

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin,
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Daniel Teupser

**Aktivitätsbasierte Assays zur Quantifizierung
Granula-assoziiertes Serinproteasen
der Leukozyten und Mastzellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julia Sophie Leding

aus

Münster

2022

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian P. Sommerhoff

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Markus Sperandio

Prof. Dr. Anne Krug

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2022

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Aktivitätsbasierte Assays zur Quantifizierung Granula-assoziiertes Serinproteasen der Leukozyten und Mastzellen“ selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 17.10.2022

Julia Sophie Leding

Meinen wundervollen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	8
1 Zusammenfassung.....	10
2 Einleitung.....	12
2.1 GASPIDs.....	12
2.1.1 Humane Neutrophilen-Elastase.....	12
2.1.2 Cathepsin G.....	14
2.1.3 Proteinase 3	14
2.1.4 Tryptase.....	14
2.1.5 Chymase	15
2.2 Cathepsin C	16
2.3 Detektion und Quantifizierung der GASPIDs.....	17
2.4 Zielsetzung und geplantes Vorgehen	19
3 Material und Methoden.....	21
3.1 Material	21
3.1.1 Geräte.....	21
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	22
3.1.3 Kit-Systeme	22
3.1.4 Enzyme.....	23
3.1.5 Substrate	23
3.1.6 Inhibitoren.....	23
3.1.7 Zellkultur	24
3.1.7.1 Zelllinien	24
3.1.7.2 Kulturmedien und Zusätze	24
3.1.8 Puffer und Lösungen	24
3.1.8.1 Assaypuffer	25
3.1.8.2 Lysepuffer	25
3.1.8.3 Neutrophilen-Resuspensionspuffer.....	25
3.1.9 Materialien und Substanzen für SDS-PAGE und Western Blot.....	25
3.1.10 Antikörper	26
3.1.11 Software	26
3.2 Methoden.....	26

3.2.1	Bestimmung der enzymatischen Aktivität.....	26
3.2.2	Zellkultur	27
3.2.2.1	Zellkultivierung	28
3.2.2.2	Herstellung von Zelllysat	28
3.2.3	Gelelektrophorese und Western Blot.....	29
3.2.3.1	Probenvorbereitung.....	29
3.2.3.2	Gelelektrophorese	29
3.2.3.3	Western Blot und Immunodetektion	30
3.2.4	Isolation humaner neutrophiler Granulozyten.....	31
3.2.5	Statistische Methoden und Berechnungen.....	31
3.2.5.1	Statistische Auswertung.....	31
3.2.5.2	Sensitivität der Aktivitätsassays	32
3.2.5.3	Quantifizierung der Proteasen mittels Aktivitätsassay	32
3.2.5.4	Quantifizierung der Proteasen mittels Western Blot	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Assayentwicklung	34
4.1.1	Identifizierung geeigneter Substrate.....	34
4.1.2	Einfluss der Substratkonzentration.....	37
4.1.3	Selektivität: Detektion anderer GASPIDs	40
4.1.4	Interferenz durch andere GASPIDs.....	42
4.1.5	Spezifität: Einsatz spezifischer Inhibitoren	44
4.2	Validierung der prototypischen Assays mit Zelllinien.....	46
4.2.1	Detektion der GASPIDs in den Modellzelllinien.....	46
4.2.2	Spezifität im Zellmodell: Inhibition der GASIPD-Aktivität im Lysat	48
4.2.3	Linearität: Bestimmung eines geeigneten Messbereichs	51
4.2.4	Validierung durch Western Blots	52
4.3	Aktivitätsassay für Cathepsin C	54
4.3.1	Identifizierung eines geeigneten Substrats.....	54
4.3.2	Validierung des prototypischen Cathepsin C-Assays.....	55
4.3.3	Übertragung auf das Zellmodell	56
4.4	Pilotstudie: Anwendung der GASPID- Assays auf isolierte humane neutrophile Granulozyten.....	57

4.4.1	Nachweis der GASPID- und Cathepsin C-Aktivität im Lysat isolierter humaner neutrophiler Granulozyten	58
4.4.2	Spezifität: Inhibition der Proteasenaktivität.....	59
5	Diskussion	62
5.1	Sensitivität.....	62
5.2	Selektivität und Spezifität.....	65
5.3	GASPIDs in Zelllysaten.....	66
5.4	Cathepsin C	68
5.5	Standards.....	69
5.6	Pilotstudie: Anwendung der GASPID-Assays auf isolierte humane neutrophile Granulozyten.....	71
5.7	Ausblick.....	72
	Literaturverzeichnis.....	74
	Danksagung.....	85

Abkürzungsverzeichnis

AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
AP-CC	Assaypuffer Cathepsin C
AP-M	Assaypuffer „M“
AP-T	Assaypuffer Tryptase
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
CatC	Cathepsin C
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CF	Zystische Fibrose
CG	Cathepsin G
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CHY	Chymase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetal Calf Serum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GASPIDs	Granule-Associated Serine Proteases of Immune Defense
HL-60	Humane Leukämiezelllinie 60
HMC-1	Humane Mastzelllinie 1
HNE	Humane Neutrophilen-Elastase
HT-1080	Humane Fibrosarkomzelllinie 1080
IgG	Immunglobulin G
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LP-D	Lysepuffer „D“
LUVA	„Laboratory of the University of Virginia“-Zelllinie
NA	Nitroanilin

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NSP4	Neutrophilen-Serinprotease 4
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHM	Peptide Histidine-Methionine
pNA	para-Nitroanilin
PR3	Proteinase 3
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RF	Relative Fluoreszenz
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TPS	Tryptase
U937	Humane Monozyten-Zelllinie „U937“
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid

Sämtliche Aminosäuren wurden nach dem 1- bzw. 3-Buchstabencode der IUPAC/IUBMB abgekürzt.

1 Zusammenfassung

Die Granula-assoziierten Serinproteasen der Immunabwehr oder auch „GASPIDs“ werden von Leukozyten und Mastzellen exprimiert und sind an der regelrechten Funktion des Immunsystems, aber auch der Entstehung von entzündlichen und degenerativen Prozessen beteiligt. Zu den GASPIDs zählen Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3 der neutrophilen Granulozyten, Mastzellen wiederum exprimieren Trypsin und Chymase. Alle GASPIDs werden als Zymogene synthetisiert, von der Cysteinprotease Cathepsin C aktiviert und enzymatisch aktiv in sekretorischen Granula gespeichert.

Ziel dieser Arbeit war es, aktivitätsbasierte Assays für die Quantifizierung der GASPIDs zu entwickeln. Dazu wurden für jede Protease zwei bis fünf Substrate ausgewählt, die in der Literatur für die Detektion der GASPIDs beschrieben worden sind. Insgesamt wurden 14 verschiedene Substrate, die sich sowohl in ihrer Peptidsequenz als auch in ihrer Detektionsgruppe (fluorogen vs. chromogen) unterscheiden, mithilfe von isolierten und rekombinanten Proteasen hinsichtlich ihrer Sensitivität zur Quantifizierung der GASPIDs verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass alle Substrate in Abhängigkeit von der eingesetzten GASPID-Konzentration gespalten werden, sich die Nachweisgrenzen aber um bis zu drei Dekaden unterscheiden.

Für jede GASPID wurden die jeweils sensitivsten Substrate ausgewählt, die die Protease im Bereich von weniger als 2,5 nM detektieren. Im nächsten Schritt wurde die Selektivität überprüft, indem sowohl die Spaltung als auch die Interferenz durch andere GASPIDs untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass Cathepsin G und Chymase sowie z. T. auch Proteinase 3 und Elastase aufgrund ihrer ähnlichen Eigenschaften die jeweils gleichen Substrate spalten können. Für die übrigen Substrate liegt die Selektivität unter den gewählten Assaybedingungen bei über 95 %.

Um die Spezifität der Assays zu verbessern, wurden in einem weiteren Schritt spezifische Inhibitoren eingesetzt. Damit ist es möglich, auch die Cathepsin G- und Chymase-Aktivität trotz überlappender Substratspezifität zuverlässig voneinander zu unterscheiden.

Nach der Auswahl der am besten geeigneten Substrate und Optimierung der Assaybedingungen wurde die Eignung der Aktivitätsassays zur Detektion der GASPIDs in Zelllysaten überprüft. Dazu wurden insgesamt fünf verschiedene Vorläuferzelllinien von Neutrophilen (U937, HL-60), Mastzellen (HMC-1, LUVA) und Fibroblasten (HT-1080) verwendet. Die Assays erwiesen sich als ausreichend sensitiv, um die GASPID-Aktivität auch in Lysaten nachzuweisen. Im Cathepsin G- bzw. Chymase-Assay kam es mit dem initial ausgewählten fluorogenen Substrat allerdings zu falsch-positiven Ergebnissen, da dieses Substrat durch andere zelluläre Proteasen (potentiell das Proteasom) gespalten wird; es wurde durch ein chromogenes Substrat ersetzt, das sich auch im Zellassay als spezifisch erwies. Auch im Proteinase 3-Assay kamen falsch-positive Ergebnisse zustande, die jedoch durch den Einsatz des spezifischen Inhibitors eindeutig als solche identifiziert werden können.

Anschließend wurde für jede GASPID der Zusammenhang zwischen gemessener Aktivität und eingesetzter Zellzahl überprüft. Alle Assays zeigen eine lineare Abhängigkeit von der Zellzahl, sodass die Quantifizierung der GASPIDs auch im Zelllysate möglich ist, wobei weniger als 25 000 Zellen pro Assay ausreichen. Zur Validierung der mittels Aktivitätsassays bestimmten Proteasemengen wurden Western Blots durchgeführt, die eine gute Korrelation zwischen den immun- und aktivitätsbasiert detektierten Mengen zeigen.

In einer Pilotstudie wurde abschließend bestätigt, dass die Assays ausreichend sensitiv und spezifisch sind, um die GASPIDs in aus dem peripheren Blut isolierten neutrophilen Granulozyten zu quantifizieren. Für die Bestimmung aller GASPIDs in Triplikaten genügen Probenvolumina von weniger als 1 ml Vollblut.

Auch für die Cysteinprotease Cathepsin C, den Aktivator der GASPIDs, wurde unter analogen Kriterien erfolgreich ein Aktivitätsassay etabliert. Damit kann auch die pharmakologische Beeinflussung von Cathepsin C und deren Auswirkungen auf die Aktivität der GASPIDs quantifiziert werden; aktuelle klinische Studien überprüfen bereits die Wirksamkeit von Cathepsin C-Inhibitoren. In erster Linie sollen die Aktivitätsassays aber zur Quantifizierung der GASPIDs mit diagnostischer Zielsetzung eingesetzt werden, um das komplexe Proteasennetzwerk der Neutrophilen und Mastzellen bei Gesunden und Patienten zu charakterisieren.

2 Einleitung

2.1 GASPIDs

Die Granula-assoziierten Serinproteasen der Immunabwehr, kurz „GASPIDs“ (granule-associated serine proteases of immune defense), bilden eine Proteasenfamilie, die sowohl an der regelrechten Funktion des Immunsystems als auch pathophysiologisch an der Genese verschiedener Erkrankungen beteiligt ist [1]. Zu den Vertretern der GASPIDs zählen die Neutrophilen-Elastase, Cathepsin G, Proteinase 3, NSP4 sowie Chymase, Tryptase und Granzyme [2]. Diese Proteasen werden von hämatopoetischen Zellen exprimiert, wobei jeder Zelltyp ein distinktes Expressionsmuster verschiedener GASPIDs aufweist [2, 3]. GASPIDs werden hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten und Mastzellen, aber auch von Monozyten, basophilen Granulozyten, Makrophagen, natürlichen Killerzellen und zytotoxischen T-Zellen exprimiert [3]. Alle GASPIDs werden als Zymogene synthetisiert [4], während der Biogenese durch die Cysteinprotease Cathepsin C mittels Abspaltung eines Propeptids (i. d. R. zwei Aminosäuren) aktiviert [5, 6, 7] und enzymatisch aktiv in zytoplasmatischen Granula gespeichert [8, 9, 10]. Die GASPIDs verbindet ihre Eigenschaft als Serinprotease und sie gehören strukturell zur Familie der Trypsin-ähnlichen Proteasen, d. h. sie nutzen eine Serinseitenkette zur Hydrolyse ihrer Substrate [3, 11]; sie variieren jedoch in Substratpräferenz, Zielspezifität und biologischer Funktion (Tab. 2.1) [2].

2.1.1 Humane Neutrophilen-Elastase

Die humane Neutrophilen-Elastase (HNE) wird primär von neutrophilen Granulozyten, in deutlich geringerer Menge auch von Monozyten und Makrophagen exprimiert [12]. Sie ist physiologisch an der Abwehr von Erregern, insbesondere der von Bakterien, beteiligt [13]. Dazu spaltet Elastase Membranproteine oder Virulenzfaktoren und verhindert damit, dass Bakterien der Phagozytose durch das menschliche Immunsystem entkommen [14, 15]. Elastase-defiziente Mäuse brauchen deutlich länger zur Abwehr gram-negativer Bakterien (z. B. *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) und sind anfälliger für die Entwicklung einer Sepsis bzw. den Tod [16]. Elastase induziert auch die Zerstörung bzw. den Abbau extrazellulärer

Tab. 2.1: Expression, Spezifität, Funktion und pathophysiologische Bedeutung der GASIPDs.

<u>GASPID</u>	<u>Gen</u>	<u>Zellen</u>	<u>Spezifität</u>	<u>Funktion</u>	<u>Pathologie</u>
Elastase	ELANE	neutrophile Granulozyten	elastolytisch	<ul style="list-style-type: none"> • Abwehr von Bakterien • Abbau von EZM/ nekrotischem Gewebe 	<ul style="list-style-type: none"> • Lungenemphysem • zystische Fibrose • ARDS • rheumatoide Arthritis
Cathepsin G	CTSG	neutrophile Granulozyten	chymotryptisch	<ul style="list-style-type: none"> • Abwehr von Bakterien • Autoregulation lytischer Effizienz 	kein distinkter Phänotyp
Proteinase 3	PRTN3	neutrophile Granulozyten	elastolytisch	<ul style="list-style-type: none"> • Abwehr von Bakterien 	<ul style="list-style-type: none"> • Autoantigen bei Granulomatose mit Polyangiitis • Ziel autoimmuner Reaktionen bei Hepatitis C
NSP4	PRSS57	neutrophile Granulozyten	tryptisch	n. d.	n. d.
Tryptase	TPSAB1 TPSB2	Mastzellen	tryptisch	<ul style="list-style-type: none"> • Vermittlung von Entzündungsprozessen • Chemotaxis 	<ul style="list-style-type: none"> • Typ-I-Allergie • Asthma bronchiale • CED
Chymase	CMA1	Mastzellen	chymotryptisch	<ul style="list-style-type: none"> • Abwehr von Bakterien • Hydrolyse der EZM 	<ul style="list-style-type: none"> • pulmonal-arterielle Hypertonie • Arteriosklerose • immunvermittelte Lungenerkrankungen
Granzyme	GZMA GZMB GZMH GZMK GZMM	zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen	divers	<ul style="list-style-type: none"> • Apoptose-induktion insbes. virusinfizierter Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • rheumatoide Arthritis • Abstoßungsreaktionen

Matrix und vermittelt eine Gewebsnekrose [17, 18]. Dies spielt pathophysiologisch unter anderem bei der Entstehung des Lungenemphysems, der zystischen Fibrose/Mukoviszidose und der rheumatoiden Arthritis eine Rolle [19, 20, 21].

Versuche im Mausmodell deuten außerdem auf eine Beteiligung an der Autoimmungenesese des bullösen Pemphigoids hin [22].

2.1.2 Cathepsin G

Das Cathepsin G (CG) wird hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten, aber auch von Mastzellen, Monozyten und Makrophagen synthetisiert [23, 24]. Diese Protease ist unter anderem an der Abwehr von Bakterien [25], der Autoregulation der lytischen Effizienz neutrophiler Granulozyten [26] sowie der adhäsionsabhängigen Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt [27]. Bisher ist kein distinkter Phänotyp bei Defizienz von Cathepsin G bekannt. So haben Cathepsin G-defiziente Mäuse z. B. keine signifikanten Einschränkungen bei der Abwehr von Bakterien oder der regelrechten Funktion neutrophiler Granulozyten [28]. Versuche am Mausmodell deuten darauf hin, dass ein Fehlen von Cathepsin G hauptsächlich bei gleichzeitiger Elastase-Defizienz klinisch manifest wird [27, 29]. Eine Beteiligung an der Entstehung des Lungenemphysems ist deshalb wahrscheinlich [2].

2.1.3 Proteinase 3

Proteinase 3 (PR3) wird von neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert [30]. Wie die Neutrophilen-Elastase und Cathepsin G ist auch Proteinase 3 an der Abwehr bzw. der Abtötung von Bakterien beteiligt [31]. Zusätzlich spielt sie bei der posttranslationalen Modifikation von Zytokinen eine entscheidende Rolle [32]. Proteinase 3 ist das Ziel anti-neutrophiler zytoplasmatischer Antikörper (c-ANCA) bei Granulomatose mit Polyangiitis, die früher als Morbus Wegener bekannt war [33]. Ebenso fungiert Proteinase 3 als Autoantigen bei Infektionen mit dem Hepatitis C-Virus [34]. Strukturell wie auch funktional ist Proteinase 3 eng mit der Neutrophilen-Elastase verwandt [35]; beide Proteasen haben aufgrund ihrer ähnlichen Sequenz eine ähnliche Ligandenspezifität [36], was eine zuverlässige Unterscheidung der beiden Proteasen erschwert [37].

2.1.4 Tryptase

Tryptase (TPS) wird hauptsächlich von Mastzellen, zu geringen Anteilen aber auch von basophilen Granulozyten exprimiert [38]. Tryptase β macht dabei fast 25 % des

Gesamtproteins von reifen Mastzellen aus [39]. Physiologisch ist Tryptase an der Vermittlung von Entzündungsprozessen beteiligt. So wird durch Ausschüttung von Tryptase die Kapillarpermeabilität erhöht [40] und die Produktion von Bradykinin und Kininogen stimuliert [41], was letztlich zur Ödembildung führt. Zudem ist Tryptase ein wichtiger Mediator bei der Entstehung allergischer Reaktionen [42]. Autoregulatorisch wird die Mastzelle selbst durch die Wirkung von Tryptase aktiviert [43]. Eine vollständige Defizienz aller Tryptase-Isoformen ist beim Menschen bisher nicht beobachtet worden [44]; ein Tryptase-knock-out im Mausmodell führt jedoch zu einer erhöhten Sterblichkeit bei bakteriellen Infektionen (z. B. mit *Klebsiella pneumoniae*) und einer verminderten Immunantwort bei parasitären Infektionen mit *Trichinella spiralis* [44, 45]. Pathophysiologisch ist Tryptase durch den Abbau bronchodilatatorischer Substanzen wie VIP, CGRP und PHM [46, 47, 48] und Verstärkung der Histamin-Wirkung an der Bronchialmuskulatur [49] für die Entstehung von allergischem Asthma mitverantwortlich [50]. Tryptase spielt außerdem bei der Steigerung der Darmpermeabilität im Rahmen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle [51, 52]. Klinisch wird der Tryptase-Gehalt im Serum zur Verlaufskontrolle von anaphylaktischen Reaktionen oder Mastzellaktivierungssyndromen bestimmt [53].

2.1.5 Chymase

Die Protease Chymase (CHY) wird wie Tryptase von Mastzellen und zum Teil auch von basophilen Granulozyten exprimiert [54]. Funktionell ist die Chymase jedoch eng mit dem Cathepsin G neutrophiler Granulozyten verwandt: Beides sind Proteasen mit chymotryptischer Aktivität, die ihr Substrat bevorzugt carboxyterminal der Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan oder Leucin spalten [55]. Physiologisch ist die Chymase an der Abwehr von Bakterien und Parasiten sowie dem Auf- und Abbau der Extrazellulärmatrix beteiligt [9, 56]. Durch Produktion von Angiotensin II ist die Chymase außerdem wichtig für die Blutdruckregulation [57]. Pathophysiologisch begünstigt Chymase dadurch neben der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen wie pulmonaler arterieller Hypertonie oder Arteriosklerose [58, 59] auch die Entwicklung immunvermittelter Lungenerkrankungen wie Lungenfibrose und COPD [60, 61]. Untersuchungen am

Mausmodell sind für den Menschen wenig prädiktiv, da die dem Menschen ähnlichste Chymase der Maus eine elastolytische anstelle einer chymotryptischen Aktivität aufweist [62, 63]. Chymase-defiziente Mäuse zeigen jedoch eine verminderte Fähigkeit zur Abwehr insbesondere parasitärer Infektionen [64].

2.2 Cathepsin C

Cathepsin C (CatC) ist eine ubiquitär exprimierte lysosomale Cysteinprotease der Papainfamilie. Sie wird vor allem von hämatopoetischen Zellen sowie in Gewebe von Milz, Leber, Niere und Lunge stark exprimiert [65, 66]. Die Protease wird als ca. 60 kDa großes Zymogen synthetisiert und liegt nach Abspaltung eines N-terminalen Propeptids als reife Form in Tetramerstruktur vor [67]. Als Exopeptidase spaltet Cathepsin C zwei Aminosäuren vom N-terminalen Ende seiner Substrate ab und ist deshalb auch unter dem Namen Dipeptidylpeptidase I, kurz DPPI, bekannt [67]. Cathepsin C hat eine weite Substratspezifität und ist überwiegend bei leicht saurem pH-Wert aktiv [68].

Physiologisch ist Cathepsin C neben dem lysosomalen Abbau von Proteinen an der Aktivierung sämtlicher Vertreter der GASPIDs beteiligt [29, 69]. Bei einem Cathepsin C-knock-out im Mausmodell konnte folglich eine deutlich reduzierte Aktivität der GASPIDs Elastase, Proteinase 3, Cathepsin G, Tryptase sowie gar keine Aktivität von Chymase nachgewiesen werden [29, 70].

Cathepsin C-defiziente Mäuse zeigen außerdem eine erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit bei induzierter Sepsis [71] und sind weniger häufig von kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose oder Bauchortenaneurysmen betroffen [72, 73]. Hierfür werden unter anderem die durch Cathepsin C vermittelte Entzündungsantwort mittels Beeinflussung der Chemokinproduktion und Regulierung der Neutrophilen-Infiltration sowie die Aktivierung von Elastase verantwortlich gemacht [73].

Beim Menschen sind zwei Erkrankungen bekannt, die auf ein Fehlen bzw. eine verminderte Aktivität von Cathepsin C zurückzuführen sind; das Papillon-Lefèvre-Syndrom sowie das Haim-Munk-Syndrom [74, 75]. Beim autosomal-rezessiv vererbten Papillon-Lefèvre-Syndrom kommt es aufgrund einer Loss-of-Function-Mutation des Cathepsin C-Gens (CTSC) zu palmoplantarer Hyperkeratose und

chronischer Peridontitis. Teilweise weisen die Patienten außerdem eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen auf [76]; bei einigen Patienten wiederum zeigen die neutrophilen Granulozyten keine Beeinträchtigung ihrer bakteriziden Funktion [77-79]. Patienten mit dem ebenfalls autosomal-rezessiv vererbten Haim-Munk-Syndrom leiden zusätzlich an Onychogrypose, Arachnodaktylie, Akroosteolysen und einem Plattfuß [80]. Als Auslöser des Beschwerdebilds vermutet man unter anderem die ausbleibende Aktivierung der GASPIDs [76].

Da eine Reduktion der Cathepsin C-Aktivität wie beim Papillon-Lefèvre-Syndrom oder dem Haim-Munk-Syndrom nicht letal ist, stellt die Inhibition von Cathepsin C ein potentiell therapeutisches Ziel bei o. g. inflammatorischen und autoimmunen Erkrankungen dar, an deren Entstehung die GASPIDs beteiligt sind [8]. Mehrere Studien lassen jedoch darauf schließen, dass sehr hohe Level an Cathepsin C-Inhibition notwendig sind, um eine messbare Aktivitätsreduktion der GASPIDs zu erreichen [81, 82]. Hamon Y *et al.* (2016) konnten durch Versuche mit der myelomonoblastären Vorläuferzelllinie PLB-985 und der promyelozytären Vorläuferzelllinie HL-60 zeigen, dass es erst bei einer Hemmung der Cathepsin C-Aktivität von > 95 % zu einer messbaren Aktivitätsreduktion der GASPIDs kommt [82]. Aktuell wird in diesem Kontext die Wirksamkeit synthetischer Cathepsin C-Inhibitoren in mehreren klinischen und präklinischen Studien untersucht [83].

2.3 Detektion und Quantifizierung der GASPIDs

Um eine Protease bzw. insbesondere die GASPIDs nachzuweisen, gibt es drei verschiedene Detektionsmöglichkeiten: den Nachweis von RNA vs. den Nachweis des synthetisierten Proteins vs. den Nachweis der enzymatischen Aktivität.

Die RNA-Detektion wird dazu eingesetzt, die Genexpression verschiedener Zellen und Gewebe sowohl nachzuweisen als auch zu quantifizieren [84] und daraus einen molekularen „Fingerabdruck“ verschiedenster physiologischer und pathophysiologischer Prozesse zu erstellen [85, 86]. Dies ermöglicht die weiterführende Untersuchung des Zusammenspiels von Erregern und Abwehrmechanismen des Menschen sowie die Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Strategien [87]. Eine häufig genutzte Methode des RNA-

Nachweises ist die PCR. Dieses Verfahren zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus und gilt als verhältnismäßig einfach zu etablieren. Die qPCR bietet dabei sogar die Möglichkeit, die Menge an vorliegender RNA zu quantifizieren. Allerdings lassen sich durch den Nachweis der RNA keine Aussagen darüber treffen, ob und in welcher Menge das untersuchte Protein bzw. die untersuchte Protease auch wirklich synthetisiert wird.

Für den Nachweis eines synthetisierten Proteins steht eine Vielzahl chemischer und physikalischer Verfahren zur Verfügung [88]. Eine häufige Detektionsmethode ist der immunologische Nachweis der Proteine, z. B. im ELISA. Dabei wird das untersuchte Protein mithilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. Für die Quantifizierung verschiedener GASPIDs ist das ELISA-Verfahren eine häufig angewandte Methode [89, 90, 91]: So wird die Tryptasekonzentration im Serum klinisch bereits standardmäßig mithilfe des ImmunoCAP-Fluoreszenzassays bestimmt [92, 93]. Die Funktionsweise dieses Assays entspricht der eines Sandwich-ELISAs. Vorteile dieser Methode sind die insgesamt moderaten Kosten, die einfache Handhabung und die Schnelligkeit der Resultate [94]. Nachteil dieser Methode ist es jedoch, dass die Zuverlässigkeit der Ergebnisse insbesondere im Hinblick auf die Quantifizierung erheblich variiert, da die genutzten Antikörper unterschiedlich sensitiv bzw. spezifisch für ihr jeweiliges Zielprotein sind [88].

Außerdem kann bei der Detektion von Proteasen nicht zwischen deren aktiver und inaktiver (z. B. Zymogene, Protease-Inhibitor-Komplexe) Form unterschieden werden. Proteasen sind Schlüsselenzyme für eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse wie Verdauung, Wundheilung, Blutgerinnung oder Erregerabwehr [95]. Ihre Aktivität nach der Synthese unterliegt deshalb strenger Regulation [96]. Die meisten Proteasen, so auch die GASPIDs, werden als Zymogene synthetisiert und erst nach Abspaltung eines Propeptids aktiviert. Manche Proteasen benötigen zur Aktivierung außerdem die Bindung eines Co-Faktors oder eine spezifische posttranslationale Modifikation [97]. Selbst nach Aktivierung kann die Proteasenaktivität durch endogene Inhibitoren noch eingeschränkt werden [98]. Der Nachweis von mRNA oder Proteingehalt ist deshalb zur Quantifizierung von Proteasen und deren funktioneller Interpretation nur eingeschränkt sinnvoll [99].

Aktivitätsassays wiederum ermöglichen den dynamischen Nachweis von Proteasen. Die Verwendung aktivitätsbasierter Detektionsmethoden ist verhältnismäßig jung, entwickelt sich jedoch sehr rasch [97]. Für den Nachweis der Proteasenaktivität stehen sowohl natürliche als auch artifizielle Substrate zur Verfügung [100]. Bei Verwendung natürlicher Substrate kann aus der Menge an Peptidfragmenten auf die zugrundeliegende Proteasenaktivität geschlossen werden; dazu müssen diese Substratfragmente, i. e. das Degradom der jeweiligen Protease, aber zunächst isoliert, detektiert und quantifiziert werden [101]. Artifizielle Substrate hingegen ermöglichen bei Spaltung durch die Protease den direkten Signalnachweis [101]. Dazu werden häufig sogenannte AMC- oder pNA-Substrate verwendet [102]. Das AMC und das pNA sind chemische Gruppen mit nur geringer basaler Fluoreszenz bzw. Absorption; bei Substratspaltung kommt es dann zu einer detektierbaren Zunahme des Signals [103]. Solche Aktivitätsassays werden dazu verwendet, um die Aktivität einzelner GASPIDs nachzuweisen [104, 105, 106, 107]. Allerdings wird diese Methode aktuell noch nicht mit dem Schwerpunkt eingesetzt, die Menge an enzymatisch aktiver Protease auch zu quantifizieren.

2.4 Zielsetzung und geplantes Vorgehen

GASPIDs spielen eine zentrale Rolle bei der regelrechten Funktion des Immunsystems sowie der Entstehung verschiedener Erkrankungen. Dabei ist nicht die Expression oder die Anwesenheit der Proteasen für den Ablauf dieser Prozesse maßgeblich, sondern ihr Vorliegen in enzymatisch aktiver Form [8, 97]. Bisher gibt es keine Studien, in denen die Menge mehrerer GASPID-Vertreter von neutrophilen Granulozyten und Mastzellen mithilfe von Aktivitätsmessungen quantifiziert wird. Im Rahmen der Arbeit sollen deshalb aktivitätsbasierte Assays für die Quantifizierung der GASPIDs Neutrophilen-Elastase, Cathepsin G, Proteinase 3, Tryptase und Chymase sowie für deren Aktivator Cathepsin C entwickelt werden. Dazu sollen mithilfe von isolierten bzw. rekombinant hergestellten Proteasen prototypische Assays aufgestellt werden, welche hinsichtlich verschiedener Kriterien wie Selektivität, Spezifität und Interferenz validiert werden. Anschließend soll die Frage geklärt werden, ob die Aktivität oben genannter GASPIDs mithilfe der Assays auch im Zelllysate verschiedener Granulozyten- und Mastzelllinien reliabel detektierbar und sogar quantifizierbar ist. Die Plausibilität der daraus gewonnenen Ergebnisse

soll auch durch Verwendung anderer Detektionsmethoden wie Western Blot überprüft werden.

Abschließend soll die Frage geklärt werden, ob die im Rahmen der Arbeit entwickelten Assays prinzipiell dazu geeignet sind, die Aktivität der GASPIs auch im Lysat aus menschlichen Blutproben isolierter neutrophiler Granulozyten zu detektieren und zu quantifizieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Autoklav LTA 400	Zirbus, Bad Grund
CASY-1-Zellzählgerät	Schärfe System, Reutlingen
CO ₂ -Inkubator	Binder, Tuttlingen
Eismaschine AF 10	Scotsman, Vernon Hills, USA
Flachbettscanner Epson Perfection V500	Seiko Epson Corporation, Suwa, Nagano, Japan
<i>Gefriergeräte und Kühlschränke</i>	
Gefriergerät LGex 3410 MediLine	Liebherr, Biberach a. d. Riß
Gefriertruhe GTS 6112	Liebherr, Biberach a. d. Riß
Kühl-Gefriergerät KGE 3613	Bosch, Stuttgart
Ultratiefkühlschrank HERAfreeze HFU T	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Heißlufttrockner „Foen 1200“	AEG, Frankfurt am Main
Inverses Phasenkontrastmikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg
MACSiMAG Separator	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA-Werke, Staufen im Breisgau
Metallblock-Thermostat Typ 2101	Bachhofer, Reutlingen
Multimode Microplate Reader Safire II	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
pH-Meter inoLab	WTW, Weilheim
Pierce Fast Semi-Dry Blotter	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Pipetten (Ein- u. Mehrkanal)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (Mehrkanal)	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf, Hamburg
Präzisions-Digitalthermometer GMH 1170	Greisinger, Regenstauf
Präzisionswaage Modell 2842	Sartorius, Göttingen
Sicherheitswerkbank SterilGard	The Baker Company, Sanford, USA
Stickstoff-Kryotank Arpege 140	Air Liquide Medical, Düsseldorf
Superfrost Plus Adhäsionsobjektträger	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Thermomixer C	Eppendorf, Hamburg

Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortexmischer MS1 Minishaker	IKA-Werke, Staufen im Breisgau
Wasserbad-Thermostat Typ 3193	Hecht Assistent, Sondheim v. d. Rhön
XCell SureLock Mini-Cell Elektrophoresesystem	Invitrogen, Life Techn., Darmstadt
<i>Zentrifugen</i>	
Tischzentrifuge Centrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Varifuge 3. OR	Heraeus, Hanau
Zyto-System: Rotofix 32 mit Zyt rotor	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen
Zyto-System Gehänge (1660)	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen
Zyto-System Spannplatte mit Ring (1662)	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Casy Cups	OLS OMNI Life Science, Bremen
Sterile Filtereinheit	Whatman GmbH, Dassel
Messzylinder	Brand, Wertheim
Mikrotiterplatten 96-well f-form BRANDplates	Brand, Wertheim
Mikrotiterplatten 96-well f-form Costar, schwarz	Corning, New York, USA
Monovetten EDTA, groß	Sarstedt, Nümbrecht
Perfusionsspritze Luer Lock 50 ml	BD Biosciences, San Jose, USA
Pipettenspitzen (10, 100, 200 µl)	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswischtücher Kimtech	Kimberly-Clark, Dallas, USA
Reagenzgefäß (versch. Größen)	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim
Reaktionsgefäß (versch. Größen)	Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Hamburg
Reaktionsreservoir Costar 50 ml	Corning, New York, USA
Serologische Pipetten (1, 5, 10, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Tissue Culture Flask 75	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen Suspen. T75	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhren (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zyto-System: Zytokammern 4 x 1 ml (1668)	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen

3.1.3 Kit-Systeme

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
MACSxpress Whole Blood Neutrophil Isolation Kit, human	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

3.1.4 Enzyme

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Cathepsin C, Type X, bovine spleen, C8511	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cathepsin G, Human Neutrophil, 16-14-030107	Athens Research & Technology, Athens, USA
Chymase, rekombinant, C8118	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Elastase, Human Neutrophil, 324681	Merck, Darmstadt
Proteinase 3, ML734	Elastin Products Company, Owensville, USA
Tryptase β , rekombinant	AG Sommerhoff, München

3.1.5 Substrate

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Abz-VADnVADYQ-EDDnp	N. Schaschke, Universität Aalen
Abz-VADnVRDRQ-EDDnp, 3232-v	PeptaNova, Sandhausen
H-GF-AMC, I-1220	Bachem, Bubendorf, Schweiz
H-GR-AMC, I-1215	Bachem, Bubendorf, Schweiz
MeOSuc-AAPV-AMC, I-1270	Bachem, Bubendorf, Schweiz
MeOSuc-AAPV-pNA, 324696	Merck, Darmstadt
N-(p-Tosyl)-GPK-pNA, T6140	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-Suc-AAPF-pNA, S7388	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-Suc-LLVY-AMC, S6510	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Suc-AAA-pNA, 3071-v	PeptaNova, Sandhausen
Suc-AAPF-AMC, I-1465	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Suc-AVPF-pNA, L-1625	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Suc-VPF-pNA, L-1755	Bachem, Bubendorf, Schweiz
tos-GPK-AMC, I-1370	Bachem, Bubendorf, Schweiz
tos-GPR-AMC, I-1365	Bachem, Bubendorf, Schweiz
tos-GPR-pNA, T6140	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
7-Amino-4-methylcoumarin (AMC)	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.6 Inhibitoren

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Aprotinin from bovine lung, A4529	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cathepsin G-Inhibitor, ab141281	Abcam Biochemicals, Berlin

DJ-72	N. Schaschke, Universität Aalen
HR-57	N. Schaschke, Universität Aalen
Sivelestat, S7198	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.7 Zellkultur

3.1.7.1 Zelllinien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Humane Leukämiezelllinie HL-60	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Humane Mastzelllinie HMC-1	Dr. J. H. Butterfield, Mayo Clinic, Rochester, USA
Humane Mastzelllinie LUVA	Kerafast, Boston, USA
Humane Monozyten-Zelllinie U937	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Humane Fibrosarkomzelllinie HT-1080	AG Sommerhoff, München

3.1.7.2 Kulturmedien und Zusätze

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Fetal Calf Serum (FCS) Gold	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isocove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) with L-Glutamine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI-1640 Medium with L-Glutamine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1-Thioglycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
StemPro-34 SFM, Gibco	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamine 200 mM (100X), Gibco	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Primocin	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Minimum Essential Medium Eagle (EME) with Earle's Balanced Salts with 2.0 mM L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Accutase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.8 Puffer und Lösungen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Aqua ad iniectabilia	Berlin-Chemie, Berlin
CASYton, isotonischer Messpuffer	OLS OMNI Life Science, Bremen

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (mit CaCl ₂ und MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (ohne CaCl ₂ und MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.8.1 Assaypuffer

<u>Bezeichnung</u>	<u>Zusammensetzung</u>
AP-CC (Assaypuffer Cathepsin C)	25 mM MES, 50 mM NaCl, 0,2 % Igepal (Nonidet P-40), 0,01 % Na-Azid, pH 6,0, vor Verwendung mit 5 mM DTT versetzt
AP-M (Assaypuffer Cathepsin G, Chymase, Elastase, Proteinase 3)	100 mM TRIS, 1 M NaCl, 0,01 % Tween, 0,01 % Na-Azid, pH 7,5
AP-T (Assaypuffer Tryptase)	50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0,01 % Na-Azid, 0,01 % Triton X-100, pH 7,6, vor Verwendung mit Heparin 50 µg/ml versetzt

3.1.8.2 Lysepuffer

<u>Bezeichnung</u>	<u>Zusammensetzung</u>
LP-D	100 mM TRIS, 1 M NaCl, 0,1 % Tween, 0,01 % Na-Azid, pH 7,4

3.1.8.3 Neutrophilen-Resuspensionspuffer

<u>Bezeichnung</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Neutrophilen-Resuspensionspuffer	PBS mit CaCl ₂ und MgCl ₂ , 1 g/l Glucose

Alle Puffer (mit Ausnahme des Neutrophilen-Resuspensionspuffers) wurden vor Zugabe von Detergenz, DTT oder Heparin durch eine 0,2 µm Filtereinheit steril filtriert.

3.1.9 Materialien und Substanzen für SDS-PAGE und Western Blot

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Magic Mark XP Western Protein Standard	Novex, Life Technologies, Darmstadt
Pierce Blue Protein Molecular Weight Marker Mix	Thermo Scientific, Schwerte

Elektrophorese-Gradientengele 4 - 20 %
 TRIS-Glycin (12 Bahn) Anamed, Darmstadt

3.1.10 Antikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Kaninchen anti-Tryptase β IgGy	AG Sommerhoff, München
Kaninchen anti-Chymase Antikörper, ab186417	Abcam Biochemicals, Berlin
Kaninchen anti-Cathepsin G Antikörper, ab49854	Abcam Biochemicals, Berlin
Kaninchen anti-Elastase Antikörper, ab126154	Abcam Biochemicals, Berlin
Maus anti-Proteinase 3 IgG, MAB6134	R & D Systems, Minneapolis, USA
Ziege anti-Kaninchen IgG, ab97080	Abcam Biochemicals, Berlin
Ziege anti-Maus IgG, 115-035-062	Dianova, Hamburg

3.1.11 Software

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
ImageJ	Wayne Rasband, NIH, USA
Office	Microsoft, Redmond, USA
ProFit Version 6.2.16	Quantum Soft, Uetikon am See, Schweiz
Prism Version 5	GraphPad Software, San Diego, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Um die enzymatische Aktivität der GASPIDs und von Cathepsin C zu quantifizieren, wurden verschiedene Peptidsubstrate verwendet, i. e. fluorogene Aminomethylcoumarin (AMC)-Substrate, chromogene para-Nitroanilin (pNA)-Substrate und fluorogene Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Substrate. Das fluoreszierende AMC und chromogene NA werden durch Spaltung des Substrats durch das jeweilige Enzym freigesetzt. An FRET-Substrate sind zwei fluorophore Gruppen gekoppelt, der sog. Donor und der Akzeptor; nach Substratspaltung und damit Verlust der kovalenten Bindung von Donor und Akzeptor bleibt der Energieaustausch aus und die Fluoreszenz des Donorfarbstoffs kann gemessen werden.

In 96-Well-Mikrotiterplatten wurde Assaypuffer vorgelegt und 50 μ l rekombinant hergestellte bzw. isolierte Protease (in Assaypuffer, vierfach konzentriert) oder die benötigte Menge Zellysat (s. Kapitel 3.2.2.2) zugegeben. Die Platten wurden etwa zehn Minuten im Wärmeblock bei 37 °C temperiert. Bei Verwendung von Inhibitoren wurden zusätzlich 50 μ l des vierfach konzentrierten Inhibitors zugegeben und die Proben eine weitere Stunde im Wärmeblock bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 50 μ l vierfach konzentriertem Substrat in Assaypuffer (Endvolumen im Well: 200 μ l) wurde unverzüglich die Aktivitätsmessung im *Microplate Reader Safire II* gestartet. Auf allen Platten wurden Kontrollen, die nur Assaypuffer, Assaypuffer + Substrat oder eine AMC-Verdünnungsreihe in jeweiligem Assaypuffer enthielten, mitgeführt. Bei Verwendung von AMC-Substraten erfolgte die Messung in schwarzen Platten über 30 Zyklen (entsprechen zwölf Minuten) mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{Ex} = 360$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{Em} = 465$ nm bei einer Temperatur von 37 °C. Der über die Zeit gemessene Fluoreszenzanstieg entspricht der enzymatischen Aktivität, die in der Einheit RF/min angegeben wird.

Bei Verwendung von FRET-Substraten erfolgte die Messung in schwarzen Platten über 50 Zyklen (entsprechen hier zehn Minuten) mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{Ex} = 320$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{Em} = 420$ nm bei einer Temperatur von 37 °C. Analog zu AMC-Substraten entspricht auch hier der Fluoreszenzanstieg über die Zeit der enzymatischen Substratspaltung und wird ebenfalls in der Einheit RF/min angegeben.

Bei Verwendung von pNA-Substraten erfolgte die Messung in durchsichtigen Platten über 50 Zyklen (entsprechen etwa zehn Minuten) mit einer Absorptionswellenlänge von $\lambda = 405$ nm bei einer Temperatur von 37 °C. Hier entspricht der über die Zeit gemessene Anstieg der optischen Dichte der enzymatischen Spaltung des Substrats. Diese wird in der Einheit $m\Delta OD/min$ angegeben.

3.2.2 Zellkultur

Sämtliche Zellkultur-Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank ausgeführt. Die eingesetzten Kulturmedien wurden vor Verwendung im Wasserbad auf eine Temperatur von 37 °C erwärmt.

3.2.2.1 Zellkultivierung

Die humanen Neutrophilen-Vorläuferzelllinien U937 und HL-60 wurden in RPMI-1640-Medium mit L-Glutamin und 10 % hitzeinaktiviertem FCS in einem CO₂-Inkubator (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) steril kultiviert. Unter analogen Bedingungen wurde die humane Mastzelllinie HMC-1 in IMD-Medium mit 1,2 mM Monothioglycerol und 10 % hitzeinaktiviertem FCS kultiviert. Für die humane Mastzelllinie LUVA wurde StemPro-34 SFM-Medium (500 ml) mit 2 mM L-Glutamin, 50 mg Primocin, und 10 000 U/ml PenStrep verwendet. Die humane Fibroblasten-Zelllinie HT-1080 wurde in EME-Medium mit 2 mM L-Glutamin, 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat und 10 % hitzeinaktiviertem FCS kultiviert.

Die Stammkulturen aller Zelllinien wurden zweimal wöchentlich passagiert. Dazu wurden zunächst aus der Stammkultur 30 µl Zellsuspension entnommen und in ein Messgefäß mit 6 ml Casyton-Messflüssigkeit gegeben. Zur Ablösung der adhären HT-1080-Zellen wurde vor jeder Verwendung das Medium der HT-1080-Kulturen entfernt und die Kulturen mit 5 - 10 ml PBS ohne CaCl₂ und MgCl₂ gewaschen. Nach Zugabe von 1 - 2 ml Accutase wurden die Kulturen zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die abgelösten Zellen anschließend in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Dichte der Zellen und als Vitalitätsmaß zusätzlich die Zellgröße im CASY-1-Zellzählgerät gemessen. Zur Passagierung der Zellsuspension und Reduktion der Zelldichte wurde der Stammkultur ein Teil der Zellsuspension entnommen und diese Zellsuspension in neuen, sterilen T75-Flaschen mit frischem Nährmedium aufgefüllt. Die Zelldichte wurde dabei aufgrund verschiedener Verdopplungszeiten der Zelllinien auf 0,5 - 1 x 10⁵ Zellen pro ml für U937 und HL-60 Zellen, 2 - 4 x 10⁵ Zellen pro ml für HMC-1 und LUVA Zellen sowie 1 x 10⁵ Zellen pro ml für HT-1080 Zellen eingestellt. Die Zellzahlen wurden so gewählt, dass eine maximale Zelldichte von 1 x 10⁶ Zellen pro ml während der Kultivierung bei keiner der Zelllinien überschritten wurde.

3.2.2.2 Herstellung von Zelllysate

Um Zelllysate der verwendeten Zelllinien zu gewinnen, wurde zunächst die Zelldichte der jeweiligen Zellkulturen im CASY-1-Zellzählgerät gemessen. Unter Berücksichtigung der für den Versuchstag benötigten Zellzahlen wurde eine

entsprechende Menge Zellsuspension entnommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Um die Proben aufzureinigen und vom Nährmedium zu befreien, wurden die Proben für zehn Minuten bei 400 x g und 6 °C zentrifugiert. Nach Abschütten des Überstandes wurde das Reaktionsgefäß je nach Größe mit 1 - 5 ml PBS ohne CaCl₂ und MgCl₂ aufgefüllt und dieser Waschschrift zwei weitere Male wiederholt. Nachdem der PBS-Überstand ein drittes Mal verworfen wurde, wurde das Reaktionsgefäß mit Lysepuffer versetzt. Die Menge an Lysepuffer richtete sich dabei nach der entnommenen Zellzahl, um eine Lysatkonzentration von je 1 000 Zellen/µl zu erhalten. Es folgte das Vortexen der Reaktionsgefäße auf höchster Stufe (2 500 Umdrehungen/min) für eine Minute. Nach fünfminütiger Inkubation bei 4 °C wurde das Vortexen wiederholt und die Gefäße für weitere fünf Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Vortexen für eine Minute wurden die Gefäße zehn Minuten bei 2.300 x g und 6 °C zentrifugiert, um das Lysat von Zelldebris zu befreien. Die oberen drei Viertel des Probenvolumens wurden ohne Verwirbelungen in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das Reaktionsgefäß einige Sekunden auf Mikrotiterstufe gevortext und kurz anzentrifugiert. Nach einer Ruhephase von zehn Minuten unter Raumtemperatur war das gewonnene Lysat verwendungsbereit.

3.2.3 Gelelektrophorese und Western Blot

3.2.3.1 Probenvorbereitung

Um Proben für die Durchführung von Gelelektrophorese und Western Blot zu gewinnen, wurden rekombinant hergestellte bzw. isolierte Proteasen der GASPIDs und von Cathepsin C sowie Zelllysate aller verwendeten Zelllinien (Konzentration: 10 000 Zellen/µl Lysat) zu gleichen Anteilen mit zweifach konzentriertem Probenpuffer mit DTT versetzt. Zur Denaturierung wurden die Proben zehn Minuten auf 95 °C erhitzt und nach dem Abkühlen bei 14 000 x g für eine Minute zentrifugiert.

3.2.3.2 Gelelektrophorese

Um die Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit 4 - 20 % Tris/Glycin-Gradientengel durchgeführt. Dazu

wurden je 20 µl der vorbereiteten Lysatproben oder der rekombinanten bzw. isolierten Proteasen als Kontrolle in die Geltaschen gegeben. Als Größenstandard wurden je 5 µl „Magic Mark XP Western Protein Standard“ und „Pierce Blue Protein Molecular Weight Marker Mix“ mitgeführt. Alle Proben wurden bei 225 Volt über 45 Minuten elektrophoretisch getrennt und das Gel anschließend für zehn Minuten in ddH₂O gewaschen.

3.2.3.3 Western Blot und Immunodetektion

Um die Proteasen immunologisch nachzuweisen, wurden unter Verwendung des Pierce Fast Semi-Dry Blotters Western Blots angefertigt. Dazu wurden die mittels SDS-Gel aufgetrennten Proben bzw. Proteine über zehn Minuten bei 25 Volt auf eine PVDF-Membran überführt.

Es folgte die Blockierung der PVDF-Membran für eine Stunde in PBST mit 5 % Milchpulver, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Anschließend wurde die PVDF-Membran in PBST mit dem jeweiligen Primärantikörper bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Zur Entfernung nicht-gebundener Antikörper wurde die PVDF-Membran dreimal für je fünf Minuten in PBST gewaschen. Danach wurde die PVDF-Membran mit dem

Tab. 3.2.3: Zur Immunodetektion verwendete Antikörper und deren Endkonzentration.

<u>GASPID</u>	<u>Primärantikörper</u>	<u>Sekundärantikörper</u>
Elastase	Kaninchen anti-Elastase, polyklonal 1 : 2 000	Ziege anti-Kaninchen, polyklonal 1 : 25 000
Cathepsin G	Kaninchen anti-Cathepsin G, polyklonal 1 : 1 000	Ziege anti-Kaninchen, polyklonal 1 : 25 000
Proteinase 3	Maus anti-Proteinase 3, monoklonal 1 : 500	Ziege anti-Maus, polyklonal 1 : 25 000
Tryptase	Kaninchen anti-Tryptase β, polyklonal 1 : 10 000	Ziege anti-Kaninchen, polyklonal 1 : 25 000
Chymase	Kaninchen anti-Chymase, monoklonal 1 : 5 000	Ziege anti-Kaninchen, polyklonal 1 : 25 000

Sekundärantikörper ebenfalls bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Die für jede Protease verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und ihre jeweilige Endkonzentration sind in Tab. 3.2.3 aufgeführt.

Zur Detektion Antikörper-gebundener Proteine wurde nach Zugabe von „Pierce ECL Western Blotting Substrat“ ein Chemilumineszenz-Film gemäß Herstellerangaben für etwa eine Minute auf die Membran gelegt, belichtet und entwickelt.

3.2.4 Isolation humaner neutrophiler Granulozyten

Um humane neutrophile Granulozyten zu gewinnen, wurden anonymisierte EDTA-Blutproben verwendet (Ethik-Antrag „Irreversibel anonymisierte Blutspenden zur Isolierung von Leukozyten für in vitro-Untersuchungen“, Projekt-Nr.: 018-09). Von allen Proben wurde zur Gewährleistung einer ausreichenden Probenqualität zunächst ein Blutausschlag und ein kleines Blutbild angefertigt. Aus den Vollblutproben wurden dann die neutrophilen Granulozyten mithilfe des „MACSxpress Whole Blood Neutrophil Isolation Kit“ von Miltenyi Biotec gemäß Herstellerangaben isoliert. Um die Reinheit des gewonnenen Isolats zu überprüfen, wurde ein Zytospin angefertigt. Dazu wurden 200 µl der isolierten, in Neutrophilen-Resuspensionspuffer resuspendierten Granulozyten mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro ml auf einen Objektträger gegeben und im Zytospin Rotofix 32 für zehn Minuten bei 500 rpm zentrifugiert. Nach anschließendem Lufttrocknen und Einfärben der Proben wurden diese unter einem Lichtmikroskop analysiert.

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die in Neutrophilen-Resuspensionspuffer resuspendierten Granulozyten wie oben beschrieben (s. Kapitel 3.2.2.2) lysiert.

3.2.5 Statistische Methoden und Berechnungen

3.2.5.1 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mithilfe der Programme Prism Version 5 (GraphPad Software, San Diego, USA) und ProFit Version 6 (Quantum Soft, Uetikon am See, Schweiz) ausgewertet. Zur graphischen Darstellung wurden mithilfe dieser Programme jeweils Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet.

Die Versuche zur Assayentwicklung und -validierung wurden mindestens dreimal an unterschiedlichen Tagen durchgeführt ($n \geq 3$ unabhängige Experimente). Zusätzlich wurden bei allen Experimenten technische Triplikate mitgeführt. In der Pilotstudie wurden die Proben von drei Probanden untersucht (n_1, n_2, n_3), wobei von jeder Probe mindestens technische Triplikate mitgeführt wurden.

3.2.5.2 Sensitivität der Aktivitätsassays

Die analytische Sensitivität oder Nachweisgrenze eines Assays wurde als kleinste experimentell verwendete Konzentration einer Protease, i. e. des Analyten, festgelegt, deren Messwerte sich statistisch signifikant von den Messwerten der immer mitgeführten Leerwerte (Mediumkontrollen) unterscheiden. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde ein t-Test verwendet.

3.2.5.3 Quantifizierung der Proteasen mittels Aktivitätsassay

Die Aktivität der Proteasen wurde als Substratspaltung bzw. Freisetzung des Fluorophors oder Chromophors pro Zeit in der Einheit RF/min für AMC- und FRET-Substrate bzw. $m\Delta OD/min$ für pNA-Substrate gemessen. Die Konzentration des freigesetzten Fluorophors AMC wurde mithilfe einer AMC-Standardkurve, welche bei jedem Versuch mitgeführt wurde, die des gespaltenen FRET-Substrats durch den Vergleich mit dem vollständig gespaltenen Substrat und die des freigesetzten Chromophors Nitroanilin über das Lambert-Beersche-Gesetz ermittelt. Daraus ergibt sich die analoge Darstellung der Aktivität in nM AMC/min, μM FRET/min bzw. μM NA/min.

Im Aktivitätsassay wurden jeweils verschiedene Konzentrationen der Proteasenstandards eingesetzt und die Daten anschließend mithilfe einer Regressionsgeraden graphisch dargestellt und ausgewertet (vgl. Abb. 4.2.3). Die Steigung dieser Geraden entspricht der Aktivität pro nM Protease. Die Molarität lässt sich unter Berücksichtigung des Molekulargewichts der Proteasen sowie des Assayvolumens von 200 μl pro Well alternativ als Menge der Protease in pg ausdrücken. Analog dazu wurden Aktivitätsmessungen unter Einsatz verschiedener Zellzahlen des Zelllysats durchgeführt. Die Steigung dieser Regressionsgeraden entspricht der Aktivität pro Zelle. Durch den Vergleich bzw. das Verhältnis beider Steigungen lässt sich die Aktivität pro Zelle in pg Protease berechnen.

3.2.5.4 Quantifizierung der Proteasenmenge im Western Blot

Zur semiquantitativen Auswertung der Western Blots wurden die entwickelten PVDF-Membranen zunächst als Graustufenbild mithilfe eines Flachbettscanners (Epson Perfection V500) eingescannt. Anschließend wurden die Graustufenbilder mithilfe der Densitometrie- und Gelauswertungsfunktion des Programms ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA) ausgewertet. Die Proteasenmenge in der Probe wurde dabei durch den Vergleich mit den jeweils mitgeführten Mengenstandards der jeweiligen Protease berechnet. Die Proteasenmenge pro Zelle berechnet sich aus der Menge der Protease in der Probe dividiert durch die Zahl der lysierten Zellen in der Probe (je 200 000 Zellen pro Probe).

4 Ergebnisse

4.1 Assayentwicklung

Um Assays zur Quantifizierung der enzymatischen Aktivität der GASPIDs Elastase, Proteinase 3 und Cathepsin G neutrophiler Granulozyten sowie Tryptase und Chymase der Mastzellen zu entwickeln, wurden zunächst verschiedene Peptidsubstrate auf ihre Eignung hin untersucht. Anschließend wurden prototypische Assays aufgestellt und diese Assays schließlich hinsichtlich verschiedener Eigenschaften wie Sensitivität, Selektivität und Spezifität charakterisiert.

4.1.1 Identifizierung geeigneter Substrate

Um zu überprüfen, welche Substrate geeignet sind, um die enzymatische Aktivität der GASPIDs zu detektieren, wurden für jede der fünf Proteasen kommerziell verfügbare Substrate, die in der Literatur als sensitiv oder selektiv beschrieben wurden oder zumindest als Substrat relevant erschienen (Abb. 4.1.1), untersucht. Die Substrate unterscheiden sich dabei sowohl hinsichtlich ihrer Peptidsequenz als auch ihrer Abgangsgruppe und damit der zur Detektion verwendeten Methode; die Spaltung der AMC- und FRET-Substrate wird fluorometrisch, die der pNA-Substrate photometrisch verfolgt. Mit diesen Substraten wurde die Spaltung durch isolierte (Elastase, Cathepsin G, Proteinase 3) bzw. rekombinant hergestellte (Chymase, Tryptase) Proteasen in vier verschiedenen Konzentrationen untersucht (Abb. 4.1.1). Die Enzymkonzentrationen, die geeignet sind, um während der Messung ca. 10 % des Substrats zu spalten, waren in Vorversuchen ermittelt worden.

Für die Messungen wurde die jeweilige Protease in vier verschiedenen Konzentrationen in Assaypuffer (s. Kapitel 3.2.1 u. Tab. 4.1.2) in einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt. Nach Zugabe der Substrate (10 μM bei AMC- und FRET-Substraten bzw. 200 μM bei pNA-Substraten) wurde die Aktivität bei 37 °C mithilfe eines Fluorometers/Photometers (*Tecan Safire II*) gemessen. Dazu wurde die Spaltung der AMC-Substrate bei einer Exzitationswellenlänge von 360 nm und Emissionswellenlänge von 405 nm über zwölf Minuten, die der FRET-Substrate bei 320 nm bzw. 420 nm über zehn Minuten und die der pNA-Substrate durch Messung

der Absorption bei 405 nm über zehn Minuten verfolgt. Die Konzentration des freigesetzten AMC's wurde mithilfe einer AMC-Standardkurve, die des gequenchten FRET-Substrats durch den Vergleich mit dem vollständig gespaltenen Substrat und die des freigesetzten Nitroanilins über das Lambert-Beersche-Gesetz ermittelt.

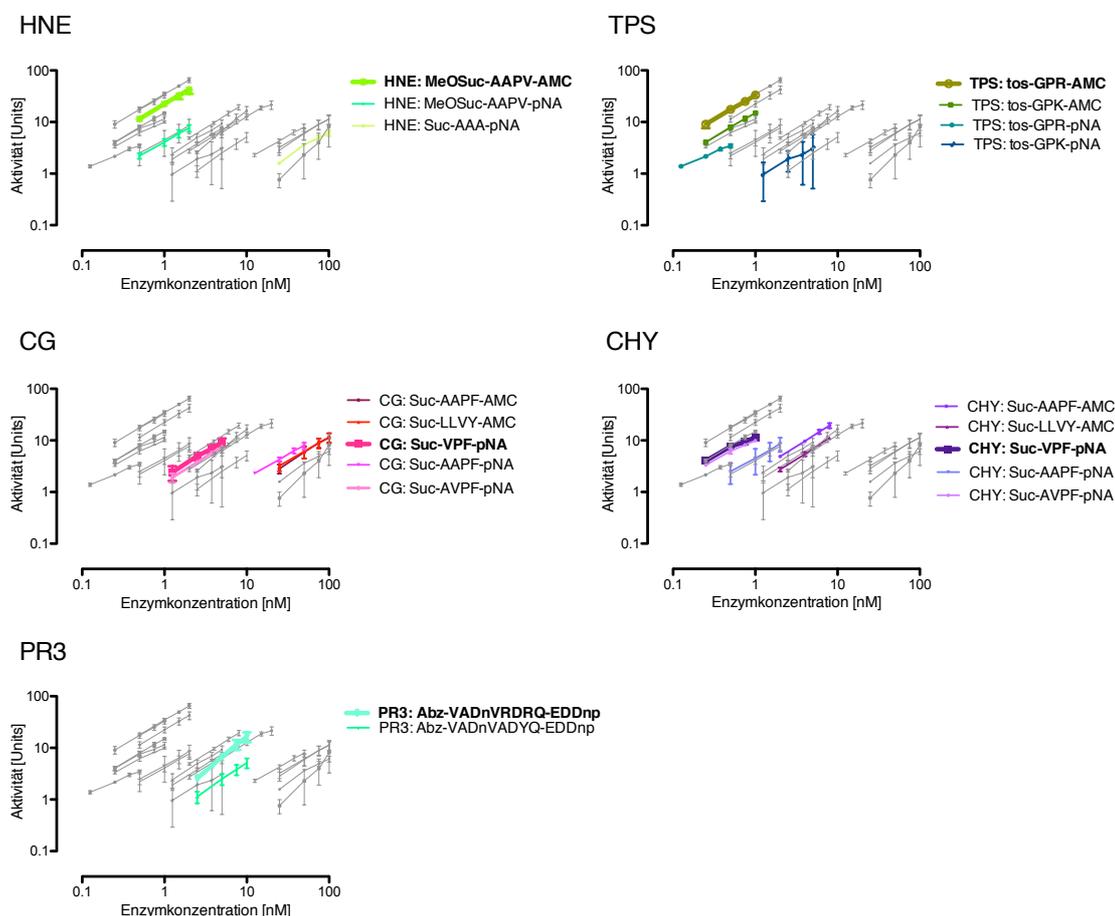


Abb. 4.1.1: Spaltung chromogener und fluorogener Peptidsubstrate durch GASPIDs. Die Spaltung der Substrate, die als sensitiv oder spezifisch für GASPIDs beschrieben wurden, wurde bei vier Enzymkonzentrationen quantifiziert. Die Zunahme der Absorption (pNA-Substrate, 200 μ M) bzw. der Fluoreszenz (AMC- und FRET-Substrate, 10 μ M) wurde im Photometer bzw. Fluorometer über die Zeit (zehn bis zwölf Minuten) verfolgt. Mittelwert \pm SD, $n \geq 3$.

Insgesamt wurden 19 verschiedene Substrat-/Enzymkombinationen überprüft. Wie aufgrund der Literatur zu erwarten, wurden alle Substrate von ihrer jeweiligen Zielprotease gespalten. Darüber hinaus ist die Substratspaltung linear von der Enzymkonzentration abhängig. Damit sind alle überprüften Substrate prinzipiell geeignet, die Aktivität der eingesetzten GASPIDs zu detektieren. Allerdings unterscheiden sich die überprüften Substrate hinsichtlich ihrer Sensitivität um bis zu

drei Dekaden. Dies ist sowohl durch die Peptidsequenzen als auch durch die unterschiedlichen Detektionsmethoden bedingt. Die fluorogenen Substrate MeoSuc-AAPV-AMC und tos-GPR-AMC sowie das chromogene Suc-VPF-pNA detektieren Elastase, Tryptase bzw. Chymase in Konzentrationen < 1 nM. Suc-VPF-pNA detektiert Cathepsin G und die gequenchten Substrate Proteinase 3 jeweils in einem Bereich von 1 - 10 nM. Obwohl die Spaltung fluorogener AMC-Substrate typischerweise sensitiver nachgewiesen werden kann, können Cathepsin G und Chymase durch die chromogenen Substrate Suc-VPF-pNA und Suc-AVPF-pNA im Vergleich zum fluorogenen Suc-AAPF-AMC in mindestens um den Faktor zehn niedrigerer Konzentration detektiert werden. Cathepsin G und Chymase – Proteasen mit ähnlicher chymotryptischer Aktivität – spalten alle eingesetzten Substrate mit ähnlicher Aktivität; zur Unterscheidung beider Proteasen müssen deshalb z. B. spezifische Inhibitoren herangezogen werden (s. Kapitel 4.1.5).

Für jede der GASPIDs wurde das jeweils sensitivste Substrat für die weitere Assayentwicklung ausgewählt (Tab. 4.1.1); für Cathepsin G und Chymase wurde neben dem chromogenen Suc-VPF-pNA auch das fluorogene Substrat Suc-AAPF-AMC weiterverfolgt. Dies diente der Überprüfung, ob eine homogene Assayentwicklung mit ausschließlich fluorogenen Substraten für alle GASPIDs möglich ist.

Tab. 4.1.1: Für die weitere Assayvalidierung ausgewählte Substrate. Für alle GASPIDs wurde das sensitivste fluorogene Substrat ausgewählt. Außerdem wurde das chromogene Substrat Suc-VPF-pNA weiter untersucht, da es deutlich sensitiver als das fluorogene Suc-AAPF-AMC ist.

<u>GASPID</u>	<u>Ausgewähltes Substrat</u>	<u>Sensitivität</u>
Elastase	MeOSuc-AAPV-AMC	< 0,5 nM
Cathepsin G	Suc-AAPF-AMC Suc-VPF-pNA	< 25 nM < 1,25 nM
Proteinase 3	Abz-VADnVRDRQ-EDDnp	< 2,5 nM
Tryptase	tos-GPR-AMC	< 0,25 nM
Chymase	Suc-AAPF-AMC Suc-VPF-pNA	< 2 nM < 0,25 nM

4.1.2 Einfluss der Substratkonzentration

Im nächsten Schritt der Assayentwicklung wurde der Einfluss der Substratkonzentration auf die Aktivitätsmessung überprüft. Dazu wurde die

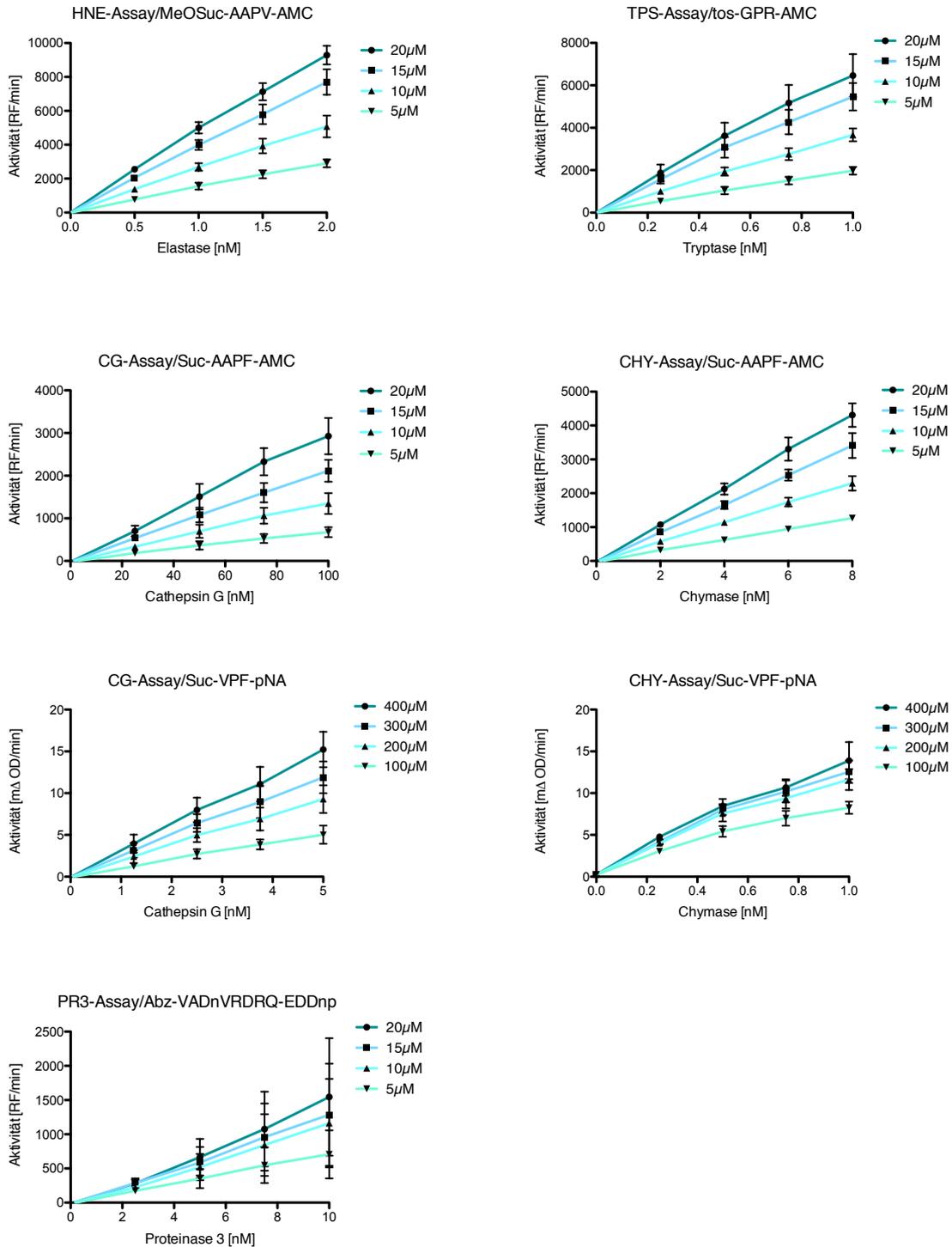


Abb. 4.1.2: Einfluss der Enzymkonzentration auf den Aktivitätsassay. Die Spaltung ausgewählter Substrate durch die GASPIDs wurde bei vier Enzym- und vier Substratkonzentrationen quantifiziert. Darstellung in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration. Mittelwert \pm SD, $n \geq 3$.

Spaltung der ausgewählten Substrate (Tab. 4.1.1) bei vier Enzym- und vier Substratkonzentrationen untersucht. Die fluorogenen Substrate wurden in

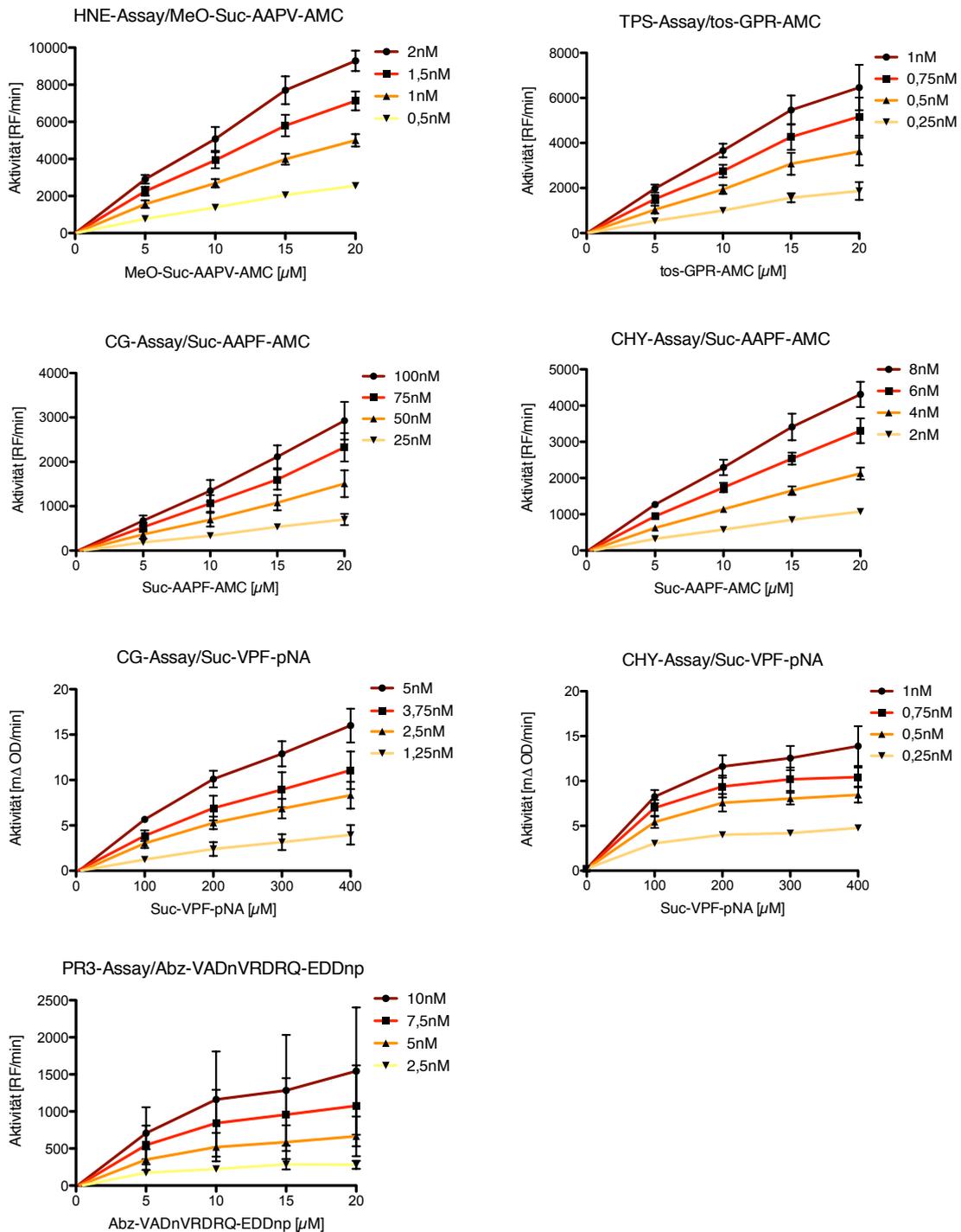


Abb. 4.1.3: Einfluss der Substratkonzentration auf den Aktivitätsassay. Die Spaltung ausgewählter Substrate durch die GASPIDs wurde bei vier Enzym- und vier Substratkonzentrationen quantifiziert. Darstellung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Mittelwert \pm SD, $n \geq 3$.

Konzentrationen von 5 - 20 μM , die chromogenen Substrate von 100 - 400 μM eingesetzt.

Die über die Spaltung der Substrate gemessene Aktivität aller GASPIDs ist weitgehend linear abhängig von der Enzymkonzentration bei allen Substratkonzentrationen (Abb. 4.1.2). Bei der im weiteren Verlauf der Assayentwicklung verwendeten Substratkonzentration von 10 μM bzw. 200 μM beträgt das Bestimmtheitsmaß r^2 jeweils $> 0,92$; bei dem gequenchten Proteinase 3-Substrat wurde aufgrund deutlicher Unterschiede zwischen zwei Chargen zwar jeweils ein Bestimmtheitsmaß $r^2 > 0,92$, zusammen jedoch nur ein r^2 von 0,67 berechnet. Der Substratverbrauch der fluorogenen AMC-Substrate beträgt auch bei den höchsten eingesetzten Proteasenkonzentrationen $< 5\%$, der der chromogenen pNA-Substrate und des FRET-Substrats liegt mit 11 - 15 % etwas höher. Da für alle Substrate ein linearer Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Substratspaltung besteht, ist dieser Bereich tolerabel.

Auch der Zusammenhang von Aktivität und Substratkonzentration (Abb. 4.1.3) ist bei vielen Substraten annähernd linear. Bei der Detektion von Proteinase 3 durch das gequenchte FRET-Substrat und von Chymase durch Suc-VPF-pNA nähert sich die Aktivität jedoch bei höheren Substratkonzentrationen einem Plateau an. Dies ist am ehesten auf den Effekt der Substratsättigung nach Michaelis-Menten zurückzuführen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch bei den niedrigeren Substratkonzentrationen die Aktivität der GASPIDs zuverlässig detektiert wird und die höheren

Tab. 4.1.2: Assaybedingungen. Für die Assay-Prototypen wurden Assaypuffer, Substrat, Substratkonzentration sowie die Konzentration der als Standard eingesetzten Protease optimiert bzw. festgelegt.

<u>Assay</u>	<u>Assaypuffer</u>	<u>Substrat</u>	<u>Standard</u>
Elastase	AP-M	MeOSuc-AAPV-AMC 10 μM	HNE 2 nM
Cathepsin G	AP-M AP-M	Suc-AAPF-AMC 10 μM Suc-VPF-pNA 200 μM	CG 100 nM CG 5 nM
Proteinase 3	AP-M	Abz-VADnVRDRQ-EDDnp 10 μM	PR3 10 nM
Tryptase	AP-T	tos-GPR-AMC 10 μM	TPS 1 nM
Chymase	AP-M AP-M	Suc-AAPF-AMC 10 μM Suc-VPF-pNA 200 μM	CHY 8 nM CHY 1 nM

Substratkonzentrationen keinen wesentlichen Vorteil bringen. Um Material und Kosten zu sparen, wurde in den Assay-Prototypen deshalb die Substratkonzentration für fluorogene Substrate auf 10 μM und die für chromogene Substrate auf 200 μM festgelegt. Die resultierenden Assaybedingungen sind in Tab. 4.1.2 zusammengefasst.

4.1.3 Selektivität: Detektion anderer GASPIDs

Da die GASPIDs strukturell eng verwandt sind und viele Eigenschaften teilen, besteht die Möglichkeit, dass sie auch das einer anderen GASPID zugeordnete

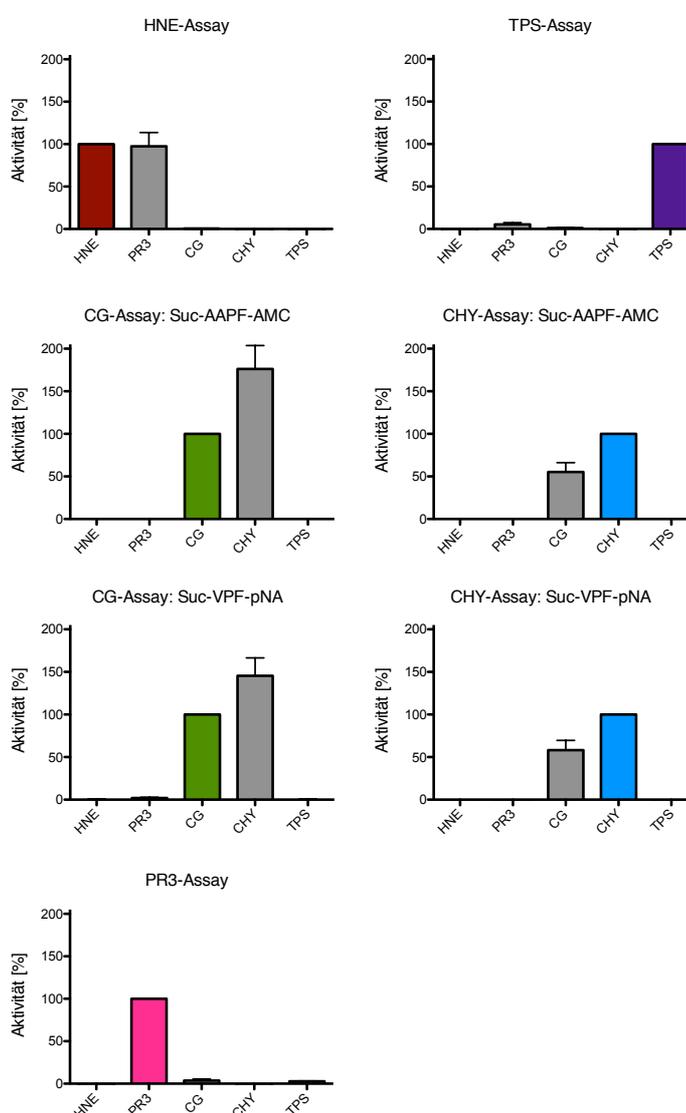


Abb. 4.1.4: Selektivität der prototypischen GASPID-Assays. Die Spaltung der Substrate durch andere GASPIDs wurde durch den Einsatz jeder der untersuchten GASPIDs in jedem Assay überprüft. Die Proteasen wurden in den in Tab. 4.1.2 angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Mittelwert \pm SD, $n \geq 3$.

Substrat produktiv spalten. Um die Selektivität der Aktivitätsassays zu untersuchen, wurde die Spaltung der ausgewählten fünf Substrate durch alle fünf GASPIDs überprüft. Dazu wurden die Proteasen in den bisher höchsten verwendeten Konzentrationen (s. Tab. 4.1.2) in 96-Well-Mikrotiterplatten vorgelegt. Nach Zugabe der Substrate wurde die Spaltung analog zum Vorgehen in Kapitel 4.1.1 mithilfe des *Tecan Safire II* verfolgt.

Wie aus den Versuchen zur Sensitivität (s. Abb. 4.1.1) bekannt war, werden die beiden chymotryptischen Substrate Suc-VPF-pNA und Suc-AAPF-AMC sowohl durch Cathepsin G als auch durch Chymase gespalten (Abb. 4.1.4), was die limitierte Spezifität der Substrate demonstriert. Das Elastase-Substrat MeOSuc-AAPV-AMC wird auch durch Proteinase 3 gespalten, was der gemeinsamen Eigenschaft beider Proteasen als Enzyme mit elastolytischer Aktivität entspricht. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen eingesetzten Konzentrationen (2 nM Elastase vs. 10 nM Proteinase 3) ergibt sich jedoch ein deutlicher Sensitivitätsunterschied um den Faktor fünf. Im Tryptase-Assay wird zu geringen Anteilen ebenfalls Proteinase 3 detektiert, umgekehrt im Proteinase 3-Assay auch Tryptase; beide Proteasen können prinzipiell Substrate nach einem Argininrest spalten und damit sowohl das Tryptase-Substrat (tos-GPR-AMC) als auch das gequenchte Proteinase 3-Substrat (Abz-VADnVRDRQ-EDDnp). Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen im Assay eingesetzten Proteasenkonzentrationen (vgl. Tab. 4.1.2) beträgt die detektierte Tryptase-Aktivität im Proteinase 3-Assay zwar etwa 30 %, bei den tatsächlich verwendeten Konzentrationen im Assay jedoch nur um 3 % (Tab. 4.1.3).

Tab. 4.1.3: Selektivität der GASPID-Assays. Dargestellt ist die prozentuale Aktivität der GASPIDs bei der Detektion von rekombinant hergestellter bzw. isolierter Protease. Mittelwert \pm SD.

		Assay						
		<u>HNE</u>	<u>CG</u> (Suc-AAPF-AMC)	<u>CG</u> (Suc-VPF-pNA)	<u>PR3</u>	<u>TPS</u>	<u>CHY</u> (Suc-AAPF-AMC)	<u>CHY</u> (Suc-VPF-pNA)
GASPID	<u>HNE</u>	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
	<u>CG</u>	0 %	100 %	100 %	4 % \pm 2 %	1 % \pm 1 %	55 % \pm 11 %	58 % \pm 12 %
	<u>PR3</u>	98 % \pm 16 %	0 %	2 % \pm 1 %	100 %	5 % \pm 2 %	0 %	0 %
	<u>TPS</u>	0 %	0 %	0 %	3 %	100 %	0 %	0 %
	<u>CHY</u>	0 %	176 % \pm 28 %	145 % \pm 21 %	0 %	0 %	100 %	100 %

Die Peptidsubstrate sind damit zum Teil nur eingeschränkt selektiv für die zu detektierende GASPID. Dies zeigt, dass weitere Schritte wie z. B. der Einsatz spezifischer Inhibitoren oder die Bestimmung der potentiell störenden Proteasen für eine Unterscheidung der Proteasen notwendig sind.

4.1.4 Interferenz durch andere GASPIDs

Da die verwendeten Peptidsubstrate aus drei bis acht Aminosäuren bestehen, weisen sie mehr als eine potentielle proteolytische Spaltstelle auf. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass eine Protease das Substrat nicht-produktiv spaltet, d. h. nicht die Abgangsgruppe freisetzt, sondern das Substrat zerstört, da die Fragmente nicht mehr von der Zielprotease erkannt werden. Zur Untersuchung der Störung der Assays durch andere GASPIDs wurde deshalb überprüft, ob die Aktivität der nachzuweisenden GASPID im jeweiligen Assays durch die Gegenwart anderer GASPIDs beeinflusst wird. Hierfür wurde in einem Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte jeweils Assaypuffer vorgelegt und die nachzuweisende GASPID in Kombination mit je einer weiteren GASPID zugegeben. Die Konzentrationen entsprachen dabei den in den vorangegangenen Versuchen genutzten Konzentrationen (s. Tab. 4.1.2). Nach Zugabe der Substrate wurde die Substratspaltung im *Tecan Safire II* gemessen.

Tab. 4.1.4: Störung der Aktivitätsassays durch andere GASPIDs. Dargestellt ist die Aktivitätsänderung bei Kombination von jeweils zwei GASPIDs in einem der Assays.

		Assay						
		<u>HNE</u>	<u>CG</u> (Suc-AAPF-AMC)	<u>CG</u> (Suc-VPF-pNA)	<u>PR3</u>	<u>TPS</u>	<u>CHY</u> (Suc-AAPF-AMC)	<u>CHY</u> (Suc-VPF-pNA)
Störung durch die GASPID	<u>HNE</u>	/	± 0 %	- 6 %	+ 6 %	+ 8 %	+ 2 %	+ 3 %
	<u>CG</u>	- 5 %	/	/	- 3 %	+ 3 %	+ 49 %	+ 46 %
	<u>PR3</u>	+ 86 %	- 1 %	- 7 %	/	+ 14 %	+ 3 %	+ 9 %
	<u>TPS</u>	- 1 %	- 9 %	- 11 %	- 5 %	/	+ 3 %	+ 11 %
	<u>CHY</u>	+ 5 %	+ 156 %	+ 110 %	± 0 %	- 17 %	/	/

Im Proteinase 3-Assay zeigt sich keine wesentliche Aktivitätsänderung von Proteinase 3 durch gemeinsamen Einsatz mit einer weiteren Protease (Tab. 4.1.4, Abb. 4.1.5). Im Tryptase-Assay wird bei gemeinsamem Einsatz von Tryptase und Proteinase 3 eine Aktivitätssteigerung von ca. 14 % gemessen. Dabei ist zu

berücksichtigen, dass Proteinase 3 prinzipiell C-terminal der Aminosäure Arginin spaltet. Außerdem wird bei Kombination von Tryptase und Chymase im Tryptase-Assay eine Aktivitätsminderung von etwa 17 % gemessen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Chymase zur Stabilisierung der aktiven Tryptase

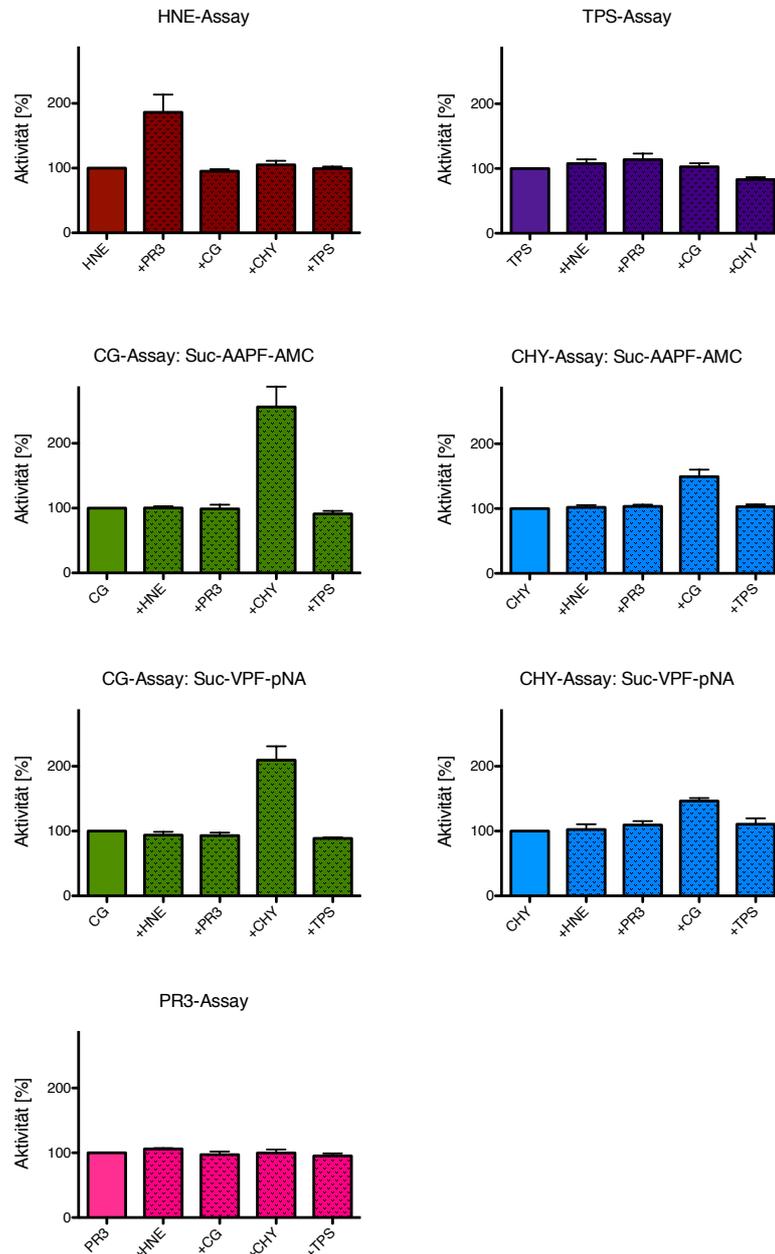


Abb. 4.1.5: Störung der Aktivitätsassays durch andere GASPIDs. Die Spaltung der Substrate durch die nachzuweisende GASPID wurde in Gegenwart anderer GASPIDs gemessen. Die Konzentrationen entsprechen den jeweils als Standard eingesetzten Konzentrationen (s. Tab. 4.1.2). Mittelwert \pm SD, $n \geq 3$.

notwendige Proteoglykane bindet. Wie bereits bekannt werden von Cathepsin G und Chymase die gleichen Substrate gespalten; bei Kombination beider GASPIDs wird wie zu erwarten eine höhere Aktivität detektiert. Gleiches gilt für die Kombination von Elastase und Proteinase 3 im Elastase-Assay. Da die gemessene Aktivität weitgehend der Addition der Einzelaktivitäten entspricht, wird die Aktivität der Proteasen untereinander dabei nicht gestört. Die Aktivitätsänderungen bei allen anderen Kombinationen beträgt $\leq 11\%$, eine Zerstörung der Substrate ist folglich kein wesentliches Problem.

4.1.5 Spezifität: Einsatz spezifischer Inhibitoren

Die Versuche zur Selektivität der prototypischen Assays und der Interferenz zeigen, dass die Peptidsubstrate nur eingeschränkt selektiv hinsichtlich der Detektion der GASPIDs sind. Zur Unterscheidung verschiedener GASPIDs, insbesondere von Cathepsin G und Chymase sowie von Elastase und Proteinase 3, erschien es deshalb notwendig, spezifische Inhibitoren einzusetzen. Deshalb wurde die Hemmbarkeit der als Standard eingesetzten Proteasen durch Inhibitoren, die als selektiv bzw. spezifisch für die jeweilige GASPID beschrieben worden sind, überprüft. Dazu wurden die GASPIDs in den in Tab. 4.1.2 genannten Konzentrationen in Assaypuffer in Mikrotiterplatten vorgelegt. Anschließend wurde

Tab. 4.1.5: Inhibition der GASPID-Aktivität. Für jedes Assay ist die Kombination aus Substrat und Inhibitoren, die die Aktivität der nachzuweisenden GASPID auf $< 5\%$ Restaktivität hemmen, gegenübergestellt.

<u>Assay</u>	<u>Substrat</u>	<u>Aktivität hemmbar durch</u>
Elastase	MeOSuc-APPV-AMC	Sivelestat 30 μM
Cathepsin G	Suc-AAPF-AMC	CGI-1 10 μM Aprotinin 10 μM
Cathepsin G	Suc-VPF-pNA	CGI-1 10 μM Aprotinin 10 μM
Proteinase 3	Abz-VADnVRDRQ-EDDnp	Sivelestat 30 μM
Tryptase	tos-GPR-AMC	DJ-72 1 μM
Chymase	Suc-AAPF-AMC	CGI-1 10 μM
Chymase	Suc-VPF-pNA	CGI-1 10 μM

jeweils ein Inhibitor, der in der Literatur als spezifisch für die nachzuweisende Protease gilt, zugegeben: Im Elastase- und Proteinase 3-Assay wurde Sivelestat (30 μ M), im Cathepsin G- und Chymase-Assay wurden CGI-1 und Aprotinin (je 10 μ M) und im Tryptase-Assay wurde DJ-72 (1 μ M) verwendet. Nach einer Stunde Inkubation wurde das Assaysubstrat zugegeben und die Substratspaltung im *Tecan Safire II* verfolgt.

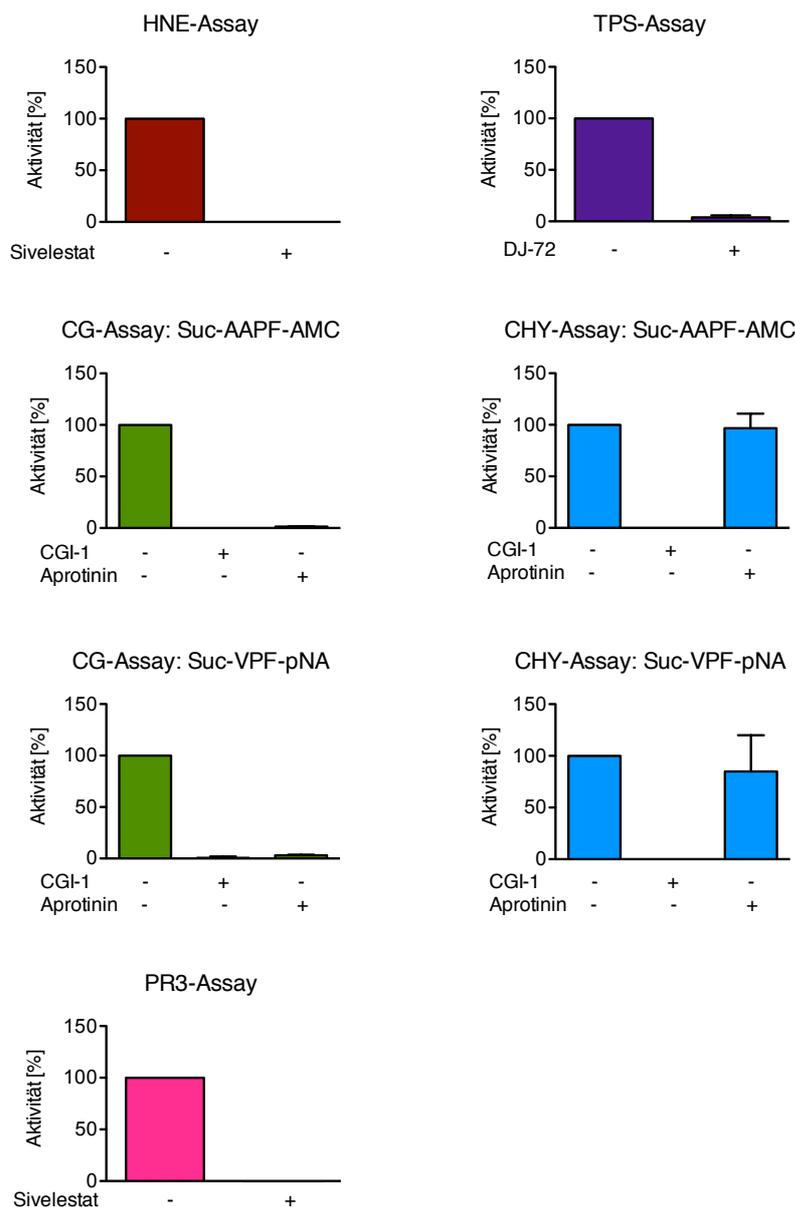


Abb. 4.1.6: Einfluss der Inhibitoren auf die GASPID-Aktivität. Die Aktivität der GASPIDs wurde in Abwesenheit und Gegenwart von Inhibitoren gemessen, die in der Literatur als selektiv bzw. spezifisch für GASPIDs beschrieben wurden. Dargestellt ist die Restaktivität nach einer Stunde Inkubationszeit. Mittelwert \pm SD, $n \geq 3$.

In allen Assays wird die Aktivität der als Standard eingesetzten Protease durch einen der eingesetzten Inhibitoren auf < 5 % Restaktivität gehemmt (Tab. 4.1.5, Abb. 4.1.6). Die Aktivität von Elastase und Proteinase 3 wird durch Sivelestat vollständig gehemmt, Sivelestat ist damit weder für Elastase noch für Proteinase 3 selektiv. Die Cathepsin G-Aktivität wird sowohl durch CGI-1 als auch durch Aprotinin zu > 95 % gehemmt, die Chymase-Aktivität dagegen nur durch CGI-1 und nicht durch Aprotinin; dies ermöglicht somit eine Unterscheidung dieser beiden GASPIDs.

4.2 Validierung der prototypischen Assays mit Zelllinien

Um zu überprüfen, ob die prototypischen Assays geeignet sind, GASPIDs in neutrophilen Granulozyten und Mastzellen nachzuweisen, wurden zunächst verschiedene Zelllinien untersucht. Mithilfe dieser wurde überprüft, ob die Assays hinreichend sensitiv und spezifisch für die Detektion der GASPIDs im Zelllysate sind. Im Zelllysate liegen zusätzlich zu den GASPIDs multiple weitere zelluläre Proteasen und andere potentielle Störfaktoren vor, die durch eine Interaktion die Aktivität der GASPIDs und damit ihre Nachweisbarkeit einschränken können.

4.2.1 Detektion der GASPIDs in Modellzelllinien

Um zu überprüfen, inwieweit die Assays geeignet sind, die Aktivität der GASPIDs in Lysaten zu detektieren, wurden als Neutrophilen-Vorläuferzelllinien U937 und HL-60, als Mastzell-Vorläuferzelllinien HMC-1 und LUVA und als Kontrolle die Fibroblasten-Zelllinie HT-1080 untersucht. Zur Herstellung der Lysate wurden die Zellkulturen jeweils mit Lysepuffer versetzt, mehrmals gevortext und dazwischen gekühlt (vgl. 3.2.2.2). In Vorversuchen waren der Lysepuffer sowie die Lysemethode zunächst dahingehend optimiert worden, ein möglichst homogenes Lyseergebnis zu gewährleisten. In einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurde dann Assaypuffer vorgelegt und Zelllysate (Konzentration: 1 000 Zellen/ μ l; s. 3.2.2.2) zugegeben. Aus Vorversuchen war dabei bekannt, wieviel Zelllysate notwendig ist, um mit dem jeweiligen Assay eine Aktivität im Zelllysate zu detektieren; im Elastase-, Proteinase 3- und Cathepsin G-/Chymase-Assay mit dem Substrat Suc-AAPF-AMC wurden daraufhin je 100 000 Zellen, im Cathepsin G-/Chymase-Assay mit dem Substrat Suc-VPF-pNA je 50 000 Zellen und im Trypsin-Assay je

40 000 Zellen eingesetzt. Nach Substratzugabe wurde die Aktivität im Tecan Safire II gemessen.

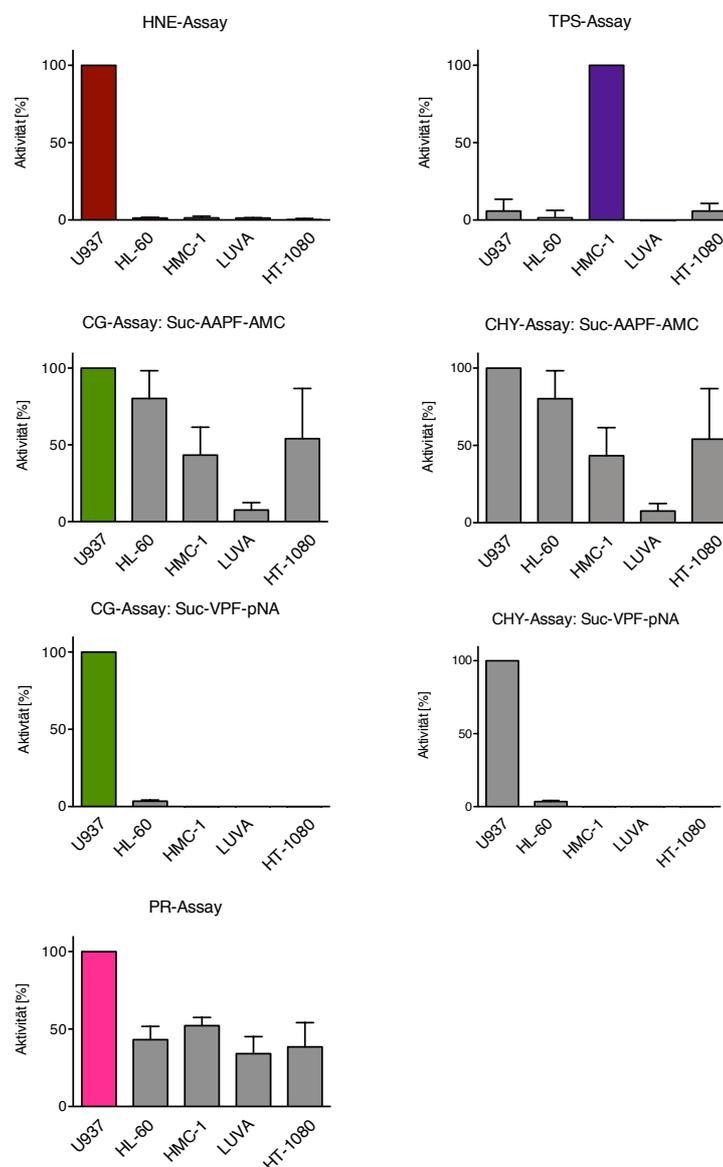


Abb. 4.2.1: Nachweis der GASPIDs bzw. GASPID-ähnlicher Aktivität in Lysaten verschiedener Zelllinien. Zur Überprüfung der Assay-Prototypen wurde die Aktivität im Lysat der beiden Neutrophilen-Vorläuferzelllinien U937 und HL-60, der Mastzell-Vorläuferzelllinien HMC-1 und LUVA sowie der Fibroblasten-Zelllinie HT-1080 gemessen. Mittelwert \pm SD, $n \geq 3$.

Wie erwartet detektiert der Elastase-Assay Elastase-Aktivität in der Neutrophilen-Zelllinie U937 und der Tryptase-Assay Tryptase-Aktivität in der Mastzelllinie HMC-1 (Abb. 4.2.1). Die gemessene Aktivität in den übrigen Zelllinien beträgt jeweils < 10 % dieser Aktivitäten; die detektierte Elastase-Aktivität in der

Neutrophilen-Zelllinie HL-60 und die Tryptase-Aktivität in der Mastzelllinie LUVA sind damit unerwartet niedrig, was evtl. auf die geringe Differenzierung dieser Zelllinien zurückzuführen ist.

Der Cathepsin G-/Chymase-Assay mit dem Substrat Suc-AAPF-AMC detektiert Aktivität in allen verwendeten Zelllinien einschließlich der Fibroblasten-Zelllinie HT-1080. Da HT-1080-Zellen bzw. Fibroblasten weder Cathepsin G noch Chymase exprimieren, scheidet das Substrat damit zur Detektion von Cathepsin G bzw. Chymase im Lysat aus. Das chromogene Substrat Suc-VPF-pNA wiederum detektiert Aktivität nur in der Neutrophilen-Zelllinie U937 und zu geringeren Anteilen auch in HL-60 (< 5 %); in den hier verwendeten Mastzelllinien lässt sich keine Cathepsin G- oder Chymase-Aktivität nachweisen, wobei HMC-1-Zellen laut Literatur auch keine Chymase enthalten sollen [108].

Der Proteinase 3-Assay detektiert Proteinase 3-ähnliche Aktivität wider Erwarten in allen überprüften Zelllinien. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Proteinase 3-Substrat multiple Spaltstellen, die für eine produktive Spaltung genutzt werden können, aufweist. Die Aktivität in der Neutrophilen-Vorläuferzelllinie U937 ist jedoch ca. doppelt so hoch wie in den übrigen Zelllinien. Dieser Dimensionsunterschied ist wahrscheinlich durch die tatsächliche Detektion von Proteinase 3 bedingt.

Damit sind alle Assays prinzipiell geeignet, GASPID-Aktivität im Zelllysat nachzuweisen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde zur weiteren Untersuchung der Assays im Zelllysat die Zelllinie U937 für den Elastase- und Cathepsin G-/Chymase-Assay mit dem Substrat Suc-VPF-pNA und HMC-1 wiederum für den Tryptase-Assay ausgewählt. Da Proteinase 3-Aktivität und Cathepsin G-/Chymase-Aktivität mit dem Substrat Suc-AAPF-AMC sowohl in Neutrophilen- als auch in Mastzelllinien detektiert wird, wurde für diese Assays sowohl U937 als auch HMC-1 ausgewählt.

4.2.2 Spezifität im Zellmodell: Inhibition der GASPID-Aktivität im Lysat

Die Assayetablierung hat gezeigt, dass die zur Detektion der GASPIDs verwendeten Peptidsubstrate nur eingeschränkt selektiv sind (s. Kapitel 4.1.3) und dementsprechend spezifische Inhibitoren zur Bestätigung eingesetzt werden müssen. Um die Hemmbarkeit der GASPID-ähnlichen Aktivität im Zelllysat zu

untersuchen, wurden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte Assaypuffer und Lysat (Mengen vgl. Kapitel 4.2.1) vorgelegt. Anschließend wurden die etablierten Inhibitoren (vgl. Kapitel 4.1.5) zugegeben. Nach 60 Minuten Inkubationszeit wurden die Substrate zugegeben und deren Spaltung im *Tecan Safire II* verfolgt.

Die im Elastase-Assay gemessene Aktivität im Lysat von U937-Zellen ist mit Sivelestat vollständig hemmbar (Abb. 4.2.2). Auch die Tryptase-Aktivität im HMC-1-Lysat wird durch DJ-72 zu > 85 % gehemmt. Im Cathepsin G-/Chymase-Assay mit dem chromogenen Substrat Suc-VPF-pNA wird die Aktivität in U937 unter Verwendung von CGI-1 vollständig gehemmt; mit Aprotinin bleibt eine Restaktivität von < 5 %. Dieses Ergebnis entspricht der erwarteten Hemmbarkeit von Elastase, Tryptase bzw. Cathepsin G; diese drei Assays sind damit spezifisch genug, die Aktivität ihrer Ziel-GASPID im Zelllysate zu detektieren.

Dagegen wird die im Cathepsin G-/Chymase-Assay mit dem fluorogenen Substrat Suc-AAPF-AMC gemessene Aktivität in den Lysaten von U937- und HMC-1-Zellen weder durch Aprotinin noch durch CGI-1 gehemmt. Das Substrat Suc-AAPF-AMC ist damit nicht geeignet, Cathepsin G- oder Chymase-Aktivität im Lysat der hier verwendeten Zelllinien zu quantifizieren, sondern detektiert (eine) andere Protease(n).

Im Proteinase 3-Assay wird die gemessene Aktivität durch Sivelestat in U937 auf < 25 % und in HMC-1 auf etwa 75 % Restaktivität gehemmt. Da die Aktivität von isolierter Proteinase 3 aber vollständig hemmbar ist, kann die in U937 und HMC-1 trotz Inhibitor verbliebene Aktivität nicht Proteinase 3 entsprechen. Die detektierte Restaktivität ist in beiden Zelllinien vermutlich mitunter durch die Detektion einer oder mehrerer anderer Proteasen, die das Substrat an einer der vielen Spaltstellen spalten, zurückzuführen.

Basierend auf diesen Ergebnissen kann die Wahl eines geeigneten Substrats für jede der GASPIDs weiter eingeschränkt bzw. verifiziert werden: Der Elastase- und Tryptase-Assay sowie der Cathepsin G-/Chymase-Assay mit dem Substrat Suc-VPF-pNA sind hinreichend spezifisch. Der Proteinase 3-Assay ermöglicht zwar die Detektion von Proteinase 3-ähnlicher Aktivität im Zelllysate, allerdings ist das Substrat nur eingeschränkt spezifisch. Das fluorogene Substrat Suc-AAPF-AMC ist hingegen kein geeignetes Substrat zur Detektion von Cathepsin G-/Chymase-

Aktivität im Lysat. Eine homogene Assaydurchführung mit ausschließlich fluorogenen Substraten scheidet damit leider aus.

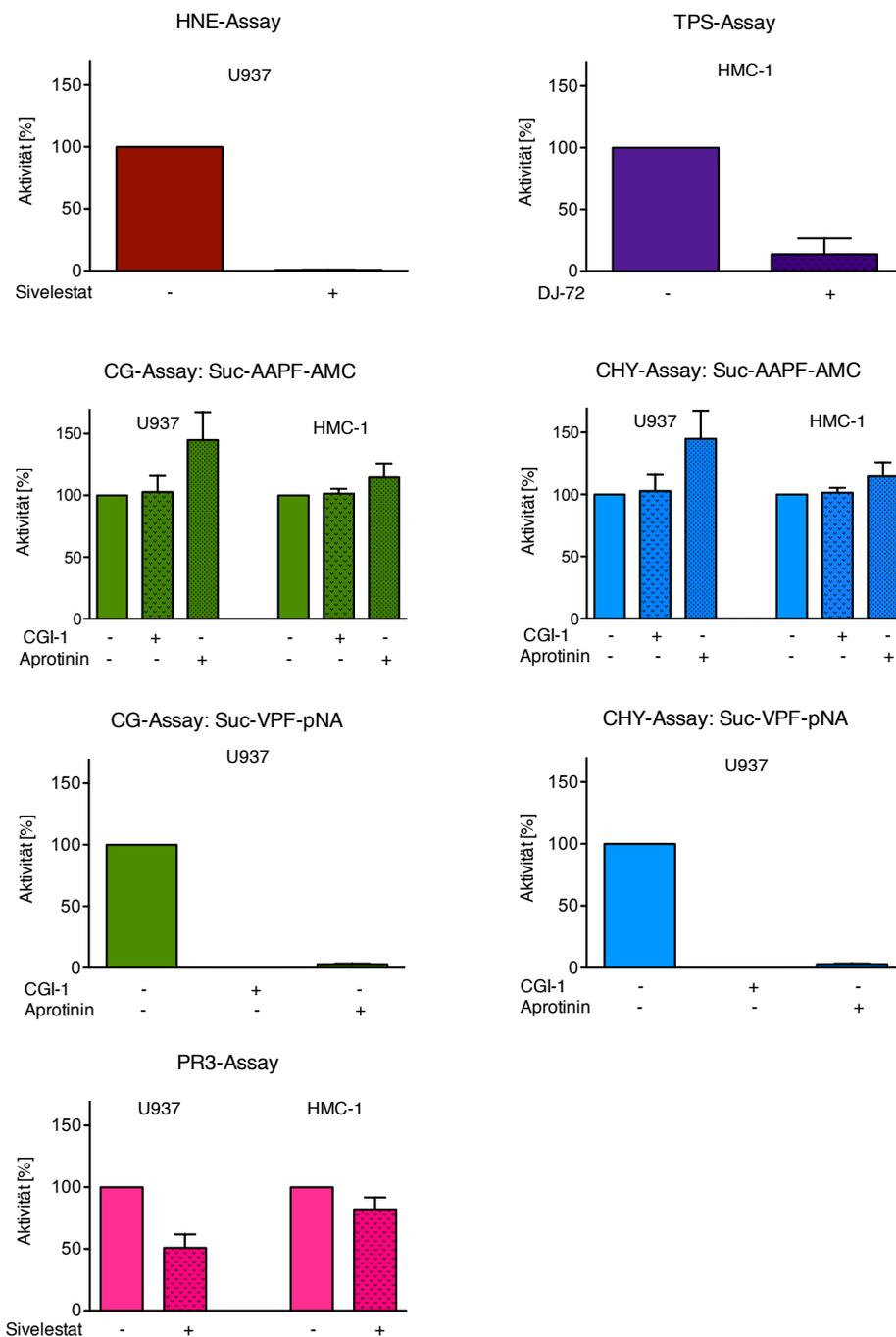


Abb. 4.2.2: Einfluss spezifischer Inhibitoren auf die GASPID-ähnliche Aktivität im Zellysat. Zur Inhibition der GASPID-Aktivität im Zellysat wurden die bereits etablierten Inhibitoren eingesetzt (vgl. Kapitel 4.1.5). Die Restaktivität wurde nach einer Stunde Inkubationszeit mit bzw. ohne Inhibitor gemessen. Mittelwert \pm SD, $n \geq 3$.

4.2.3 Linearität: Bestimmung eines geeigneten Messbereichs

Um den Einfluss von Störfaktoren im Lysat auf die GASPID-Assays zu überprüfen, wurden die Linearität und der potentielle Messbereich der Assays untersucht. Hierfür wurde in einer 96-Well-Mikrotiterplatte Assaypuffer vorgelegt und Lysat in jeweils vier verschiedenen Mengen (0 - 40 000 Zellen im Trypsin-Assay,

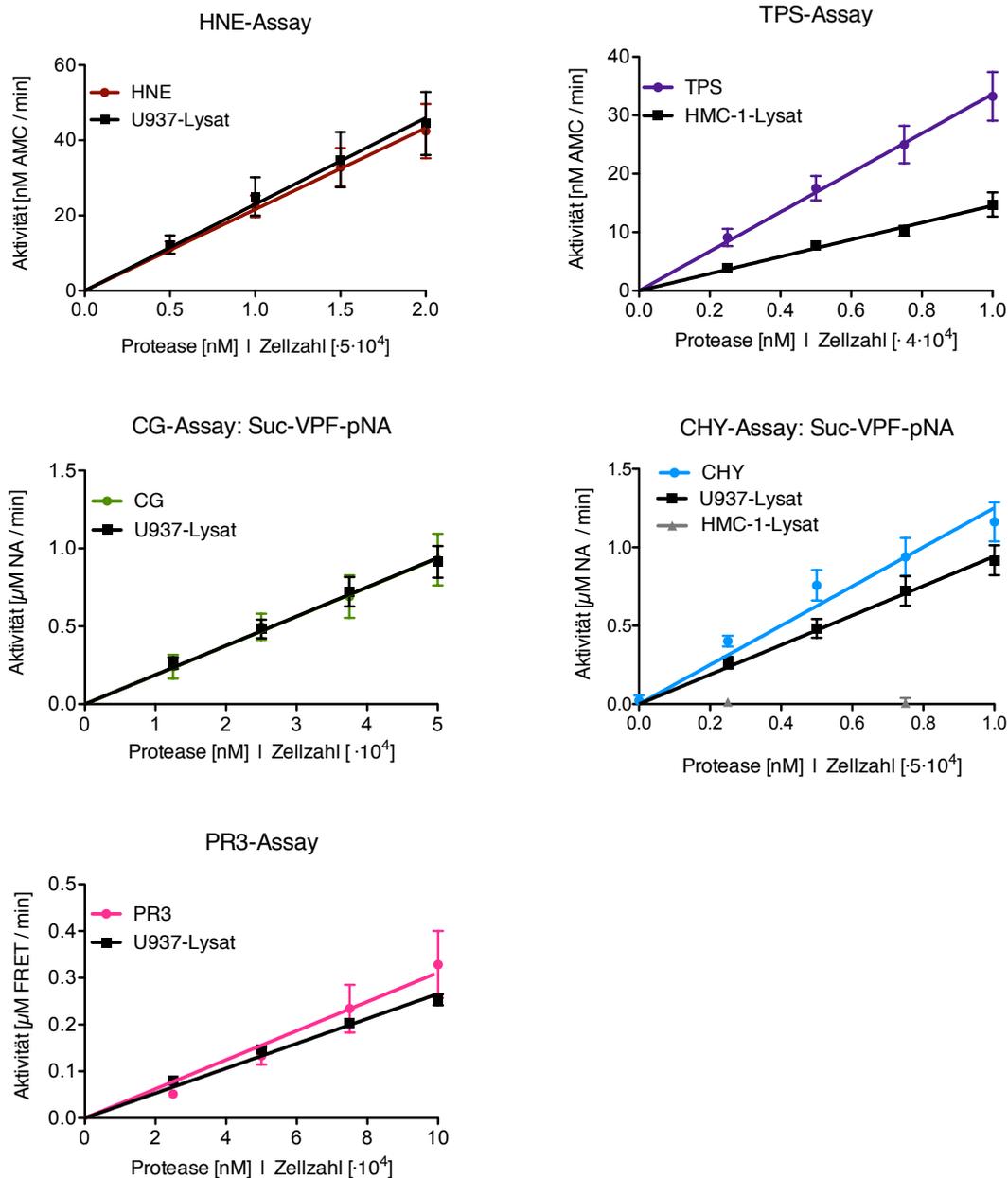


Abb. 4.2.3: Linearität der GASPID-Assays. Die lineare Abhängigkeit der gemessenen Proteasenaktivität von der Zellzahl wurde bei Einsatz von vier verschiedenen Zellzahlen überprüft. Zum Vergleich sind zusätzlich die Ergebnisse aus der Linearitätsüberprüfung mit isolierter bzw. rekombinanter Protease (s. Kapitel 4.1.1, Abb. 4.1.1) für die jeweiligen Assays dargestellt. Mittelwert \pm SD, $n \geq 3$.

0 - 50 000 Zellen im Cathepsin G-/Chymase-Assay, 0 - 100 000 Zellen im Elastase- und Proteinase 3-Assay) zugegeben; die höchste eingesetzte Zellzahl entspricht dabei den in Kapitel 4.2.1 und 4.2.2 verwendeten Zellzahlen. Nach Zugabe des Substrats wurde die Aktivität der GASPIDs im *Tecan Safire II* gemessen.

In allen Assays ist die gemessene Aktivität linear von der eingesetzten Zellzahl abhängig mit einem Bestimmtheitsmaß r^2 von jeweils $\geq 0,91$ (Abb. 4.2.3). In keinem der Assays wird dabei der mit den Standards verifizierte Messbereich überschritten. Durch den Vergleich der mit den Standards gemessenen GASPID-Aktivität kann also die im Lysat detektierbare Menge der GASPIDs berechnet werden (Tab. 4.2.1, vgl. Kapitel 3.2.5.3). Die aktivitätsbasierten Assays sind damit geeignet, die GASPIDs auch im Zelllysate zu quantifizieren.

Tab. 4.2.1: Quantifizierung der GASPIDs in den Modellzelllinien. Dargestellt ist die mit den Aktivitätsassays quantifizierbare Menge der GASPIDs in U937- bzw. HMC-1-Zellen. Mittelwert \pm SD.

<u>GASPID</u>	<u>Protease pro Zelle [pg]</u>
Elastase	0,1 \pm 0,02
Cathepsin G	0,8 \pm 0,05
Proteinase 3	0,3 \pm 0,02
Tryptase	0,06 \pm 0,005

4.2.4 Validierung durch Western Blots

Um die mithilfe der Aktivitätsassays in den Zelllinien bestimmten Aktivitäten bzw. die Mengen der GASPIDs zu verifizieren, wurden die Proteasen auch mithilfe von Western Blots immunologisch semiquantitativ nachgewiesen. Dazu wurden zunächst Lysate der verwendeten Zelllinien (U937, HL-60, HMC-1, LUVA und HT-1080) hergestellt. Die Proben (je 200 000 Zellen) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und in Western Blots auf ihren GASPID-Gehalt überprüft (Abb. 4.2.4). Zur Umrechnung der nachgewiesenen GASPID-Mengen wurden Standardproben von Elastase, Cathepsin G, Proteinase 3, Tryptase und Chymase mitgeführt (vgl. Kapitel 3.2.5.4).

Elastase und Cathepsin G sind im U937-Lysat, Proteinase 3 ist in U937- und HL-60-Lysaten und Tryptase im HMC-1-Lysat immunologisch nachweisbar (Abb. 4.2.4). Chymase wird dagegen in keiner der Zelllinien nachgewiesen. Die daraus berechenbare Menge der GASPIDs pro Zelle (Tab. 4.2.2) korreliert mit den Ergebnissen der Aktivitätsassays: Die Menge an detektiertem Cathepsin G und Proteinase 3 pro Zelle in U937 stimmt näherungsweise überein (vgl. Tab. 4.2.1) und in keiner der Zelllinien wird Chymase detektiert. Der Tryptase-Gehalt pro Zelle ist im Western Blot hingegen etwa um den Faktor zehn höher, was z. B. auf die Detektion inaktiver Tryptase (Zymogene, Protease-Inhibitor-Komplexe) im Western Blot zurückzuführen sein könnte. Die Menge an Elastase lässt sich aktuell aus technischen Gründen mithilfe des hier durchgeführten Western Blots nicht bestimmen.

Durch die Durchführung von Western Blots konnte eine Übereinstimmung der nachgewiesenen Proteasenmenge im Aktivitätsassay vs. im Western Blot gezeigt werden. Dies bestätigt die Validität der durch die entwickelten Aktivitätsassays gewonnenen Ergebnisse.

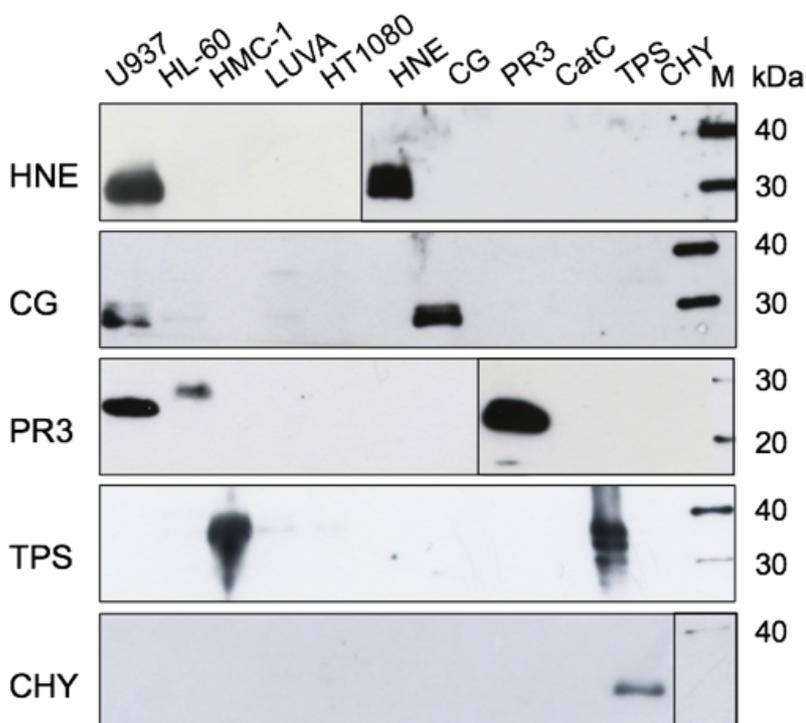


Abb. 4.2.4: Nachweis der GASPIDs in Zelllysaten durch Western Blots. Abgebildet ist die immunologisch nachweisbare Menge der GASPIDs in Zelllysaten der Zelllinien U937, HL-60, HMC-1, LUVA und HT-1080. Als Kontrolle wurden rekombinante oder isolierte Enzyme eingesetzt.

Tab. 4.2.2: Nachweis der GASPIDs in Zelllinien mittels Western Blots. Die immunologisch nachweisbare Menge der GASPIDs im Western Blot wurde mithilfe von Standards der jeweiligen GASPIDs in die Proteasenmenge pro Zelle umgerechnet. Ergebnisse in pg/Zelle, ∅ = unterhalb des Detektionslimits, + = detektierbar im qualitativen Western Blot.

<u>GASPID</u>	<u>U937 [pg/Zelle]</u>	<u>HMC-1 [pg/Zelle]</u>
Elastase	+	∅
Cathepsin G	0,5	∅
Proteinase 3	0,3	∅
Tryptase	∅	0,3
Chymase	∅	∅

4.3 Aktivitätsassay für Cathepsin C

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten GASPIDs werden während ihrer Biogenese in neutrophilen Granulozyten und Mastzellen durch die Cysteinprotease Cathepsin C aktiviert. Um weiterführende Untersuchungen der Mechanismen und Funktionsweise dieses Proteasennetzwerks zu ermöglichen, wurde auch ein Cathepsin C-Aktivitätsassay etabliert und validiert.

4.3.1 Identifizierung eines geeigneten Substrats

Um einen Assay zur Aktivitätsmessung von Cathepsin C zu entwickeln, wurden analog zur Assayentwicklung der GASPIDs zunächst zwei verschiedene fluorogene Peptidsubstrate, die in der Literatur als selektiv für die Detektion von Cathepsin C gelten, hinsichtlich ihrer Sensitivität miteinander verglichen. Dazu wurden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte Assaypuffer und isoliertes Cathepsin C (0 - 2 nM für H-GR-AMC bzw. 0 - 20 nM für H-GF-AMC) vorgelegt. Nach Zugabe der Substrate (0 - 20 µM) wurde die Substratspaltung im *Tecan Safire II* verfolgt.

Beide überprüften Substrate sind geeignet, die Aktivität von Cathepsin C zu detektieren (Abb. 4.3.1). Das Substrat H-GR-AMC ist dabei etwa um den Faktor 30 sensitiver als das alternative H-GF-AMC, sodass H-GR-AMC als Substrat für die weitere Assayentwicklung ausgewählt wurde (s. Tab. 4.3.1).

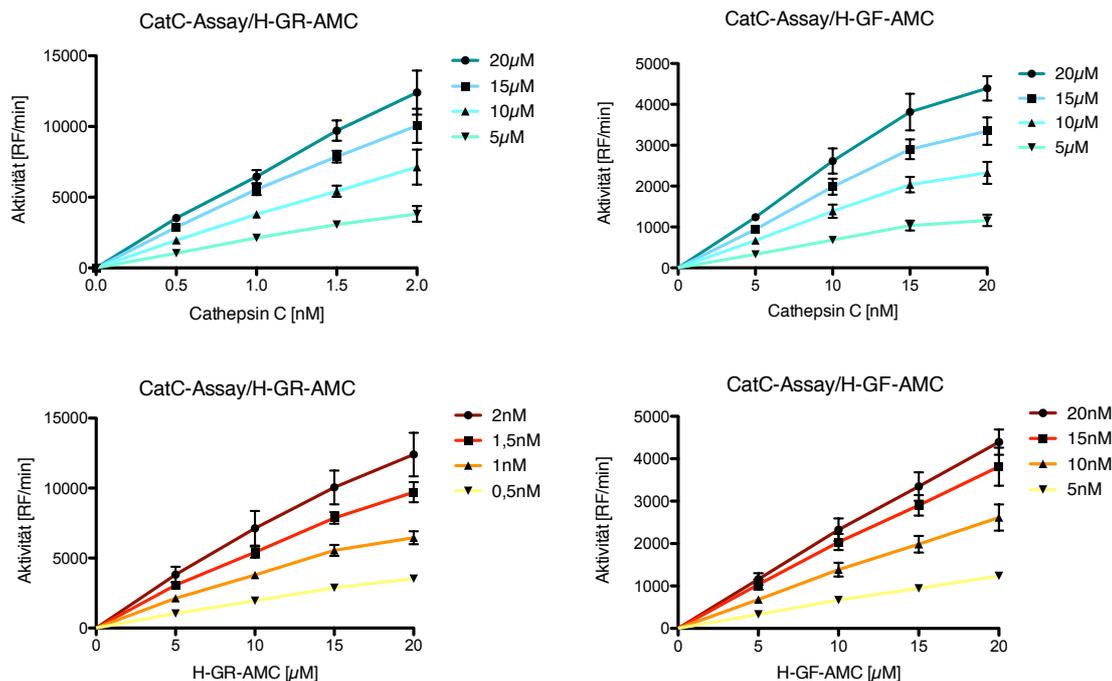


Abb. 4.3.1: Spaltung fluorogener Peptidsubstrate durch Cathepsin C. Die Spaltung der gewählten Substrate durch Cathepsin C wurde bei vier Enzym- und Substratkonzentrationen quantifiziert. Darstellung jeweils in Abhängigkeit der Substratkonzentration (rot) sowie in Abhängigkeit der Enzymkonzentration (blau). Mittelwert \pm SD, $n \geq 3$.

Tab. 4.3.1: Assaybedingungen des Cathepsin C-Assays.

<u>Assay</u>	<u>Assaypuffer</u>	<u>Substrat</u>	<u>Standard</u>
CatC	AP-CC	H-GR-AMC 10 μ M	CatC 2 nM

4.3.2 Validierung des prototypischen Cathepsin C-Assays

Um den Cathepsin C-Assay weiter zu validieren, wurde der Assay analog zu den GASPID-Assays hinsichtlich der Kriterien Selektivität, Interferenz mit GASPIDs und Spezifität überprüft. Dazu wurden in 96-Well-Mikrotiter-Platten Assaypuffer und wahlweise rekombinante bzw. isolierte GASPIDs allein (Konzentrationen vgl. Tab. 4.1.2), GASPIDs in Kombination mit Cathepsin C (2 nM) oder Cathepsin C (2 nM) z. T. mit Inhibitor (HR-57 100 nM) vorgelegt. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten, nach Substratzugabe wurde die Substratspaltung im *Tecan Safire II* verfolgt.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Substrat H-GR-AMC weitgehend selektiv für die Detektion von Cathepsin C ist (Abb. 4.3.2); die im Cathepsin C-Assay gemessene Aktivität von Elastase, Cathepsin G, Proteinase 3, Chymase und Tryptase beträgt jeweils < 1 %. Bei der Kombination von Cathepsin C mit den GASPIDs Cathepsin G, Elastase oder Tryptase beträgt die Aktivitätsänderung < 10 %, es findet also keine relevante Störung der Cathepsin C-Aktivität durch diese GASPIDs statt. Bei Kombination mit Proteinase 3 wird eine Aktivitätsminderung um 11 %, mit Chymase eine Minderung um 23 % beobachtet. Unter Berücksichtigung der im Vergleich zu Cathepsin C höheren eingesetzten Proteasenkonzentrationen (10 nM Proteinase 3 bzw. 8 nM Chymase vs. 2 nM Cathepsin C) beträgt die Aktivitätsminderung bei Normierung der Werte auf eine einheitliche Konzentration jedoch nur $\leq 5\%$. Durch Einsatz des Inhibitors HR-57 wird die Cathepsin C-Aktivität auf eine Restaktivität < 2 % inhibiert.

Der Cathepsin C-Assay erfüllt damit die Kriterien der Selektivität, Interferenz und Spezifität und erscheint geeignet, die Cathepsin C-Aktivität reliabel zu detektieren.

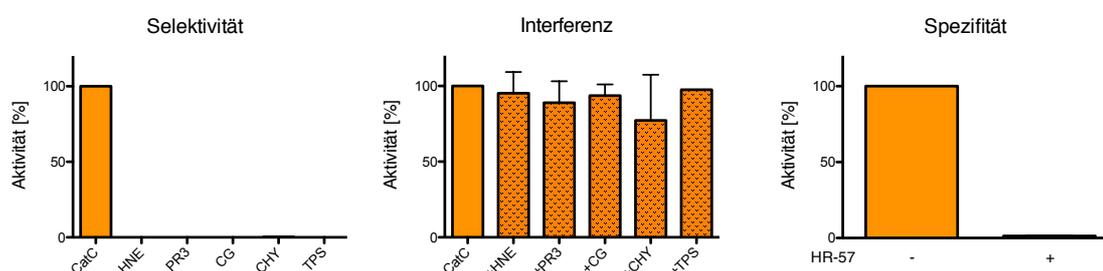


Abb. 4.3.2: Selektivität, Interferenz und Spezifität des Cathepsin C-Assays. Es wurde die Spaltung des Cathepsin C-Substrats H-GR-AMC durch die GASPIDs Elastase, Cathepsin G, Proteinase 3, Chymase und Tryptase alleine bzw. in Kombination mit Cathepsin C sowie die Inhibition von Cathepsin C durch den Inhibitor HR-57 überprüft. Mittelwert \pm SD, $n \geq 3$.

4.3.3 Übertragung auf das Zellmodell

Um den Cathepsin C-Assay auch im Zellmodell anwenden zu können, wurde der Assay analog zu den GASPID-Assays (vgl. 4.2) auf die Kriterien Linearität, Richtigkeit und Spezifität bei der Aktivitätsmessung im Zelllysate untersucht. Dazu wurden in Mikrotiterplatten Assaypuffer und Lysat der Zelllinien U937, HL-60, HMC-1, LUVA und HT-1080 in bis zu vier verschiedenen Mengen (max. 20 000

Zellen) sowie mit und ohne Inhibitor (HR-57 100 nM) vorgelegt. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten und anschließender Substratzugabe wurde die Spaltung im *Tecan Safire II* verfolgt.

In beiden Neutrophilen- sowie beiden Mastzell-Vorläuferzelllinien, nicht jedoch in HT-1080-Zellen, lässt sich Cathepsin C-Aktivität nachweisen (Abb. 4.3.3). Die Aktivität wird im Lysat beider weiterführend untersuchten Zelllinien, U937 und HMC-1, durch den Inhibitor HR-57 auf < 15 % Restaktivität reduziert. Der Assay ist somit auch bei Anwendung im Zelllysat hinreichend spezifisch. Dabei ergibt sich für beide Zelllinien eine lineare Abhängigkeit von Zellzahl und gemessener Cathepsin C-Aktivität. Die Quantifizierung von Cathepsin C-Aktivität ist damit auch in Zelllysaten möglich.

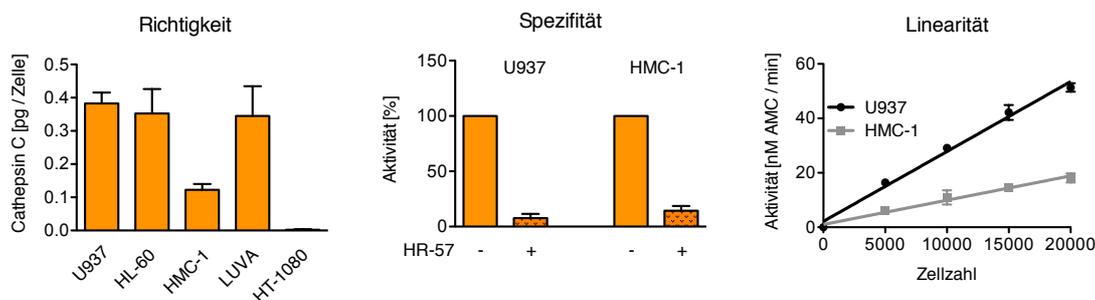


Abb. 4.3.3: Richtigkeit, Spezifität und Linearität im Zelllysat. Es wurde die Detektion von Cathepsin C-Aktivität in den Zelllinien U937, HL-60, HMC-1, LUVA und HT-1080, die Inhibition der gemessenen Aktivität durch den Inhibitor HR-57 und die Abhängigkeit von Zellzahl und gemessener Cathepsin C-Aktivität überprüft. Mittelwert \pm SD, $n \geq 3$.

4.4 Pilotstudie: Anwendung der GASPID-Assays auf isolierte humane neutrophile Granulozyten

Die entwickelten und validierten Aktivitätsassays sind sowohl unter Standardbedingungen als auch in der Zellkultur dazu geeignet, die Menge der untersuchten GASPIDs sowie von Cathepsin C zu quantifizieren. Um die Assays zukünftig potentiell auch klinisch anwenden zu können, ist eine Übertragbarkeit auch auf humane neutrophile Granulozyten notwendig.

4.4.1 Nachweis der GASPID- und Cathepsin C-Aktivität im Lysat isolierter humaner neutrophiler Granulozyten

Um zu überprüfen, ob mit den etablierten Assays die GASPID-Aktivität auch in humanen neutrophilen Granulozyten nachweisbar ist, wurden menschliche Vollblutproben gewonnen. Aus diesen Proben wurden die neutrophilen

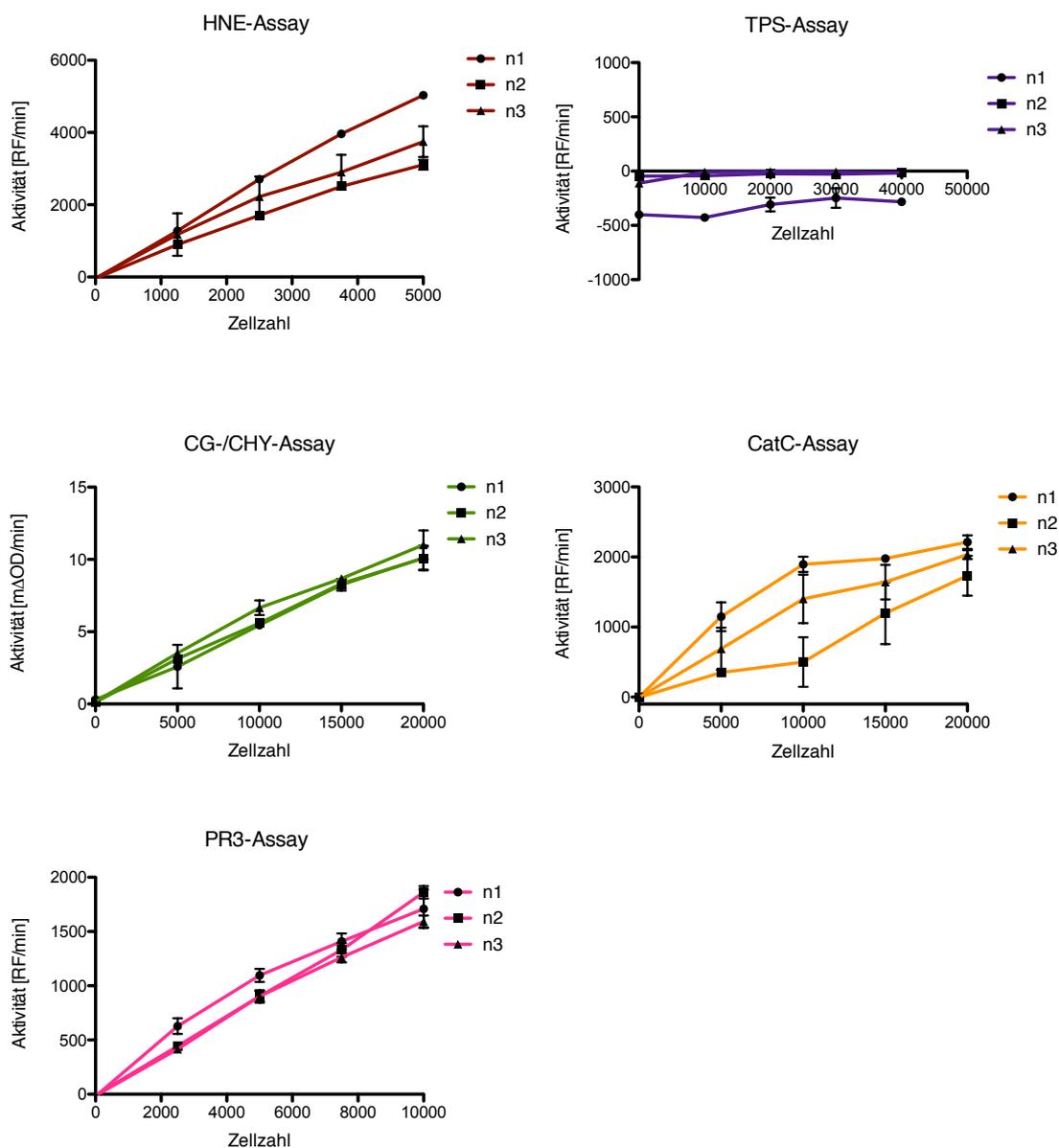


Abb. 4.4.1: Nachweis der GASPID- und Cathepsin C-Aktivität im Lysat isolierter humaner neutrophiler Granulozyten. Die entwickelten Assays wurden dazu verwendet, die Aktivität der GASPIDs und von Cathepsin C im Lysat isolierter humaner neutrophiler Granulozyten (drei Probanden bei jeweils vier verschiedenen Zellzahlen) zu detektieren. Für die drei Probanden (n1, n2, n3) ist jeweils der Mittelwert \pm SD von ≥ 3 technischen Replikaten dargestellt.

Granulozyten isoliert, die anschließend lysiert und hinsichtlich der Detektion von GASPID- sowie Cathepsin C-Aktivität untersucht wurden. Dazu wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten Assaypuffer und Lysat in vier verschiedenen Mengen (0 - 5 000 Zellen im Elastase-Assay, 0 - 10 000 Zellen im Proteinase 3-Assay, 0 - 20 000 Zellen im Cathepsin G- und Cathepsin C-Assay sowie 0 - 40 000 Zellen im Tryptase-Assay) eingesetzt. Wie viele Zellen in etwa benötigt werden, um während der Aktivitätsmessung ein Signal in dem mit Standards validierten Messbereich zu erhalten, war in Vorversuchen ermittelt worden. Nach Substratzugabe wurde die Spaltung im *Tecan Safire II* verfolgt.

In allen Lysaten neutrophiler Granulozyten ist die Aktivität von Elastase, Cathepsin G/Chymase, Proteinase 3 und Cathepsin C nachweisbar (Abb. 4.4.1); Tryptase-Aktivität wird hingegen, wie in neutrophilen Granulozyten zu erwarten, nicht detektiert. Die Aktivität aller detektierten Proteasen ist dabei weitgehend linear von der eingesetzten Zellzahl abhängig.

4.4.2 Spezifität: Inhibition der Proteasenaktivität

Wie die Assayentwicklung und -etablierung gezeigt haben, sind die Peptidsubstrate nur eingeschränkt selektiv bzw. spezifisch hinsichtlich der Detektion ihrer Zielproteasen. Zur Überprüfung der Spezifität der Assays wurde deshalb die Hemmbarkeit der detektierten Aktivität im Lysat isolierter humaner neutrophiler Granulozyten durch den Einsatz der etablierten Inhibitoren untersucht (vgl. Kapitel 4.2.2 und 4.3.3). Dazu wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten Assaypuffer und Lysat isolierter humaner neutrophiler Granulozyten (Zellzahl jeweils höchste in 4.4.1 verwendete Zellzahl) vorgelegt. Nach Zugabe der Inhibitoren (Sivelestat im Elastase- und Proteinase 3-Assay, CGI-1 und Aprotinin im Cathepsin G-/Chymase-Assay, HR-57 im Cathepsin C-Assay) und einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde das Substrat zugegeben und die Restaktivität im *Tecan Safire II* gemessen.

Die Aktivität von Elastase, Proteinase 3 und Cathepsin C ist auf < 2 % Restaktivität hemmbar. Cathepsin G-/Chymase-Aktivität wird durch CGI-1 auf < 1 % und durch Aprotinin auf < 5 % Restaktivität gehemmt. Dieser Unterschied kann durch die gleichzeitige Detektion geringer Mengen einer Protease mit Cathepsin G-ähnlichen Eigenschaften durch das Cathepsin G-Substrat Suc-VPF-pNA bedingt sein; Chymase wird hingegen nachweislich nicht detektiert.

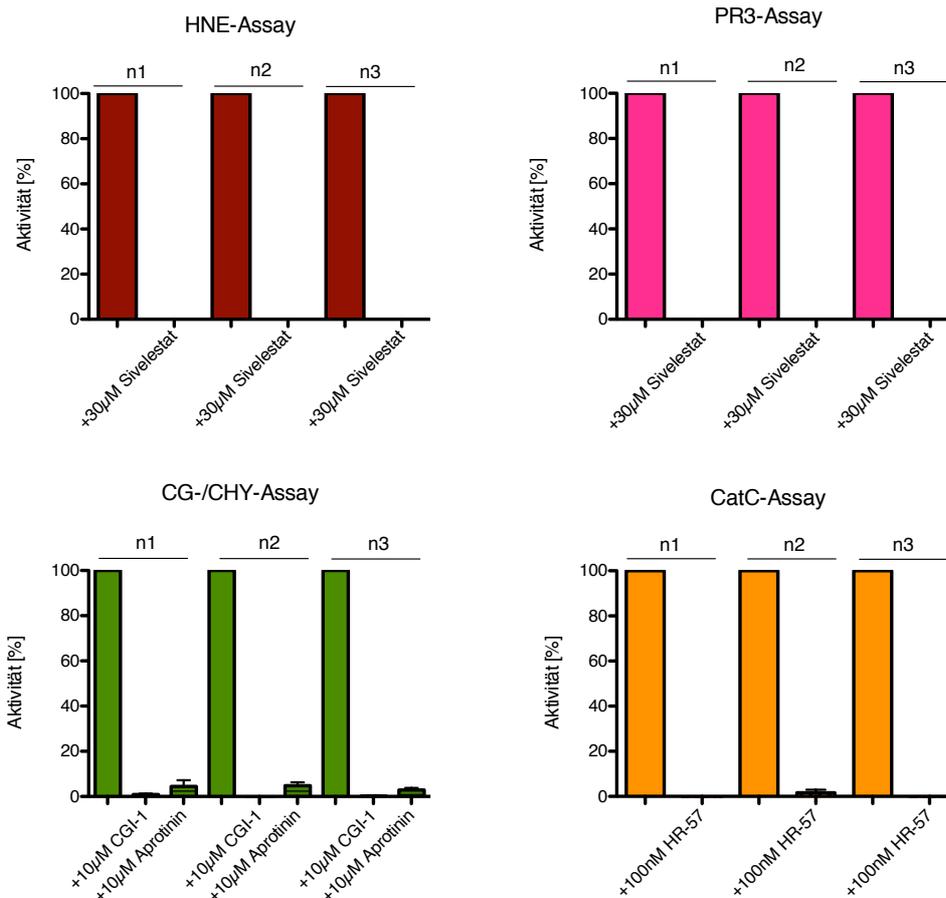


Abb. 4.4.2: Einfluss der Inhibitoren auf die GASPID- und Cathepsin C-Aktivität im Lysat isolierter humaner neutrophiler Granulozyten. Zur Inhibition der GASPID- und Cathepsin C-Aktivität im Neutrophilenisolat wurden die Inhibitoren, die zur Überprüfung der Spezifität etabliert worden sind (s. Kapitel 4.1.5 und 4.3.2), eingesetzt. Dargestellt ist die Restaktivität nach einer Stunde Inkubationszeit. Dabei wurde jeweils die höchste in Abb. 4.4.1 verwendete Zellzahl eingesetzt. Für die drei Probanden (n1, n2, n3) ist jeweils der Mittelwert \pm SD von ≥ 3 technischen Replikaten dargestellt.

Tab. 4.4.1: Mithilfe der Aktivitätsassays bestimme Proteasemengen in isolierten humanen neutrophilen Granulozyten. Dargestellt ist die mit den Aktivitätsassays quantifizierte Menge der GASPIDs in aus menschlichen Blutproben isolierten humanen neutrophilen Granulozyten. Mittelwert \pm SD.

<u>GASPID</u>	<u>Protease pro Zelle [pg]</u>
Elastase	1,9 \pm 0,4
Cathepsin G	1,5 \pm 0,05
Proteinase 3	5,9 \pm 0,3
Tryptase	nicht detektierbar
Chymase	nicht detektierbar

Die im Rahmen der Arbeit entwickelten Assays sind damit sensitiv und spezifisch genug, um die Aktivität der GASPIs und von Cathepsin C im Isolat zu detektieren. Sie können somit auch im Isolat humaner neutrophiler Granulozyten zur Quantifizierung der Proteasen genutzt werden (Tab. 4.4.1).

5 Diskussion

Die sog. Granula-assoziierten Serinproteasen der Immunabwehr („GASPIDs“) werden von Granulozyten, Lymphozyten und Mastzellen exprimiert. Sie werden als Zymogene synthetisiert, während der Biogenese durch die Cysteinprotease Cathepsin C aktiviert und anschließend enzymatisch aktiv in zytoplasmatischen Granula gespeichert. GASPIDs sind elementar an der regelrechten Funktion des Immunsystems beteiligt, spielen aber auch eine zentrale Rolle bei der Entstehung verschiedener Erkrankungen wie u. a. dem Asthma bronchiale, dem Lungenemphysem oder der rheumatoiden Arthritis. Deshalb gewinnen die GASPIDs als Mediatoren, als Ansatzpunkt zur Aufklärung pathophysiologischer Zusammenhänge und als potentielles Ziel pharmakologischer Behandlungsstrategien zunehmend an Bedeutung [8, 83]. Die bisher zur Detektion und Quantifizierung der GASPIDs eingesetzten Immunoassays können allerdings nicht zwischen den reifen, aktiven Proteasen und inaktiven Formen wie Zymogenen oder Protease-Inhibitor-Komplexen unterscheiden [97, 104]. Die Verwendung aktivitätsbasierter Assays zur Quantifizierung des aktiven und damit (patho-)physiologisch wirksamen Anteils der Proteasen ist deshalb wünschenswert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Aktivitätsassays für fünf GASPIDs, i. e. humane Neutrophilen-Elastase, Cathepsin G, Proteinase 3, Tryptase und Chymase, entwickelt und validiert. Mithilfe der Assays wurde dann die GASPID-Aktivität im Lysat verschiedener Neutrophilen- und Mastzelllinien detektiert und die Menge aktiver Protease in den Zellen quantifiziert. Unter analogen Bedingungen wurde außerdem ein Aktivitätsassay für Cathepsin C, den Aktivator der GASPIDs, etabliert. Abschließend wurden im Rahmen einer Pilotstudie neutrophile Granulozyten aus menschlichen Vollblutproben isoliert und die Menge aktiver GASPIDs im Lysat dieser Zellen quantifiziert.

5.1 Sensitivität

Zur Assayentwicklung wurden 14 verschiedene Peptidsubstrate, die in der Literatur zur Detektion von GASPID-Aktivität verwendet worden sind, aber zuvor noch nicht systematisch miteinander verglichen wurden, ausgewählt (Tab. 5.1).

Tab. 5.1: Im Rahmen der Assayentwicklung überprüfte Substrate.

<u>GASPID</u>	<u>Substrat</u>	<u>Quellenbeispiel</u>
Elastase	MeOSuc-AAPV-AMC	Budnjo A et al., 2014 [109]
	MeOSuc-AAPV-pNA	Benabid R et al., 2014 [110]
	Suc-AAA-pNA	Wiesner et al., 2005 [111]
Cathepsin G	Suc-AAPF-AMC	Burster T et al., 2004 [112]
	Suc-LLVY-AMC	Giguere CJ et al., 2008 [113] ¹
	Suc-VPF-pNA	Powers JC et al., 1985 [114]
	Suc-AAPF-pNA	Guerra M et al., 2019 [115]
	Suc-AVPF-pNA	Méthot N et al., 2007 [104]
Proteinase 3	Abz-VADnVRDRQ-EDDnp	Korkmaz B et al., 2008 [116]
	Abz-VADnVADYQ-EDDnp	Guarino C et al., 2014 [117]
Tryptase	tos-GPR-AMC	Oh SW et al., 2002 [118]
	tos-GPK-AMC	Grundhuber M, 2016 [119]
	tos-GPR-pNA	Burgess LE et al., 1999 [120]
	tos-GPK-pNA	Le QT et al., 2011 [121]
Chymase	Suc-AAPF-AMC	Semaan W et al., 2015 [122]
	Suc-LLVY-AMC	Semaan W et al., 2015 [122]
	Suc-VPF-pNA	Raymond WW et al., 2009 [123]
	Suc-AAPF-pNA	Guerra M et al., 2019 [115]
	Suc-AVPF-pNA	Plotnick MI et al., 2002 [124]

¹Das Substrat Suc-LLVY-AMC ist bisher nicht zur Detektion der Cathepsin G-Aktivität untersucht worden. Es ist jedoch die bevorzugte Spaltung von Cathepsin G C-terminal der Aminosäuren Leucin und Tyrosin beschrieben [113].

Insgesamt wurden 19 Enzym- und Substratkombinationen hinsichtlich ihrer Sensitivität miteinander verglichen. Zwar detektieren alle überprüften Substrate die jeweilige GASPID, jedoch zeigen sich untereinander Sensitivitätsunterschiede von bis zu drei Dekaden. So detektiert beispielsweise das Substrat Suc-VPF-pNA Cathepsin G in Konzentrationen < 1,25 nM, während das Substrat Suc-AAPF-pNA die gleiche Protease in Konzentrationen > 25 nM detektiert, obwohl beide Substrate

die gleiche Detektionsmethode nutzen und sich nur in ihrer Peptidsequenz unterscheiden.

Die überprüften Substrate unterscheiden sich nicht nur in ihrer Peptidsequenz, sondern auch in ihrer Detektionsmethode (fluorogene AMC- und FRET-Substrate vs. chromogene pNA-Substrate). Üblicherweise sind fluorogene Substrate um den Faktor 10 - 1 000 sensitiver als chromogene Substrate [125]. So wird z. B. Trypsin vom chromogenen Substrat tos-GPK-AMC etwa zehnmal sensitiver detektiert als vom fluorogenen Substrat tos-GPK-pNA, obwohl beide Substrate die gleiche Peptidsequenz aufweisen und sich nur in ihrer Detektionsmethode unterscheiden. Fluorogene Substrate sind deshalb eigentlich vorzuziehen, auch da sie ein material- und kosteneffizientes Arbeiten ermöglichen: Bei sensitiverer Detektion genügt eine geringere Substratkonzentration zur Detektion der gleichen Menge an Protease. So wurden im Rahmen dieser Arbeit standardmäßig die AMC-Substrate in einer Konzentration von 10 μM und die pNA-Substrate bei 200 μM eingesetzt.

Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass teilweise die pNA-Substrate die jeweilige GASPID sensitiver detektieren als die AMC-Substrate. So ist das Substrat Suc-AAPF-pNA zur Detektion von Cathepsin G oder Chymase etwa doppelt so sensitiv wie das analoge AMC-Substrat mit gleicher Peptidsequenz. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die pNA-Gruppe in der P₁-Position besser akzeptiert wird als das AMC.

Für jede Protease wurde das sensitivste Substrat ausgewählt, welches die Zielprotease im nanomolaren Bereich detektiert. Die Sensitivität dieser ausgewählten Peptidsubstrate erschien damit ausreichend für den angestrebten Zweck der Detektion im Zelllysate, wo Proteasemengen von wenigen Picogramm pro Zelle vorliegen [126]. Für Elastase, Proteinase 3 und Trypsin wurde ein fluorogenes Substrat, für Cathepsin G und Chymase das chromogene Substrat Suc-VPF-pNA als sensitivstes Substrat ausgewählt. Zur eigentlich angestrebten homogenen Assaydurchführung mit rein fluorogenen Substraten wurde initial auch das weniger sensitive Suc-AAPF-AMC weitergeführt; ein fluorogenes Analogon zu Suc-VPF-pNA, i. e. Suc-VPF-AMC, ist aktuell leider nicht kommerziell verfügbar.

5.2 Selektivität und Spezifität

Die GASPIDs sind strukturell und funktionell eng miteinander verwandt. So weisen Elastase und Proteinase 3 beide elastolytische Aktivität sowie Cathepsin G und Chymase jeweils chymotryptische Aktivität und somit eine sehr ähnliche Substratspezifität auf [115, 127]. Damit besteht die Möglichkeit, dass die ausgewählten Substrate durch mehrere GASPIDs gespalten werden, die Assays also nicht spezifisch sind. Deshalb wurden alle ausgewählten Substrate hinsichtlich der Spaltung durch alle fünf untersuchten GASPIDs überprüft.

Wie zu erwarten zeigen die Ergebnisse, dass die chymotryptischen Substrate Suc-VPF-pNA und Suc-AAPF-AMC beide sowohl durch Cathepsin G als auch Chymase gespalten werden; die Detektion von Chymase ist dabei jedoch etwa um den Faktor 5 - 10 sensitiver. Dieses Ergebnis ist konkludent, da Chymase in der Literatur unter gleichen Bedingungen eine etwa zehnfach höhere intrinsische Aktivität als Cathepsin G aufweist [128]. Eine Diskriminierung zwischen Cathepsin G und Chymase ist damit bei Nutzung der verfügbaren Substrate aktuell nicht möglich. Während der laufenden Arbeit wurden durch Fu Z *et al.* (2017) über 50 natürliche Substrate hinsichtlich der Spaltung durch Cathepsin G und Chymase miteinander verglichen [129]: Während Cathepsin G eine Vielzahl der Substrate spaltet, werden durch Chymase nur vier der überprüften Substrate gespalten. Diese Ergebnisse können zukünftig potentiell zur Entwicklung selektiver Peptidsubstrate für Cathepsin G und Chymase genutzt werden.

Analog wurde das Elastase-Substrat MeOSuc-AAPV-AMC auch durch Proteinase 3 gespalten. Beide Proteasen bevorzugen bei der Substratspaltung Aminosäuren mit aliphatischer Seitenkette an der P₁-Stelle [130]. Allerdings zeigte sich bei der Detektion ein fünffacher Sensitivitätsunterschied zugunsten von Elastase. Außerdem wird das Proteinase 3-Substrat Abz-VADnVRDRQ-EDDnp nicht durch Elastase gespalten. Eine Unterscheidung beider Proteasen ist damit durch Subtraktion der im Proteinase 3- bzw. im Elastase-Assay gemessenen Aktivität möglich.

Aufgrund der eingeschränkten Selektivität dieser Assays wurden zur Unterscheidung der GASPIDs zusätzlich verschiedene Inhibitoren eingesetzt, um die Spezifität zu erhöhen. Der initial verwendete Inhibitor CGI-1, der als

Cathepsin G-spezifisch beschrieben wurde [131], hemmt jedoch auch die Chymase-Aktivität. Als weiterer Inhibitor wurde deshalb Aprotinin eingesetzt, welches zwar Cathepsin G, nicht jedoch Chymase inhibiert; dieses Ergebnis deckt sich mit der Literatur [128, 132]. Die Cathepsin G-Aktivität einer Probe kann damit durch Subtraktion der nach Inkubation mit Aprotinin verbliebenen Restaktivität von der Gesamtaktivität bestimmt werden. Die Unterscheidung von Cathepsin G- und Chymase-Aktivität ist somit trotz eingeschränkter Substratselektivität mithilfe der entwickelten Assays möglich.

Sowohl im Elastase- als auch im Proteinase 3-Assay wurde Sivelestat als Inhibitor überprüft. In der Literatur wurde Sivelestat initial als selektiver Elastase-Inhibitor beschrieben [133]. Mehrere Studien haben aber eine Inhibition von sowohl Elastase als auch Proteinase 3 gezeigt [134, 135]. Entsprechend hemmt Sivelestat in den entwickelten Assays nicht nur Elastase, sondern auch Proteinase 3. Eine Differenzierung von Elastase- und Proteinase 3-Aktivität ist durch die entwickelten Assays jedoch möglich, da im Proteinase 3-Assay keine Elastase detektiert wird. Es ist zu erwarten, dass zukünftig selektive Inhibitoren für beide Proteasen verfügbar sind; die Entwicklung eines selektiven Proteinase 3-Inhibitors ist beschrieben, der jedoch noch nicht kommerziell verfügbar ist [37].

5.3 GASPIDs in Zelllysaten

Um zu überprüfen, ob die Assays geeignet sind, die Aktivität der GASPIDs auch im Zelllysat zu detektieren, wurden verschiedene Zelllinien untersucht. Dazu wurde zunächst überprüft, ob Aktivität im LySAT der Zelllinien, die die jeweilige Protease charakteristischerweise exprimieren, gemessen werden kann. Da im Zelllysat neben den GASPIDs eine Vielzahl weiterer Proteasen vorliegt, folgte die Überprüfung der Spezifität im Zellmodell mithilfe der etablierten Inhibitoren.

Wie zu erwarten wurde mit dem Elastase-Assay Aktivität in U937-Lysat, mit dem Tryptase-Assay Aktivität in HMC-1-Lysat detektiert. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Erwartung, da U937-Zellen nachgewiesenermaßen Elastase, HMC-1-Zellen hingegen Tryptase exprimieren [136, 137]. Mit dem Cathepsin G-/Chymase-Substrat Suc-AAPF-AMC wurde in allen untersuchten Zelllinien, auch in Fibroblasten, Aktivität detektiert. Zwar ist in der Literatur beschrieben, dass

Fibroblasten auf besondere Stimuli wie z. B. hohe Glucose-Konzentrationen hin Chymase exprimieren können [138, 139], dies ist jedoch unter den verwendeten Kulturbedingungen unwahrscheinlich. Außerdem ist die Aktivität weder durch CGI-1 noch durch Aprotinin hemmbar. Das fluorogene Substrat Suc-AAPF-AMC detektiert also auch die Aktivität anderer Proteasen mit chymotryptischer Aktivität, dafür kommt z. B. auch das Proteasom in Betracht. Das Substrat scheidet damit für die Entwicklung eines Cathepsin G-/Chymase-Assays aus; eine homogene Assaydurchführung ausschließlich mit fluorogenen Substraten ist somit aktuell leider nicht möglich.

Auch das Proteinase 3-Substrat detektiert Aktivität nicht nur in der Neutrophilen-Vorläuferzelllinie U937, die Proteinase 3 exprimiert [140]. Geringe Mengen wurden auch in allen anderen untersuchten Zelllinien nachgewiesen, obwohl sie die Protease nicht exprimieren. Dazu kommt, dass nur die in U937-Zellen detektierte Aktivität durch Sivelestat inhibiert wird, wenn auch nur zu 75 %. Diese Ergebnisse zeigen, dass das verwendete FRET-Substrat Abz-VADnVRDRQ-EDDnp nicht für Proteinase 3 spezifisch ist, sondern auch von anderen zellulären Proteasen gespalten wird. Dies ist insofern nicht verwunderlich, da das Substrat viele Spaltstellen bietet und bei Spaltung an jeder Stelle der Peptidsequenz ein Signal erzeugt. Eine Messung der Proteinase 3-Aktivität ist mithilfe des entwickelten Proteinase 3-Assays durch Subtraktion der nach Inkubation mit Sivelestat gemessenen Restaktivität von der Gesamtaktivität ohne Inhibitoreinfluss dennoch möglich. Es sind weitere Versuche nötig, um aufzuklären, welche Proteasen vom verwendeten FRET-Substrat zusätzlich detektiert werden, insbesondere da das Substrat Abz-VADnVRDRQ-EDDnp als selektives Substrat für Proteinase 3 publiziert wurde [116].

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die entwickelten Assays zusammen mit den Inhibitoren geeignet erscheinen, um die GASPIDs in den Zelllysaten zu quantifizieren; die GASPIDs wurden generell in den Zelllinien detektiert, in denen ihre Expression beschrieben oder erwartet wurde. Um diese Ergebnisse zusätzlich zu validieren, wurden Western Blots zum Nachweis der fünf GASPIDs durchgeführt. Qualitativ zeigt sich eine sehr gute Korrelation zwischen den mittels Western Blot und Aktivitätsassays gewonnenen Ergebnissen. So sind wie zu erwarten Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3 im U937-Lysat und Tryptase im HMC-1-Lysat auch

immunreaktiv nachweisbar, Chymase hingegen wird in keiner der untersuchten Zelllinien detektiert. Auch quantitativ korrelieren die Ergebnisse der Aktivitätsassays gut mit denen der Western Blots: So wird sowohl mittels Western Blot als auch mittels Aktivitätsassay eine Menge von 0,3 pg/Zelle Proteinase 3 im U937-Lysat quantifiziert. Die Menge an Cathepsin G wird im Immunoassay tendenziell etwas niedriger quantifiziert als im Aktivitätsassay (0,5 vs. 0,8 pg/Zelle in U937). Für Tryptase hingegen liegt die im Western Blot ermittelte Menge mit 0,3 pg/Zelle etwas höher als im Aktivitätsassay mit 0,06 pg/Zelle. Dies kann ggf. darauf zurückzuführen sein, dass in immunreaktiven Assays auch inaktive Proteaseformen (z. B. Zymogene, Protease-Inhibitor Komplexe) detektiert werden [105]. Der Nachweis von Elastase gelang mittels Western Blot lediglich semiquantitativ, was eine immunreaktive Quantifizierung limitiert.

Die mithilfe der Aktivitätsassays ermittelten Proteasemengen stehen auch in Einklang mit der Literatur, soweit dort Daten zum Proteasengehalt der überprüften Zelllinien verfügbar sind: Senior RM *et al.* (1984) beschrieben, dass U937-Zellen Cathepsin G-Mengen von etwa 1 pg/Zelle enthalten [141]. Dies korreliert gut mit der im Aktivitätsassay bestimmten Menge von $0,8 \pm 0,5$ pg/Zelle. Auch die im HMC-1-Lysat gemessene Tryptase-Menge ($0,06 \pm 0,005$ pg/Zelle) stimmt weitgehend mit Angaben früherer Arbeiten (0,05 pg/Zelle) überein [137, 142]. Zusammenfassend scheinen die Assays damit eine geeignete Methode zu sein, um die Menge aktiver GASPIDs im Zelllysate zu quantifizieren.

5.4 Cathepsin C

Alle GASPIDs werden als Zymogene synthetisiert und während der Biogenese durch Cathepsin C aktiviert [2]. Analog der Assays für die GASPIDs wurde deshalb auch ein Aktivitätsassay für Cathepsin C entwickelt.

Zunächst wurden die Substrate H-GR-AMC und H-GF-AMC hinsichtlich ihrer Sensitivität miteinander verglichen. Obwohl H-GF-AMC in bisherigen Arbeiten häufiger als Cathepsin C-Substrat aufgeführt wird, zeigte H-GR-AMC eine 30-fach höhere Sensitivität, weshalb H-GR-AMC als Substrat weitergeführt wurde. Bei der Übertragung auf das Zellmodell wurde Aktivität in Neutrophilen- und Mastzelllinien

detektiert, nicht jedoch in Fibroblasten. Cathepsin C wird als ubiquitäre Cysteinprotease in einer Vielzahl von Zellen, Geweben und Organen exprimiert. Bisher sind in der Literatur keine Daten vorhanden, ob auch die Fibroblasten-Vorläuferzelllinie HT-1080 Cathepsin C exprimiert. Allerdings wurde Cathepsin C bereits in reifen Fibroblasten nachgewiesen [143, 144]. Zukünftig sollte mithilfe alternativer Methoden wie Western Blot und PCR validiert werden, ob HT-1080-Zellen tatsächlich kein Cathepsin C exprimieren [145].

Der entwickelte Assay ist sensitiv und spezifisch genug zur Detektion und Quantifizierung der Cathepsin C-Aktivität im Zelllysat. Als Aktivator aller GASPIDs nimmt Cathepsin C eine Schlüsselposition im Proteasennetzwerk der GASPIDs ein und ist ein alternatives Ziel zur Modulation der GASPID-Aktivität. Die Quantifizierung von Cathepsin C ist deshalb auch im Hinblick auf therapeutische Optionen bei den durch GASPIDs mitverursachten Erkrankungen von Bedeutung [8, 83]. So untersuchen neuere Arbeiten bereits verstärkt die Auswirkungen von Cathepsin C-Inhibition auf die Aktivität und pathophysiologische Funktion der GASPIDs [105]: Verschiedene Autoren bestätigen dabei, dass im Zellmodell Level an Cathepsin C-Inhibition von mindestens 50 % notwendig sind, um eine signifikante Aktivitätsreduktion der GASPIDs zu erzielen [81, 82]. Der Cathepsin C-Inhibitor *Brensocatib* wird bereits mittels klinischer Studien zur Behandlung des Non-CF Bronchiektaseleidens, welches u.a. durch Neutrophilen-Elastase vermittelt wird, überprüft [146, 147]. Die Ergebnisse der Phase-II-Studie sind so vielversprechend, dass Phase-III-Studien zeitnah folgen sollen [146].

5.5 Standards

Bei der Etablierung aller Aktivitätsassays und als Standard für die Quantifizierung wurden für jede der GASPIDs eine isolierte oder rekombinant hergestellte Protease eingesetzt. Aus den mit diesen Proteinen gewonnenen Ergebnissen ließen sich dann die Standardbedingungen jedes Assays ableiten. Für Trypsase und Chymase standen rekombinante Proteasen, für Neutrophilen-Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3 hingegen „nur“ isolierte Proteasen zur Verfügung.

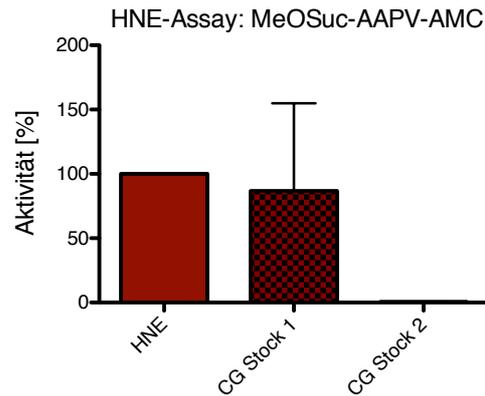


Abb. 5.1: Verunreinigung kommerziell erworbener isolierter Protease Cathepsin G. Die Abbildung zeigt die Spaltung des Elastase-Substrats MeOSuc-AAPV-AMC durch isolierte Neutrophilen-Elastase und zwei verschiedene Chargen von isoliertem Cathepsin G. Aufgrund des Sensitivitätsunterschieds der Assays wurden 2 nM Elastase und 100 nM Cathepsin G eingesetzt. Mittelwert \pm SD, $n \geq 2$.

Bei der Entwicklung des Elastase-Assays fiel auf, dass in initialen Assays nicht nur Elastase, sondern auch isoliertes Cathepsin G durch das Substrat MeOSuc-AAPV-AMC detektiert wurde (Abb. 5.1). Obwohl die Spaltung von MeOSuc-AAPV-AMC durch Cathepsin G in der Literatur bisher nicht beschrieben worden ist, konnte das Ergebnis mehrfach reproduziert werden. Bei Einsatz einer neuen Charge des kommerziell bezogenen Cathepsin G war jedoch keine Spaltung von MeOSuc-AAPV-AMC mehr nachweisbar. Aufgrund des Sensitivitätsunterschieds der Assays wurden nur 2 nM Elastase, hingegen 100 nM Cathepsin G eingesetzt. Das verwendete Cathepsin G wurde aus humanen neutrophilen Granulozyten isoliert und weist laut Herstellerangaben eine Reinheit von > 95 % auf. Eine geringfügige Verunreinigung mit anderen Proteasen aus neutrophilen Granulozyten wie beispielsweise Elastase ist deshalb nicht ausgeschlossen. Aufgrund der hohen Sensitivität des entwickelten Elastase-Assays genügen dabei bereits Konzentrationen von weniger als 0,5 nM Elastase, um im Assay detektiert zu werden. Dies verdeutlicht, dass Daten auch bei Einsatz von anerkannten und kommerziell verfügbaren Standards kritisch zu hinterfragen sind. Zur „Standardisierung“ der eingesetzten Standards stehen Methoden wie z. B. die Titration oder N-terminale Sequenzierung zur Verfügung, welche in zukünftigen Arbeiten folgen soll [148].

5.6 Pilotstudie: Anwendung der GASPID-Assays auf isolierte humane neutrophile Granulozyten

Zur Überprüfung, ob die entwickelten Assays geeignet sind, GASPID-Aktivität auch im Lysat humaner neutrophiler Granulozyten zu quantifizieren, wurden neutrophile Granulozyten aus Vollblutproben isoliert und in deren Lysat die Aktivität der GASPIDs und von Cathepsin C bestimmt.

Alle entwickelten Assays sind sensitiv genug zur Detektion der GASPID-Aktivität in isolierten neutrophilen Granulozyten. Es genügen dafür bereits Zellzahlen von weniger als 5 000 Zellen pro Aktivitätsassay. Zur Durchführung aller entwickelten Assays werden somit weniger als 25 000 Zellen benötigt, welche mithilfe der verwendeten Isolationsmethode aus weniger als 1 ml Vollblut isoliert werden können. Standardmäßig zur Blutentnahme eingesetzte EDTA-Röhrchen (z. B. S-Monovette® der Firma Sarstedt) haben ein Fassungsvermögen von 2,7 ml [149]. Die Anwendung der hier etablierten Methode ist also auch im klinischen Kontext gut praktikabel.

Ebenfalls sind alle Aktivitätsassays spezifisch genug zur Detektion der GASPID-Aktivität im Neutrophilenlysate, da die gemessene Aktivität in allen Assays durch Einsatz der etablierten Inhibitoren auf < 5 % hemmbar ist. Dabei erscheint die hohe Spezifität des Proteinase 3-Assays auf den ersten Blick überraschend, da die Detektion in Lysaten der Zelllinien nur eingeschränkt spezifisch ist. Allerdings wurden bei der Untersuchung der Zelllinien bis zu 100 000 Zellen eingesetzt, dagegen bei der Untersuchung isolierter Neutrophiler nur 10 000 Zellen. Aufgrund der zehnfach geringeren Zellzahl sind damit auch weniger Störfaktoren wie Proteasen mit ähnlicher Substratspezifität im Assay vorhanden.

Die mithilfe der Aktivitätsassays bestimmten Mengen der GASPIDs in isolierten humanen neutrophilen Granulozyten sind gut mit der Literatur vereinbar. So werden im Aktivitätsassay Elastase-Mengen von $1,9 \pm 0,4$ pg/Zelle quantifiziert, während in der Literatur Werte von 0,5 - 3 pg/Zelle angegeben werden [150]. Im Aktivitätsassay werden Cathepsin G-Mengen von $1,5 \pm 0,05$ pg/Zelle detektiert. Attucci S *et al.* (2002) beschrieben, dass neutrophile Granulozyten an ihrer Oberfläche 0,02 - 0,7 pg/Zelle enthalten, was 10 - 20 % ihres Gesamtgehalts an

Cathepsin G entsprechen soll und somit mit der im Rahmen der Arbeit quantifizierten Menge korreliert [151]. Die quantifizierte Menge an Proteinase 3 liegt im Aktivitätsassay etwas höher als in der Literatur zu finden ($5,9 \pm 0,3$ pg/Zelle im Assay vs. 3,25 pg/Zelle in der Literatur) [152].

5.7 Ausblick

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, aktivitätsbasierte Assays zur Quantifizierung der GASPIDs und von Cathepsin C der neutrophilen Granulozyten und Mastzellen zu entwickeln. Die Ergebnisse der Arbeit bestätigen dabei den gewählten experimentellen Ansatz weitgehend. So sind die entwickelten Assays geeignet, GASPID-Aktivität auch in Zelllysaten reproduzierbar zu detektieren. Die Assays bieten damit erstmalig die Möglichkeit, die Mengen aller fünf untersuchten GASPID-Vertreter aktivitätsbasiert zu quantifizieren.

Allerdings wurden durch den Vergleich einer Vielzahl von Peptidsubstraten deutliche Sensitivitätsunterschiede der aktuell in der Literatur verwendeten Substrate [109-124] aufgedeckt. Da im Cathepsin G- und Chymase-Assay die überprüften pNA-Substrate überraschenderweise sensitiver als die verfügbaren AMC-Substrate sind, ist eine homogene Assaydurchführung mit ausschließlich fluorogenen Substraten aktuell leider nicht möglich. Für die Zukunft ist die Entwicklung eines sensitiven und selektiven Cathepsin G-/Chymase-Substrats, welches beispielsweise Suc-VPF-AMC darstellen könnte, anzustreben.

Die Versuche zur Spezifität offenbarten, dass der Inhibitor Sivelestat - initial als selektiver Elastase-Inhibitor beschrieben [133] - neben Elastase- auch Proteinase 3-Aktivität inhibiert. Die Unterscheidung von Elastase- und Proteinase 3-Aktivität ist durch die entwickelten Assays dennoch möglich, da im Proteinase 3-Assay keine Elastase detektiert wird. Die Entwicklung selektiver Elastase- und Proteinase 3-Inhibitoren ist zu erwarten. In aktuellen Arbeiten finden sich bereits Studien zur Generierung eines spezifischen Proteinase 3-Inhibitors, welcher jedoch noch nicht kommerziell verfügbar ist [37].

Im Proteinase 3-Assay wurde ein gequenches FRET-Substrat (Abz-VADnVRDRQ-EDDnp) verwendet, welches als selektives Proteinase 3-

Substrat gilt [116]. Aufgrund der Länge der Peptidsequenz hat es jedoch viele Spaltstellen, und bei Spaltung an jeder Stelle der Peptidsequenz wird ein Signal erzeugt. Das Substrat ist damit anfällig für Störfaktoren, i. e. Proteasen mit ähnlicher Substratspezifität wie Proteinase 3. So ist die in Modellzelllinien gemessene Aktivität im Proteinase 3-Assay auch nur bedingt mit Sivelestat hemmbar. Die Entwicklung eines spezifischen Proteinase 3-Substrats, wie beispielsweise eines AMC-Substrats, ist wünschenswert.

Zur Assayetablierung wurden für jede GASPID und Cathepsin C isolierte bzw. rekombinante Proteasen eingesetzt. Die Versuche der Arbeit deckten eine Verunreinigung der kommerziell bezogenen isolierten Protease Cathepsin G auf. Daten sind also auch bei Verwendung der kommerziell verfügbaren Standards kritisch zu hinterfragen. In zukünftigen Arbeiten soll deshalb eine „Standardisierung“ der Standards mittels z. B. Titration und N-terminaler Sequenzierung folgen.

Durch den Einsatz isolierter neutrophiler Granulozyten wurde die Übertragbarkeit der Assays auf humane neutrophile Granulozyten demonstriert. Da GASPIDs an der Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen beteiligt sind, ist ihre Quantifizierung in neutrophilen Granulozyten und Mastzellen nicht nur diagnostisch, sondern auch therapeutisch (z. B. zur Überprüfung der pharmakologischen Wirksamkeit von Inhibitoren) von hoher klinischer Relevanz [8, 83]. Den Pilotstudien sollten nun insbesondere im Hinblick auf Reliabilität und Schwankungsbreite der Assays Arbeiten mit größerem Probenkollektiv folgen, um die Assays zu optimieren.

Die im Rahmen der Arbeit entwickelten Aktivitätsassays ermöglichen die reproduzierbare Detektion und Quantifizierung aller überprüften GASPIDs und von Cathepsin C. Die Assays bieten damit die Möglichkeit, das komplexe Proteasennetzwerk „GASPIDs“ sowie die Interaktion der GASPIDs mit ihrem Aktivator Cathepsin C weiter zu entschlüsseln.

Literaturverzeichnis

1. Ahmad J, Bird PI, Kaiserman D. Analysis of the evolution of granule associated serine proteases of immune defence (GASPsIDs) suggests a revised nomenclature. *Biol Chem*, 2014 Oct; 395(10): 1253-62.
2. Caughey GH. A Pulmonary Perspective on GASPsIDs: Granule-Associated Serine Peptidases of Immune Defense. *Curr Respir Med Rev*, 2006 August; 2(39): 263–277.
3. Akula S, Thorpe M, Boinapally V, Hellman L. Granule Associated Serine Proteases of Hematopoietic Cells – An Analysis of Their Appearance and Diversification during Vertebrate Evolution. *PLoS One*, 2015 Nov 16; 10(11): e0143091.
4. Trivedi NN, Caughey GH. Mast cell peptidases: chameleons of innate immunity and host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010 Mar; 42(3): 257-67.
5. McGuire MJ, Lipsky PE, Thiele DL. Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I. *J Biol Chem*, 1993 Feb 5; 268(4): 2458-67.
6. Sakai K, Ren S, Schwartz LB. A novel heparin-dependent processing pathway for human tryptase: autocatalysis followed by activation with dipeptidyl peptidase I. *J Clin Invest*, 1996 Feb 15; 97(4): 988-95.
7. Murakami M, Karnik SS, Husain A. Human prochymase activation. A novel role for heparin in zymogen processing. *J Biol Chem*, 1995 Feb 3; 270(5): 2218-23.
8. Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F. Neutrophil Elastase, Proteinase 3, and Cathepsin G as Therapeutic Targets in Human Diseases. *Pharmacol Rev*, 2010 Dec; 62(4): 726-59.
9. Caughey GH. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunol Rev*, 2007 Jun; 217: 141-54.
10. Bots M, Medema JP. Granzymes at a glance. *J Cell Sci*, 2006 Dec 15; 119(24): 5011-4.
11. Polgár L (2013). Catalytic Mechanisms of Serine and Threonine Peptidases. In Rawlings ND, Salvesen G (Hrsg.), *Handbook of Proteolytic Enzymes, Volume 3*; pp. 2524-34. London, Waltham, San Diego: Academic Press.
12. Lee WL, Downey GP. Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001 Sep 1; 164(5): 896-904.
13. Belaaouaj A. Neutrophil elastase-mediated killing of bacteria: lessons from targeted mutagenesis. *Microbes Infect*, 2002 Oct; 4(12): 1259-64.
14. Belaaouaj A, Kim KS, Shapiro SD. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science*, 2000 Aug 18; 289(5482): 1185-8.

15. Weinrauch Y, Drujan D, Shapiro SD, Weiss J, Zychlinsky A. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature*, 2002 May; 417(6884): 91-4.
16. Belaaouaj A *et al.* Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med*, 1998 May; 4(5): 615-8.
17. Chua F, Laurent GJ. Neutrophil elastase: mediator of extracellular matrix destruction and accumulation. *Proc Am Thorac Soc*, 2006 Jul; 3(5): 424-7.
18. Porteu F, Brockhaus M, Wallach D, Engelmann H, Nathan CF. Human neutrophil elastase releases a ligand-binding fragment from the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor. Comparison with the proteolytic activity responsible for shedding of TNF receptors from stimulated neutrophils. *J Biol Chem*, 1991 Oct 5; 266(28): 18846-53.
19. Kuhn C, Senior RM. The role of elastases in the development of emphysema. *Lung*, 1978 Dec; 155(1): 185-197.
20. Moore A *et al.* Destruction of articular cartilage by alpha 2 macroglobulin elastase complexes: role in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 1999 Feb; 58(2): 109-113.
21. Kelly E, Greene CM, McElvaney NG. Targeting neutrophil elastase in cystic fibrosis. *Expert Opin Ther Targets*, 2008 Feb; 12(2): 145-57.
22. Liu Z *et al.* A critical role for neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest*, 2000 Jan 1; 105(1): 113-123.
23. Watorek W, Farley D, Salvesen G, Travis J. Neutrophil elastase and cathepsin G: structure, function, and biological control. *Adv Exp Med Biol*, 1988; 240: 23-31.
24. Helske S *et al.* Possible role for mast cell-derived cathepsin G in the adverse remodelling of stenotic aortic valves. *Eur Heart J*, 2006 Jun; 27(12): 1495-504.
25. Stapels DA, Geisbrecht BV, Rooijackers SH. Neutrophil serine proteases in antibacterial defense. *Curr Opin Microbiol*, 2015 Feb; 23: 42-48.
26. Ottonello L, Epstein AL, Mancini M, Dapino P, Dallegri F. Monoclonal LYM-1 antibody-dependent cytolysis by human neutrophils exposed to GM-CSF: auto-regulation of target cell attack by cathepsin G. *J Leukoc Biol*, 2004 Jan; 75(1): 99-105.
27. Raptis SZ, Shapiro SD, Simmons PM, Cheng AM, Pham CT. Serine protease cathepsin G regulates adhesion-dependent neutrophil effector functions by modulating integrin clustering. *Immunity*, 2005 Jun; 22(6): 679-91.
28. MacIvor DM, Shapiro SD, Pham CT, Belaaouaj A, Abraham SN, Ley TJ. Normal neutrophil function in cathepsin G-deficient mice. *Blood*, 1999 Dec; 94(12): 4282-93.
29. Adkison AM, Raptis SZ, Kelley DG, Pham CT. Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis. *J Clin Invest*, 2002 Feb; 109(3): 363-71

30. Braun MG, Csernok E, Gross WL, Müller-Hermelink HK. Proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies circulating in Wegener's granulomatosis. Immunolocalization in normal and pathologic tissues. *Am J Pathol*, 1991 Oct; 139(4): 831-8.
31. Karatepe K *et al.* Proteinase 3 Limits the Number of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in Murine Bone Marrow. *Stem Cell Reports*, 2018 Nov 13; 11(5): 1092-105.
32. Campanelli D, Detmers PA, Nathan CF, Gabay JE. Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. Differential antimicrobial and proteolytic properties. *J Clin Invest*, 1990 Mar; 85(3):904-15.
33. Korkmaz B, Jaillet J, Jourdan ML, Gauthier A, Gauthier F, Attucci S. Catalytic Activity and Inhibition of Wegener Antigen Proteinase 3 on the Cell Surface of Human Polymorphonuclear Neutrophils. *J Biol Chem*, 2009 Jul 24; 284(30): 19896-902.
34. Wu YY *et al.* Proteinase 3 and dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) are major autoantigens in hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol*, 2002 May; 128(2): 347-52
35. Korkmaz B *et al.* Inhibitors and Antibody Fragments as Potential Anti-Inflammatory Therapeutics Targeting Neutrophil Proteinase 3 in Human Disease. *Pharmacol Rev*, 2016 Jul; 68(3): 603-30.
36. Hajjar E, Broemstrup T, Kantari C, Witko-Sarsat V, Reuter N. Structures of human proteinase 3 and neutrophil elastase - so similar yet so different. *FEBS J*, 2010 May; 277(10): 2238-54.
37. Korkmaz B, Kellenberger C, Viaud-Massuard MC, Gauthier F. Selective inhibitors of human neutrophil proteinase 3. *Curr Pharm Des*, 2013; 19(6): 966-76
38. Sheth PD, Pedersen J, Walls AF, McEuen AR. Inhibition of dipeptidyl peptidase I in the human mast cell line HMC-1: blocked activation of tryptase, but not of the predominant chymotryptic activity. *Biochem Pharmacol*, 2003 Dec 1; 66(11): 2251-62.
39. Sommerhoff CP, Schaschke N. Mast cell tryptase beta as a target in allergic inflammation: an evolving story. *Curr Pharm Des*, 2007; 13(3): 313-32.
40. He S, Walls AF. Human mast cell tryptase: a stimulus of microvascular leakage and mastcell activation. *Eur J Pharmacol*, 1997 Jun 5; 328(1): 89-97.
41. Proud D, Siekierski ES, Bailey GS. Identification of human lung mast cell kininogenase as tryptase and relevance of tryptase kininogenase activity. *Biochem Pharmacol*, 1988 Apr 15; 37(8): 1473-80.
42. Payne V, Kam PC. Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance. *Anaesthesia*, 2004 Jul; 59(7): 695-703.
43. He S, Gaca MD, Walls AF. A role for tryptase in the activation of human mast cells: modulation of histamine release by tryptase and inhibitors of tryptase. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998 Jul; 286(1): 289-97.

44. Thakurdas SM *et al.* The mast cell-restricted tryptase mMCP-6 has a critical immunoprotective role in bacterial infections. *J Biol Chem*, 2007 Jul 20; 282(29): 20809-15.
45. Shin K *et al.* Mouse mast cell tryptase mMCP-6 is a critical link between adaptive and innate immunity in the chronic phase of *Trichinella spiralis* infection. *J Immunol*, 2008 Apr 1; 180(7): 4885-91.
46. Caughey GH, Leidig F, Viro NF, Nadel JA. Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase. *J Pharmacol Exp Ther*, 1988 Jan; 244(1): 133-7.
47. Walls AF *et al.* Human mast cell tryptase attenuates the vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide. *Biochem Pharmacol*, 1992 Mar 17; 43(6): 1243-8.
48. Tam EK, Caughey GH. Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1990 Jul; 3(1): 27-32.
49. Sekizawa K, Caughey GH, Lazarus SC, Gold WM, Nadel JA. Mast cell tryptase causes airway smooth muscle hyperresponsiveness in dogs. *J Clin Invest*, 1989 Jan; 83(1): 175-9.
50. Zhang MG, Timmerman H. Mast cell tryptase and asthma. *Mediators Inflamm*, 1997 Dec; 6(5-6): 311-7.
51. Hamilton MJ, Frei SM, Stevens RL. The Multifaceted Mast Cell in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2014 Dec; 20(12): 2364-2378.
52. Lee H *et al.* Mucosal mast cell count is associated with intestinal permeability in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *J Neurogastroenterol Motil*, 2013 Apr; 19(2): 244-50
53. Valent P *et al.* The serum tryptase test: an emerging robust biomarker in clinical hematology. *Expert Rev Hematol*, 2014 Oct; 7(5): 683-690.
54. Li L *et al.* Identification of basophilic cells that express mast cell granule proteases in the peripheral blood of asthma, allergy, and drug-reactive patients. *J Immunol*, 1998 Nov 1; 161(9): 5079-86
55. Thorpe M *et al.* Extended cleavage specificity of human neutrophil cathepsin G: A low activity protease with dual chymase and tryptase-type specificities. *PLoS One*, 2018 Apr 13; 13(4): e0195077.
56. Tchougounova, E, Lundequist A, Fajardo I, Winberg JO, Abrink M, Pejler G. A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloprotease-9 and pro-matrix metalloprotease-2. *J Biol Chem*, 2005 Mar 11. 280(10): 9291-6
57. Li M *et al.* Involvement of chymase-mediated angiotensin II generation in blood pressure regulation. *J Clin Invest*, 2004 Jul; 114(1): 112-20.
58. Kosanovic D *et al.* Chymase: a multifunctional player in pulmonary hypertension associated with lung fibrosis. *Eur Respir J*, 2015 Oct; 46(4): 1084-1094.

59. Johnson JL, Jackson CL, Angelini GD, George SJ. Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998 Nov; 18(11): 1707-15.
60. Kosanovic D *et al.* Mast cell chymase: an indispensable instrument in the pathological symphony of idiopathic pulmonary fibrosis? *Histol Histopathol*, 2013 Jun; 28(6): 691-699.
61. Kosanovic D *et al.* Histological characterization of mast cell chymase in patients with pulmonary hypertension and chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Circ*, 2014 Mar; 4(1): 128-136.
62. Kunori Y *et al.* Rodent alpha-chymases are elastase-like proteases. *Eur J Biochem*, 2002 Dec; 269(23): 5921-30.
63. Karlson U, Pejler G, Tomasini-Johansson B, Hellman L. Extended substrate specificity of rat mast cell protease 5, a rodent α -chymase with elastase-like primary specificity. *J Biol Chem*, 2003 Oct 10; 278(41): 39625-31.
64. Knight PA, Wright SH, Lawrence CE, Paterson YY, Miller HR. Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. *J Exp Med*, 2000 Dec 18; 192(12): 1849-56.
65. Rao NV, Rao GV, Hoidal JR. Human dipeptidyl-peptidase I. Gene characterization, localization, and expression. *J Biol Chem*, 1997 Apr 11; 272(15): 10260-5.
66. Pham CT, Armstrong RJ, Zimonjic DB, Popescu NC, Payan DG, Ley TJ. Molecular cloning, chromosomal localization, and expression of murine dipeptidyl peptidase I. *J Biol Chem*, 1997 Apr 18; 272(16): 10695-703.
67. Turk D. Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): Exclusion domain added to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine proteases. *EMBO J*, 2001 Dec 3; 20(23): 6570-6582.
68. Dolenc I, Turk B, Pungercic G, Ritonja A, Turk V. Oligomeric structure and substrate induced inhibition of human cathepsin C. *J Biol Chem*, 1995 Sep 15; 270(37): 21626-31.
69. Lecaille F, Kaleta J, Bromme D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: Their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev*, 2002 Dec; 102(12): 4459-4488.
70. Wolters PJ, Pham CT, Muilenburg DJ, Ley TJ, Caughey GH. Dipeptidyl peptidase I is essential for activation of mast cell chymases, but not tryptases, in mice. *J Biol Chem*, 2001 May 25; 276(21): 18551-6.
71. Mallen-St Clair J, Pham CT, Villalta SA, Caughey GH, Wolters PJ. Mast cell dipeptidyl peptidase I mediates survival from sepsis. *J Clin Invest*, 2004 Feb; 113(4): 628-34.
72. Pagano MB *et al.* Critical role of dipeptidyl peptidase I in neutrophil recruitment during the development of experimental abdominal aortic aneurysms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007 Feb 20; 104(8): 2855-60.

73. Qin Y, Shi GP. Cysteinyl cathepsins and mast cell proteases in the pathogenesis and therapeutics of cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther*, 2011 Sep; 131(3): 338-50
74. Haim S, Munk J. Keratosis palmo-plantaris congenita, with periodontosis, arachnodactyly and a peculiar deformity of the terminal phalanges. *Br J Dermatol*, 1965 Jan; 77: 42-54.
75. Toomes C *et al.* Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. *Nat Genet*, 1999 Dec; 23(4): 421-4.
76. Pham CT, Ivanovich JL, Raptis SZ, Zehnbauser B, Ley TJ. Papillon-Lefèvre syndrome: correlating the molecular, cellular, and clinical consequences of cathepsin C/dipeptidyl peptidase I deficiency in humans. *J Immunol*, 2004 Dec 15; 173(12): 7277-81.
77. Sørensen OE *et al.* Papillon-Lefèvre syndrome patient reveals species-dependent requirements for neutrophil defenses. *J Clin Invest*, 2014 Oct; 124(10): 4539-48.
78. Firatli E, Tüzün B, Efeoğlu A. Papillon-Lefèvre syndrome. Analysis of neutrophil chemotaxis. *J Periodontol*, 1996 Jun; 67(6): 617-20.
79. Liu R, Cao C, Meng H, Tang Z. Leukocyte functions in 2 cases of Papillon-Lefèvre syndrome. *J Clin Periodontol*, 2000 Jan; 27(1): 69-73.
80. Pahwa P, Lamba AK, Faraz F, Tandon S. Haim-Munk syndrome. *J Indian Soc Periodontol*, 2010 Jul; 14(3): 201-3.
81. Méthot N *et al.* In vivo inhibition of serine protease processing requires a high fractional inhibition of cathepsin C. *Mol Pharmacol*, 2008 Jun; 73(6): 1857-65.
82. Hamon Y *et al.* Neutrophilic Cathepsin C Is Maturated by a Multistep Proteolytic Process and Secreted by Activated Cells during Inflammatory Lung Diseases. *J Biol Chem*, 2016 Apr 15; 291(16): 8486-99.
83. Korkmaz B *et al.* Therapeutic targeting of cathepsin C: from pathophysiology to treatment. *Pharmacol Ther*, 2018 Oct; 190: 202-236.
84. Jiang Z *et al.* Whole transcriptome analysis with sequencing: methods, challenges and potential solutions. *Cell Mol Life Sci*, 2015 Sep; 72(18): 3425-39.
85. Hsiao LL, Stears RL, Hong RL, Gullans SR. Prospective use of DNA microarrays for evaluating renal function and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2000 May; 9(3): 253-8.
86. Celis JE *et al.* Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS Lett*, 2000 Aug 25; 480(1): 2-16.
87. Manger ID, Relman DA. How the host 'sees' pathogens: global gene expression responses to infection. *Curr Opin Immunol*, 2000 Apr; 12(2): 215-8.

88. Westermeier R, Marouga R. Protein detection methods in proteomics research. *Biosci Rep*, 2005 Feb-Apr; 25(1-2): 19-32.
89. Arafat SN *et al.* Elevated Neutrophil Elastase in Tears of Ocular Graft-Versus-Host Disease Patients. *Am J Ophthalmol*, 2017 Apr; 176: 46-52.
90. Postl LK *et al.* Polymorphonuclear (PMN) elastase in patients after severe traumatic brain injury. *Eur J Med Res*, 2018 Sep 15; 23(1): 44.
91. Mi L, Gao WM, Du ZB, Cao ZP, Zhang Y, Zhu BL. Changes of Serum IgE and Tryptase in Anaphylactic Shock Rats. *Fa Yi Xue Za Zhi*, 2015 Jun; 31(3): 181-4.
92. Aniceto V *et al.* Serum Baseline Tryptase Level as a Marker for the Severity of Anaphylaxis. *Int Arch Allergy Immunol*, 2019; 179(3): 201-208.
93. Francis A *et al.* Serum mast cell tryptase measurements: Sensitivity and specificity for a diagnosis of anaphylaxis in emergency department patients with shock or hypoxaemia. *Emerg Med Australas*, 2018 Jun; 30(3): 366-374.
94. Albright VC, Hellmich RL, Coats JR. A Review of Cry Protein Detection with Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *J Agric Food Chem*, 2016 Mar 23; 64(11): 2175-89.
95. Farady CJ, Craik CS. Mechanisms of Macromolecular Protease Inhibitors. *Chembiochem*, 2010 Nov 22; 11(17): 2341-2346.
96. Holzer H, Heinrich PC. Control of proteolysis. *Ann Rev Biochem*, 1980; 49: 63-91.
97. Sanman LE, Bogoy M. Activity-based profiling of proteases. *Annu Rev Biochem*, 2014; 83: 249-73.
98. Nduaguibe CC, Bentsi-Barnes K, Mullen Y, Kandeel F, Al-Abdullah I. Serine protease inhibitors suppress pancreatic endogenous proteases and modulate bacterial neutral proteases. *Islets*, 2010 May-Jun; 2(3): 200-6.
99. Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov*, 2006 Sep; 5(9): 785-99.
100. López-Otín C, Overall CM. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002 Jul; 3(7): 509-19.
101. Edgington LE, Verdoes M, Bogoy M. Functional imaging of proteases: recent advances in the design and application of substrate-based and activity-based probes. *Curr Opin Chem Biol*, 2011 Dec; 15(6): 798-805.
102. Poreba M, Drag M. Current strategies for probing substrate specificity of proteases. *Curr Med Chem*, 2010; 17(33): 3968-95.
103. Harris JL, Backes BJ, Leonetti F, Mahrus S, Ellman JA, Craik CS. Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000 Jul 5; 97(14): 7754-9.
104. Méthot N *et al.* Inhibition of the activation of multiple serine proteases with a cathepsin C inhibitor requires sustained exposure to prevent pro-enzyme processing. *J Biol Chem*, 2007 Jul 20; 282(29): 20836-46.

105. Novovic S *et al.* Activity of neutrophil elastase reflects the progression of acute pancreatitis. *Scand J Clin Lab Invest*, 2013 Sep; 73(6): 485-93.
106. Hinkofer LC *et al.* Allosteric modulation of proteinase 3 activity by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in granulomatosis with polyangiitis. *J Autoimmun*, 2015 May; 59: 43-52.
107. Denadai-Souza A *et al.* Effect of tryptase inhibition on joint inflammation: a pharmacological and lentivirus-mediated gene transfer study. *Arthritis Res Ther*, 2017 Jun 6; 19(1): 124.
108. Laidlaw TM *et al.* Characterization of a novel human mast cell line that responds to stem cell factor and express functional FcεRI. *J Allergy Clin Immunol*, 2011 Mar; 127(3): 815-822.e1-5.
109. Budnjo A *et al.* Reversible ketomethylene-based inhibitors of human neutrophil proteinase 3. *J Med Chem*, 2014 Nov 26; 57(22): 9396-408.
110. Benabid R *et al.* Neutrophil elastase modulates cytokine expression: contribution to host defense against *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia. *J Biol Chem*, 2012 Oct 12; 287(42): 34883-94.
111. Wiesner O *et al.* Differences between human proteinase 3 and neutrophil elastase and their murine homologues are relevant for murine model experiments. *FEBS Lett*, 2005 Oct 10; 579(24): 5305-12.
112. Burster T *et al.* Cathepsin G, and not the asparagine-specific endoprotease, controls the processing of myelin basic protein in lysosomes from human B lymphocytes. *J Immunol*, 2004 May 1; 172(9): 5495-503.
113. Giguere CJ, Schnellmann RG. Limitations of SLLVY-AMC in calpain and proteasome measurements. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008 Jul 4; 371(3): 578-81.
114. Powers JC *et al.* Mammalian chymotrypsin-like enzymes. Comparative reactivities of rat mast cell proteases, human and dog skin chymases, and human cathepsin G with peptide 4-nitroanilide substrates and with peptide chloromethyl ketone and sulfonyl fluoride inhibitors. *Biochemistry*, 1985 Apr 9; 24(8): 2048-58.
115. Guerra M *et al.* Cathepsin G Activity as a New Marker for Detecting Airway Inflammation Microscopy and Flow Cytometry. *ACS Cent Sci*, 2019 Mar 27; 5(3): 539-548.
116. Korkmaz B *et al.* Measuring elastase, proteinase 3 and cathepsin G activities at the surface of human neutrophils with fluorescence resonance energy transfer substrates. *Nat Protoc*, 2008; 3(6): 991-1000.
117. Guarino C *et al.* New selective peptidyl di(chlorophenyl) phosphonate esters for visualizing and blocking neutrophil proteinase 3 in human diseases. *J Biol Chem*, 2014 Nov 14; 289(46): 31777-31791.
118. Oh SW *et al.* Tryptase inhibition blocks airway inflammation in a mouse asthma model. *J Immunol*, 2002 Feb 15; 168(4): 1992-2000.
119. Grundhuber M (2016): Biotechnologische Herstellung und Charakterisierung der humanen Mastzell-Tryptase γ , Diss., München 2016.

120. Burgess LE *et al.* Potent selective nonpeptidic inhibitors of human lung tryptase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999 Jul 20; 96(15): 8348-52.
121. Le QT *et al.* Processing of human protryptase in mast cells involves cathepsins L, B, and C. *J Immunol*, 2011 Aug 15; 187(4): 1912-8.
122. Semaan W *et al.* Chymase inhibitor-sensitive synthesis of endothelin-1 (1-31) by recombinant mouse mast cell protease 4 and human chymase. *Biochem Pharmacol*, 2015 Mar 15; 94(2): 91-100.
123. Raymond WW *et al.* Alpha 2-macroglobulin capture allows detection of mast cell chymase in serum and creates a reservoir of angiotensin II-generating activity. *J Immunol*, 2009 May 1; 182(9): 5770-7.
124. Plotnick MI, Rubin H, Schechter NM. The effects of reactive site location on the inhibitory properties of the serpin alpha(1)-antichymotrypsin. *J Biol Chem*, 2002 Aug 16; 277(33): 29927-35.
125. (2006) Fluorescence Sensing. In Lakowicz JR (Hrsgb.), *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; pp. 623-673. Boston: Springer.
126. Damiano VV, Kucich U, Murer E, Laudenslager N, Weinbaum G. Ultrastructural quantitation of peroxidase- and elastase-containing granules in human neutrophils. *Am J Pathol*, 1988 May; 131(2): 235-45
127. Korkmaz B *et al.* Discriminating between the activities of human cathepsin G and chymase using fluorogenic substrates. *FEBS J*, 2011 Aug; 278(15): 2635-46.
128. Raymond WW, Trivedi NN, Makarova A, Ray M, Craik CS, Caughey GH. How immune peptidases change specificity: cathepsin G gained tryptic function but lost efficiency during primate evolution. *J Immunol*, 2010 Nov 1; 185(9): 5360-8.
129. Fu Z *et al.* Highly Selective Cleavage of Cytokines and Chemokines by the Human Mast Cell Chymase and Neutrophil Cathepsin G. *J Immunol*, 2017 Feb 15; 198(4): 1474-1483.
130. Popow-Stellmaszyk J, Wysocka M, Lesner A, Korkmaz B, Rolka K. A new proteinase 3 substrate with improved selectivity over human neutrophil elastase. *Anal Biochem*, 2013 Nov 1; 442(1): 75-82.
131. Reich M *et al.* Application of specific cell permeable cathepsin G inhibitors resulted in reduced antigen processing in primary dendritic cells. *Mol Immunol*, 2009 Sep; 46(15): 2994-9.
132. Kakizoe E, Shiota N, Tanabe Y, Shimoura K, Kobayashi Y, Okunishi H. Isoform-selective upregulation of mast cell chymase in the development of skin fibrosis in scleroderma model mice. *J Invest Dermatol*, 2001 Jan; 116(1): 118-23.
133. Kawabata K, Suzuki M, Sugitani M, Imaki K, Toda M, Miyamoto T. ONO-5046, a novel inhibitor of human neutrophil elastase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991 Jun 14; 177(2): 814-20.

134. Steven T *et al.* AZD9668: pharmacological characterization of a novel oral inhibitor of neutrophil elastase. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011 Oct; 339(1): 313-20.
135. Hwang TL, Wang WH, Wang TY, Yu HP, Hsieh PW. Synthesis and pharmacological characterization of 2-aminobenzaldehyde oxime analogs as dual inhibitors of neutrophil elastase and proteinase 3. *Bioorg Med Chem*, 2015 Mar 1; 23(5): 1123-1134.
136. Yu L *et al.* Neutrophil elastase-mediated proteolysis of the tumor suppressor p200 CUX1 promotes cell proliferation and inhibits cell differentiation in APL. *Life Sci*, 2020 Feb 1; 242: 117229.
137. Butterfield JH, Weiler DA, Hunt LW, Wynn SR, Roche PC. Purification of tryptase from a human mast cell line. *J Leukoc Biol*, 1990 May; 47(5): 409-19.
138. Fu L *et al.* Increased fibroblast chymase production mediates procollagen autophagic digestion in volume overload. *J Mol Cell Cardiol*, 2016 Mar; 92: 1-9.
139. Singh VP, Baker KM, Kumar R. Activation of the intracellular renin-angiotensin system in cardiac fibroblasts by high glucose: role in extracellular matrix production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008 Apr; 294(4): H1675-84.
140. Rao NV, Rao GV, Marshall BC, Hoidal JR. Biosynthesis and processing of proteinase 3 in U937 cells. Processing pathways are distinct from those of cathepsin G. *J Biol Chem*, 1996 Feb 9; 271(6): 2972-8
141. Senior RM, Campbell EJ. Cathepsin G in human mononuclear phagocytes: comparisons between monocytes and U937 monocyte-like cells. *J Immunol*, 1984 May; 132(5): 2547-51.
142. Schwartz LB *et al.* Tryptase precursors are preferentially and spontaneously released, whereas mature tryptase is retained by HMC-1 cells, Mono-Mac-6 cells, and human skin-derived mast cells. *J Immunol*, 2003 Jun 1; 170(11): 5667-73.
143. Doughty MJ, Davis MH, Gruenstein E. Reversible change in the fibroblast enzyme dipeptidyl aminopeptidase-1 (cathepsin C) related to the commercial source of fetal bovine serum in the culture medium. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1985 Jun; 21(6): 340-6.
144. Ruffel B *et al.* Cathepsin C is a tissue-specific regulator of squamous carcinogenesis. *Genes Dev*, 2013 Oct 1; 27(19): 2086-98.
145. Fan K *et al.* Up-regulation of microglial cathepsin C expression and activity in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation. *J Neuroinflammation*, 2012 May 20; 9: 96.
146. Korkmaz B, Lesner A, Marchand-Adam S, Moss C, Jenne DE. Lung Protection by Cathepsin C Inhibition: A New Hope for COVID-19 and ARDS? *J Med Chem*, 2020 Nov 25; 63(22): 13258-65.

147. Watz H *et al.* Safety and efficacy of the human neutrophil elastase inhibitor BAY 85-8501 for the treatment of non-cystic fibrosis bronchiectasis: A randomized controlled trial. *Pulm Pharmacol Ther*, 2019 Jun; 56(6): 86-93.
148. Hsia CY, Ganshaw G, Paech C, Murray CJ. Active-site titration of serine proteases using a fluoride ion selective electrode and sulfonyl fluoride inhibitors. *Anal Biochem*, 1996 Nov 15; 242(2): 221-7.
149. Gehring H *et al.* Accuracy of point-of-care-testing (POCT) for determining hemoglobin concentrations. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2002 Sep; 46(8): 980-6.
150. Dewald B, Rindler-Ludwig R, Breitz U, Baggiolini M. Subcellular localization and heterogeneity of neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*, 1975 Apr 141(4): 709-723.
151. Attucci S *et al.* Measurement of free and membrane-bound cathepsin G in human neutrophils using new sensitive fluorogenic substrates. *Biochem J*, 2002 Sep 15, 366(3): 965-970.
152. Campbell EJ, Campbell MA, Owen CA. Bioactive proteinase 3 on the cell surface of human neutrophils: quantification, catalytic activity, and susceptibility to inhibition. *J Immunol*, 2000 Sep 15, 165(6): 3366-74.

Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei Univ.-Prof. Dr. med. Daniel Teupser, dem Leiter des Instituts für Laboratoriumsmedizin der LMU, für die Möglichkeit der Promotion an seinem Institut.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Univ.-Prof. Dr. med. Christian P. Sommerhoff, für die Überlassung des Themas, die hervorragende fachliche Unterstützung und die großartige Betreuung. Seine Geduld und sein Engagement während sämtlicher Phasen dieser Doktorarbeit waren beispiellos. Seine wertvollen Ratschläge und konstruktiven Anregungen waren bei der Anfertigung dieser Arbeit stets von großer Hilfe.

Bei den Kollegen der Arbeitsgruppe „Klinische Biochemie / Proteolyse“ bedanke ich mich herzlichst für das freundschaftliche Arbeitsumfeld und die gegenseitige Unterstützung. Insbesondere Erika Siepmann, Dr. rer. nat. Maresa Grundhuber, Stefan Simon und Denise Birk standen mir bei technischen und methodischen Fragen immer geduldig zur Seite.

Ausdrücklich danke ich auch meiner Mitdotorandin und Freundin Alina-Sophie Kappenberger. Ihre tägliche moralische Unterstützung innerhalb wie außerhalb des Labors hat mich auch in schwierigen Phasen während dieser Arbeit nicht verzweifeln lassen und unsere Freundschaft zu einer ganz besonderen gemacht.

Zuletzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern, Susanne und Christian Leding, sowie meinen Geschwistern, Johanna und Philipp Leding, die mich auf meinem gesamten Lebensweg uneingeschränkt unterstützen, bestärken und motivieren. Ohne sie wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen.