 receptor leads to a paracrine modulation of the IL-6-induced hepatic acute phase response in double transgenic mice. J. Immunol. 1997. 159:1474-81.

(104) Peters M, Müller AM, Rose-John S: Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. Blood. 1998. 92:3495-504.

(105) Peters M, Schirmacher P, Goldschmitt J, Odenthal M, Peschel C, Fattori E, Ciliberto G, Dienes H-P, Meyer zum Buschenfelde K-H, Rose-John S: Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in interleukin (IL)-6-sIL-6R double transgenic mice. J. Exp. Med. 1997. 185:755-66.

(106) Planck SR, Dang TT, Graves D, Tara D, Ansel JC, Rosenbaum JT: Retinal pigment epithelial cells secrete interleukin-6 in response to interleukin-1. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1992. 33:78-82.

(107) Price JE, Fabra A, Zhang RD, Radinsky R, Pathak S: Int.J.Oncol. 1994. 5:459-467.

(108) Rakasz E, Gal A, Biro J, Balas G, Falus A: Modulation of glucocorticosteroid binding in human lymphoid, monocytoid and hepatoma cell lines by inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 beta, IL-6 and tumour necrosis factor (TNF)-alpha. Scand. J. Immunol. 1993. 37:684-9.

(109) Reichert F, Levitzky R, Rotshenker S: Interleukin 6 in intact and injured mouse peripheral nerves. Eur. J. Neurosci. 1996. 8:530-5.

(110) Richards CD, Brown TJ, Shoyab M, Baumann H, Gauldie J: Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro. J. Immunol. 1992. 148:1731-6.

(111) Robak T, Gladalska A Stepien H, Robak E: Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis. Mediators Inflamm. 1998. 7:347-53.

(112) Robak T, Wierzbowska A, Blasinska-Morawiec M, Korycka A, Blonski JZ: 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. 1999. 8:277-86.

(113) Romero R, Avila C, Santhanam U, Sehgal PB: Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor. Association with infection. J. Clin. Invest. 1990. 85:1392-400.

(114) Rose-John S, Heinrich PC: Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological functions. Biochem. J. 1994. 300:281-90.

(115) Rosen EM, Liu D, Setter E, Bhargava M, Goldberg ID: Interleukin-6 stimulates motility of vascular endothelium. EXS. 1991. 59:194-205.

(116) Saito M, Yoshida K, Hibi M, Taga T, Kishimoto T: Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer gp130, and its regulated expression in vivo. J. Immunol. 1992. 148:4066–4071.

(117) Salvi M, Girasole G, Pedrazzoni M, Passeri M, Giuliani N, Minelli R, Bravermann RE, Roti E: Increased serum concentrations of interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptors in patients with Graves' disease. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1996. 81:2976-2979.

(118) Savarese TM, Campbell CR, McQuain C, Mitchell K, Guardini R, Quesenberry PJ, Nelson BE: Coexpression of Oncostatin M and Its Receptor and Evidence for STAT3 Activation in Human Ovarian Carcinomas. Cytokine. 2002. 17:324-334.

(119) Schindler R, Mancilla J, Endres J, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA: Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6) , IL-1 and tumor necrosis factor (TNF) in human mononuclear cells: IL-6 supresses IL-1 and TNF. Blood. 1990. 75: 40-44.

(120) Schirmacher P, Peters M, Ciliberto G, Blessing M, Lotz J, Meyer zum Büschenfelde K-H, Rose-John S: Hepatocellular hyperplasia, plasmocytoma formation and extramedullary hematopoesisin interleukin (IL)-6/soluble IL-6 receptor double-transgenic mice. Am. J. Pathol. 1998. 153: 639-648.

(121) Schooltink H, Schmitz-Van de Leur H, Heinrich PC, Rose-John S: Up-regulation of the interleukin-6-signal transducing protein (gp130) by interleukin-6 and dexamethasone in HepG2 cells. FEBS Lett. 1992. 297:263-5.

(122) Sebgal PB, Grienger G, Tosato G: Regulation of the acute phase and immune responses: interleukin-6. New York: Ann. NY. Acad. Sci. 1989. 557:1-583.

(123) Senaldi G, Varum BC, SarmientoU, Starnes C, Lile J, Scully S, Guo J, Elliott G, McNinch J, Shaklee CL, Freeman D, Manu F, Simonet WS, Boone T, Chang M-S: Novel neurotrophin-1/B-cell stimulating factor-3: A cytokine of the IL-6 family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. 96:11458–11463.

(124) Sierra A, Price JE, Garcia-Ramirez M, Mendez O, Lopez L, Fabra A: Astrocyte-derived cytokines contribute to the metaStatic brain specificity of breast cancer cells. Lab. Invest. 1997. 77:357-68.

(125) Silacci P, Dayer JM, Desgeorges A, Peter R, Manueddu C, Guerne P-A: Interleukin (IL)-6 and its soluble receptor induce TIMP-1 expression in synoviocytes and chondrocytes, and block IL-1 induced collagenolytic activity. J. Biol. Chem. 1998. 273:13625-13629.

(126) Spangelo, BL, Judd AM, Isakson PC, MacLeod RM: Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. Endocrinology 1989. 125:575-577.

(127) Sporeno E, Paonessa G, Salvati AL, Graziani R, Delmastro P, Ciliberto G, Toniatti C: Oncostatin M binds directly to gp130 and behaves as Interleukin-6 antagonist on a cell line expressing gp130 but lacking functional Oncostatin M receptor. J. Biol. Chem. 1994. 269:10991-10995.

(128) Sporeno E, Savino R, Ciapponi L, Paonessa G, Cabibbo A, Lahm A, Pulkki K, Sun RX, Toniatti C, Klein B: Human interleukin-6 receptor super-antagonists with high potency and wide spectrum on multiple myeloma cells. Blood. 1996. 87:4510-4519.

(129) Sporri B, Wiesmann UN, Ochsenbein RM, Loetscher M, Waelti ER, Lottaz D, Bickel M: Soluble IL-1 receptor type I binds to human dermal fibroblasts and induces calcium flux. FEBS Lett. 1998. 434:283-8.

(130) Suda T, Chida K, Akihito T, Ide K, Asada K, Nakamura Y, Suzuki K, Kuwata H, Nakamura HB: Oncostatin M production by human dendritic cells in response to bacterial products. Cytokine. 2002. 17:335-340.

(131) Suffredini AF, Fantuzzi G, Badolato R, Oppenheim JJ, O'Grady NP: New insights into the biology of the acute phase response. J. Clin. Immunol. 1999. 19:203-14.

(132) Sui X, Tsuji K, Ebihara Y, Tanaka R, Muraoka K, Yoshida M, Yamada K, Yasukawa K, Taga T, Kishimoto T, Nakahata T: Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor with IL-6 stimulates megakaryopoesis from human CD34+ cells through glycoprotein (gp) 130 signaling. Blood. 1999. 93:2525-2532.

(133) Sutherland AG, Deehan DJ: Urinary soluble IL-6 receptor levels after cardiopulmonary bypass. Cytokine. 2000. 12:1441-1443.

(134) Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, Kubo M, Yamashita A, Okabe M, Takeda K, Akira S, Matsumoto S, Toyonaga A, Sata M, Yoshimura A: CIS3/ SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. J. Exp. Med. 2001. 193:471-81.

(135) Swope VB, Abdel-Malek Z, Kassem LM, Nordlund JJ: Interleukins 1 alpha and 6 and tumor necrosis factor-alpha are paracrine inhibitors of human melanocyte proliferation and melanogenesis. J. Invest. Dermatol. 1991. 96:180-5.

(136) Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T: Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. Cell. 1989. 58:573-81.

(137) Taga T, Hibi M, Murakami-Mori K, Saito M, Yawata H, Narazaki M: Interleukin-6 receptor and signals. Chem. Immunol. 1992. 51:181-204.

(138) Taga T, Kawanishi Y, Hardy RR, Hirano T, Kishimoto T: Receptors for B cell stimulatory factor 2. Quantitation, specificity, distribution, and regulation of their expression. J. Exp. Med. 1987. 166:967-81.

(139) Taga T, Kishimoto T: Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. Annu. Rev. Immunol. 1997. 15:797-819.

(140) Takizawa T, Yanagisawa M, Ochiai W, Yasukawa K, Ishiguro T, Nakashima K, Taga T. Directly linked soluble IL-6 receptor-IL-6 fusion protein induces astrocyte differentiation from neuroepithelial cells via activation of STAT3. Cytokine. 2001. 13(5):272-9.

(141) Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, Miyaura C, Tanaka S, Yoshiki Y, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kumaki K, Taga T, Kishimoto T, Suda T: Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. Proc. Natl. Acad. Sci. 1993. 90:11924-11928.

(142) Thabard W, Barillé S, Collette M, Harousseau J-L, Rapp M-J, Bataille R., Amiot M: Myeloma Cells Release Soluble Interleukin-6R? in Relation to

Disease Progression by Two Distinct Mechanisms: Alternative Splicing and Proteolytic Cleavage. Clinical Cancer Research. 1999. 5:2693-2697.

(143) Thabard W, Collette M, Bataille R, Amiot M: Protein kinase C ? and ? isoenzymes control the shedding of the interleukin 6 receptor ? in myeloma cells. J. Biochem. 2001. 358:193-200.

(144) Thabard W, Collette M, Mellerin M-P, Puthier D, Barillé S, Bataille R, Amiot M: IL-6 upregulates its own receptor on some human myeloma cell lines. Cytokine. 2001. 14:352-6.

(145) Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW: Interleukin –6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. Blood. 1994. 83:113-118.

(146) Tosato G, Seamon KB, Goldman ND, Sehgal PB, May LT, Washington GC, Jones KD, Pike SE: Monocyte-derived human B-cell growth factor identified as interferon-beta 2 (BSF-2, IL-6). Science. 1988. 239:502-4.

(147) Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips HS, Goddard A, Moore MW, Buj-Bello A, Davis AM, Assi N, Takahashi M, Vandlen R, Henderson CE, Rosenthal A: Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. Nature. 1996. 382:80-3.

(148) Ulich TR, Yin S, Guo K, Yi ES, Remick D, delCastillo J: Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. Interleukin-6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation. Am. J. Pathol. 1991. 138:1097-1102.

(149) Van Snick J, Cayphas S, Vink A, Uyttenhove C, Coulie PG, Rubira MR, Simpson RJ: Purification and NH2-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. 83:9679-83.

(150) Van Wagoner NJ, Choi C, Repovic P, Benveniste EN: Oncostatin M Regulation of Interleukin-6 Expression in Astrocytes: Biphasic regulation Involving the Mitogen-Activated Protein Kinases ERK1/2 and p38. J. Neurochem. 2000. 75:563-575.

(151) te Velde AA, van de Wiel-van Kemenade E, Figdor CG: Differential cytoStatic activity of monocyte-derived cytokines against human melanoma cells. Int. J. Cancer. 1992. 50:746-51.

(152) Vollmer P, Walew I, Rose-John S, Bhakdi S: Novel Pathogenic Mechanism of Microbial Metalloproteinases: Liberation of Membrane-Anchored Molecules in Biologically Active Form Exeplified by Studies with the Human Interleukin-6 Receptor. Infection and Immunity. 1996. 64:3646-51.

(153) Wallace PM, MacMaster JF, Rouleau KA, Brown TJ, Loy JK, Donaldson KL, Wahl AF: Regulation of inflammatory responses by oncostatin M. J. Immunol. 1999. 162:5547-5555.

(154) Weiergraber O, Hemman U, Küster A, Müller-Gewen G, Schneider J, Rose-John S, Kurschat P, Hart MHL, Stabel S, Heinrich PC: Soluble human interleukin-6 receptor. Expression in insect cells, purification and characterization. Eur. J. Biochem. 1995. 234:661-9.

(155) Wenisch C, Linnau KF, Looaresuwan S, Rumpold H: Plasma levels of the interleukin-6 cytokine family in persons with severe Plasmodium falciparum malaria. J. Infect. Dis. 1999. 179:747-50.

(156) Won KA, Baumann H: The cytokine response element of the rat alpha 1-acid glycoprotein gene is a complex of several interacting regulatory sequences. Mol. Cell Biol. 1990. 10:3965-78.

(157) Yamamoto M, Yoshizaki K, Kishimoto T, Ito H: IL-6 is required for the development of Th1 cell mediated murine colitis. J. Immunol. 2000. 164:4878-4882.

(158) Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T, Kishimoto T: Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. Science 1988. 241:825-8.

(159) Yamazaki K, Yamada E, Kanaji Y, Shizume K, Wang DS, Maruo N, Obara T, Sato K: Interleukin-6 (IL-6) inhibits thyroid function in the presence of soluble IL-6 receptor in cultured human thyroid follicles. Endocrinology 1996. 137:4857-63.

(160) Yokoyama A, Kohno N, Sakai K, Kondo K-I, Hirasawa Y, Hiwada K: Circulating levels of soluble interleukin-6 receptor in patients wizh bronchial asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997. 156:1688-1691.

(161) Yoshida K, Taga T, Saito M, Suematsu S, Kumanogoh A, Tanaka T, Fujiwara H, Hirata M, Yamagami T, Nakahata T, Hirabayashi T, Yoneda Y, Tanaka K, Wang WZ, Mori C, Shiota K, Yoshida N, Kishimoto T: Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of

cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. 93:407-11.

(162) Zhang X-G, Gu J-J, Lu Z-Y, Yasukawa K, Yancopoulos GD, Turner K, Shoyab M, Taga T, Kishimoto T, Bataille R, Klein B: Ciliary neurotropic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130. J. Exp. Med. 1994. 179:1337-42.

12. A TÉMÁBAN MEGJELENT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Falus A, **Holub M**, Makó E: Molekuláris biológiai változások vastagbélbetegségekben. IBD, Válogatott fejezetek a gyulladásos vastagbélbetegségekrol:55-66; Magyar Gasztroenterológiai Társaság, Medicom, Budapest, 1997.
2. **Holub MC**, Makó E, Dévay T, Dank M, Szalai C, Fenyvesi A, Falus A: Increased interleukin-6 levels, interleukin-6 receptor and gp130

expression in peripheral lymphocytes of patients with inflammatory bowel disease. Scand. J. Gastroenterol. 1998. 228:47-50. *IF: 2,36*

3. **Holub MC**, Szalai C, Polgár A, Tóth S, Falus A: Generation of 'truncated' interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNA by alternative splicing; a possible source of soluble IL-6R. Immunol. Lett. 1999. 68:121-4. *IF: 1.494*
4. Polgár A, Brózik M, Tóth S, **Holub M**, Hegyi K, Kádár A, Hodinka L, Falus A: Soluble interleukin-6 receptor in plasma and in lymphocyte culture supernatants of healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Med. Sci. Monit. 2000. 6:13-8.
5. **Holub MC**, Hegyesi H, Igaz P, Polgár A, Tóth S, Falus A: Soluble interleukin-6 receptor enhanced by oncostatin M induces major changes in gene expression profile of human hepatoma cells. Immunol. Lett. 2002. 82:79-84. *2001-es IF: 2,009*
6. Polgár A, Brózik M, Tóth S, **Holub M**, Falus A: A synthetic corticosteroid, dexamethasone regulates generation of soluble form of interleukin-6 receptor of human lymphocytes, in vitro. Acta Biol. Hung. 2002. 53:307-15. *IF: 0.282*

13. EGYÉB SAJÁT KÖZLEMÉNYEK:

1. Csaba G, Mag O, **Holub M**: Impact of neonatal benzpyrene imprinting on thymocytic dexamethasone binding in ascitic tumor bearing rats. Gen . Pharmacol. 1991. 22:695-7. *IF: 0,86*
2. Varga VL, Fülöp AK, **Holub MC**, Tóth S, Szalai C, Falus A: gp130-specific antisense oligonucleotides inhibit IL-6 signal inducing junB mRNA transcription in the human hepatoma cell line, HepG2. Cell. Biol. Int. 2001. 25:835-40. *IF: 0,942*
3. Horváth BV, Falus A, Tóth S, Szalai C, Lázár-Molnár E, **Holub MC**, Buzás E, Nagy A, Fülöp AK: Inverse regulation of interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor in histamine deficient histidine decarboxylase-knock-out mice. Immunol. Lett. 2002. 80:151-4. *2001-es IF: 2,009*

15. ELOADÁSOK, POSZTEREK:

Csordás Gy, **Holub M**, Járai B, Tóth S, Kádár A: Maintaining breast cancer cell from fine needle aspirate in primary culture; XXI. International Congress of the International Academy of Pathology and 12th World Congress of Academic and Environmental Pathology, 1996. (poszter)
Pathology International vol 46. suppl. 1 (83) 1996. (absztrakt)

Holub M, Dank M, Tóth S, Falus A, Makó E: Interleukin (IL-6), corticosteroid-, and IL-6 receptors in Inflammatory Bowel Disease; STF: V. Semmelweis Tudományos Fórum 1996. (poszter)
Medical Sciene Monitor, Vol.2. Supplement 3. 44. szám (absztrakt)

Makó E, **Holub M**, Falus A: IBD aktivitás és IL-6, valamint steroid receptorszint-változás; klinikai összehasonlító vizsgálat elso eredményei IBD-ben; A Magyar Crohn Társaság III. Tudományos Symposiuma, 1997. (eloadás)

Holub M, Szalai Cs, Tóth S, Makó E, Fenyvesi A, Polgár A, Falus A: A szolubilis IL-6 receptor keletkezésének vizsgálata; VI. Sejt -, és Fejlodésbiológiai Napok, Szeged, 1998. (poszter)

Holub M, Szalai Cs, Tóth S, Makó E, Fenyvesi A, Falus A: A szolubilis IL-6 receptor keletkezésének vizsgálata, Magyar Immunológiai Társaság XXVIII. Kongresszusa, Harkány, 1998. (eloadás) Sigma 50 000 .- Ft vegyszertámogatás a legjobbnak ítélt eloadásnak.

Holub M, Szalai Cs, Tóth S, Makó E, Fenyvesi A, Polgár A, Falus A: A szolubilis IL-6 receptor keletkezése és vizsgálata, VII. Semmelweis Tudományos Fórum, 1998. (poszter)

Falus, A., **Holub, M.**, Igaz, P., Tóth, S.: Generation and significance of soluble form of IL-6 receptor. 10th EFIS meeting on Signal and Signal Processing in the Immune System, Balatonöszöd, 1998. (eloadás)

Holub M., Szalai Cs., Polgár A., Tóth S., Falus A.: A szolubilis IL-6 receptor vizsgálata. SOTE PhD Tudományos Napok ’99. eloadás: I. helyezés 1999. (eloadás)

Holub M., Polgár A., Brózik M., Tóth S., Falus A.: IL-6 és oncostatin M hatása a szolubilis IL-6 receptor keletkezésére. Magyar Immunológiai Társaság XXIX. Kongresszusa, 1999. (poszter)

Polgár A, Brózik M, Tóth S, **Holub M,** Hegyi K, Kádár A, Hodinka L, Falus A: Soluble interleukin-6 receptor in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. 3rd Central European Congress of Rheumatology. Bratislava, May 10-13, 2000. (eloadás)

Holub, M. C., Hegyesi, H., Igaz, P., Tóth, S., Falus, A: Gene expression profiles upon IL-6/sIL-6R treatments: oncostatin M influences expression of interleukin-6 receptor and functionally active soluble IL-6 receptor, 11th EFIS meeting on Signal and Signal Processing in the Immune System, Pécs, 2001. (eloadás)