

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Daniel Teupser

**Einfluss von Elastase-Inhibitoren
auf Neutrophile Granulozyten**

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

vorgelegt von
Denise Birk
aus Ulm
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Sommerhoff

Mitberichterstatter: Dr. Daniela Maier-Begandt
PD Dr. Claudia Nußbaum
PD Dr. Robert Kammerer

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen
Prüfung: 24.10.2024

Eidesstattliche Versicherung

Birk, Denise

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Einfluss von Elastase-Inhibitoren auf Neutrophile Granulozyten“ selbständig 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, 04.11.2024

Ort, Datum

Denise Birk

Unterschrift Doktorandin

Inhaltsverzeichnis

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung	3
	2.1 Neutrophile Granulozyten	3
	2.2 Funktionen von Neutrophilen Granulozyten	3
	2.3 Zytoplasmatische Granula Neutrophiler Granulozyten	4
	2.4 Granula-assoziierte Serinproteasen.....	4
	2.4.1 Funktionen der Serinproteasen neutrophiler Granulozyten	5
	2.4.2 Regulationsmechanismen der Proteaseaktivität.....	6
	2.5 Die Rolle der Neutrophilen-Elastase in der Krankheitsentstehung	7
	2.6 Elastase als pharmakologische Zielstruktur	8
	2.6.1 Natürliche Elastase-Inhibitoren	8
	2.6.2 Synthetisch hergestellte Elastase-Inhibitoren	9
	2.7 Ziele und geplantes Vorgehen	11
3	Materialien und Methoden.....	12
	3.1 Materialien	12
	3.1.1 Geräte	12
	3.1.2 Materialien für die Zellkultur	12
	3.1.3 Materialien und Reagenzien für die Enzymkinetik	13
	3.1.4 Materialien und Reagenzien für SDS-Page und Western Blot	14
	3.1.5 Antikörper	14
	3.1.6 KITs	15
	3.1.7 Puffer für Zellkultur und Enzymkinetik	15
	3.1.8 Software	15
	3.2 Methoden	16
	3.2.1 Zellkultur	16
	3.2.2 Herstellung von Zelllysaten	16
	3.2.3 Quantifizierung der enzymatischen Aktivität in Zelllysaten bzw. isolierter Proteasen	16
	3.2.4 Einfluss von Inhibitoren auf Elastase in U937	18
	3.2.5 Einfluss von Inhibitoren auf Elastase in Neutrophilen.....	19
	3.2.6 Einfluss von Inhibitoren auf die Zellproliferation	20
	3.2.7 Bestimmung der Zytotoxizität von Inhibitoren	20
	3.2.8 Bestimmung der Inhibitorstabilität	21
	3.2.9 Bestimmung der kinetischen Kenngrößen von Elastase-Inhibitoren	22
	3.2.10 Gelelektrophorese und Western Blot	23
4	Ergebnisse	26
	4.1 Etablierung eines Enzymassays zur Quantifizierung der Elastase-Aktivität.....	26
	4.1.1 Einfluss des Messpuffers	26

4.1.2	Vergleich fluorogener und chromogener Elastase-Substrate	27
4.1.3	Sensitivität des optimierten Enzymassays	28
4.2	Entwicklung eines Zellkulturmodells zur Messung der Aktivität intrazellulärer Elastase.....	29
4.2.1	Quantifizierung Elastase-ähnlicher Aktivität in myeloischen Zelllinien und PMN	29
4.2.2	Validierung der Elastase-Aktivitätsmessung mittels Elastase-Inhibitoren	30
4.2.3	Kryostabilität der Enzymaktivität in Lysaten	31
4.2.4	Nachweis endogener Elastase-Hemmstoffe im Zelllysate.....	32
4.2.5	Optimierung der Lysemethode.....	33
4.2.6	Wiederfindung der Elastase in verschiedenen Lysepuffern	34
4.2.7	Anpassung der Methodik an das 96-Well-Format	35
4.2.8	Detektion weiterer Serinproteasen in Zelllysaten	36
4.3	Hemmkinetische Charakterisierung von Elastase-Inhibitoren	37
4.3.1	Hemmkinetiken zur Ermittlung von IC_{50} und K_i	37
4.3.2	Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskonstanten der Inhibitoren	40
4.4	Effekte von Elastase-Inhibitoren im Zellkulturmodell	42
4.4.1	Effekte der Inhibitoren auf die Elastase-Aktivität im U937-Zellkulturmodell	42
4.4.2	Stabilität von Inhibitoren im Zellkulturmedium	46
4.4.3	Zytotoxizität von Inhibitoren im U937-Zellkulturmodell	47
4.4.4	Einfluss von Inhibitoren auf die Proliferation von U937-Zellen	48
4.5	Effekte von Inhibitoren auf isolierte Neutrophile	49
4.5.1	Effekt von Inhibitoren auf die Elastase-Aktivität.....	49
4.5.2	Zytotoxizität und Stabilität der Inhibitoren	51
4.6	Detektion von Elastase in Zelllysaten mittels Western Blot	52
5	Diskussion.....	54
5.1	Etablierung einer Methode zur Quantifizierung der Elastase-Aktivität	54
5.1.1	Einfluss von Puffern auf die Elastase-Aktivität	54
5.1.2	Eignung fluorogener und chromogener Substrate für die HNE-Aktivitätsmessung.....	55
5.1.3	Eignung eines Zellkulturmodells zur Quantifizierung der Elastase-Aktivität.....	55
5.1.4	Quantifizierung Elastase-ähnlicher Aktivität in Zelllysaten	56
5.1.5	Validierung der Elastase-Aktivitätsmessung in Zelllysaten	57
5.1.6	Optimierung der Zellaufbereitung für die Quantifizierung in 96-Well-Mikrotiterplatten	58
5.1.7	Pilotstudie zur Anwendung des Modellsystems auf verwandte Serinproteasen	59
5.2	Enzymkinetische Charakterisierung von Elastase-Inhibitoren	60
5.2.1	Hemmkinetiken der Inhibitoren mit isolierter Elastase und U937-Lysaten	60
5.2.2	Pre-Steady State Kinetiken zur Bestimmung von k_{on} und k_{off} -Werten	61
5.3	Einfluss von Inhibitoren auf die Aktivität intrazellulärer Elastase	62
5.3.1	Vergleich der Hemmung isolierter HNE, HNE in Lysat und intrazellulärer HNE in U937	62
5.3.2	Vergleich der Hemmung intrazellulärer Elastase in PMN und U937-Zellen	63
5.3.3	Unterschiede in der Wirkung von Eglin C auf PMN und U937	65
5.4	Limitationen bei der Beurteilung der intrazellulären Wirkung der Inhibitoren in unserem Modell	66

5.5	Bedeutung der Wirkorte der Inhibitoren für das Inhibitor-Design	68
6	Ausblick.....	70
7	Addendum.....	72
7.1	Nachweis von Elastase in Lysaten mittels Western Blot	72
8	Literaturverzeichnis	73

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian P. Sommerhoff für die gemeinsame Erarbeitung der Fragestellung, die exzellente Betreuung sowohl bei der Planung und praktischen Durchführung der Experimente als auch in der Auswertung und Erstellung der Doktorarbeit. Er hat mir die Begeisterung für die Wissenschaft vermittelt und das Rezept für das Erstellen einer wissenschaftlichen Arbeit an die Hand gegeben.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Daniel Teupser, Leiter des Instituts für Laboratoriumsmedizin am LMU Klinikum, der es mir ermöglicht hat, die Doktorarbeit an seinem Institut anzufertigen.

Für das wunderbare Arbeitsklima, den wissenschaftlichen und auch persönlichen Austausch danke ich ganz herzlich den Kollegen unserer Arbeitsgruppe. Insbesondere Erika Siepmann unterstützte mich beim Erlernen der verschiedenen Labormethoden und natürlich beim Überwinden der zahlreichen technischen Hürden bei der Etablierung des Zellkulturmodells. Stefan Simon und Dr. Maresa Grundhuber danke ich für die Unterstützung bei den enzymkinetischen Messungen und für die positive Energie mit der sie mich stets unterstützten. Annemarie Oettl war eine unersetzliche Hilfe bei der umfangreichen Optimierung der Western Blots. Darüber hinaus danke ich Luisa-Astrid Fratila, Julia Leding, Alina Kappenberger, Eva Riedlinger und Dr. Larisa Ring für die wunderbare Zusammenarbeit.

Abschließend danke ich meiner Familie insbesondere meinen Eltern und meinem Ehemann Nikolai Skuppin für ihre uneingeschränkte liebevolle Unterstützung. Sie haben mich immer wieder neu bei der Fertigstellung der Arbeit motiviert und dafür gesorgt, dass ich stets mit Spaß bei der Sache geblieben bin. Ohne sie wäre mein Studium und der Abschluss dieser Promotion nicht möglich gewesen. Tausend Dank!

Abkürzungsverzeichnis

α 1-PI	α 1-Proteinaseinhibitor
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BPTI	Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor = Aprotinin
Cat G	Cathepsin G
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ELP 1-9	Elastase Messpuffer 1-9
ELPP	Elastase Phosphat Puffer
FCS	Fetales Kälberserum
FEV1	Einsekundenkapazität
GASPID	Granula-assoziierte Serinproteasen der Immunabwehr
HMC-1	Humane Mastzelllinie 1
HNE	Humane Neutrophilen Elastase
IC ₅₀	Konzentration, die 50 % Inhibition verursacht
IL-1, -2, -6	Interleukin-1, -2, -6
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
<i>k</i> _{cat}	Umsetzungsrate
<i>K</i> _i	Gleichgewichtskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
<i>K</i> _m	Michaelis-Konstante
<i>k</i> _{off}	Dissoziationskonstante
<i>k</i> _{on}	Assoziationskonstante
LDH	Laktatdehydrogenase
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NGAL	Neutrophilengelatinase-assoziiertes Lipocalin
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
NSP	Neutrophile Serinproteasen
NSP4	Neutrophile Serinprotease 4
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline + Tween-20
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PR3	Proteinase 3
PVDF	Polyvinylidenfluorid
REAP	Rapid, Efficient And Practical (Lyseprotokoll)
RF	Relative Fluoreszenz
RT	Raumtemperatur
SD	Standard Deviation
SDS	Sodium n-Dodecyl Sulfat
SEM	Standard Error of Mean
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SLPI	Secretory Leukocyte Protease Inhibitor
<i>t</i> _{1/2}	Halbwertszeit
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VK	Variationskoeffizient

1 Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten sind zentrale Zellen der angeborenen Immunabwehr. Durch Chemotaxis, Phagozytose und Degranulation sind sie an der Elimination pathogener Mikroorganismen beteiligt. Hierfür benötigte Mediatoren werden entweder nach Bedarf gebildet (z.B. reaktive Sauerstoffspezies) oder sind in intrazellulären Granula gespeichert und werden auf ein Signal hin freigesetzt. Diese sekretorischen Granula enthalten die Serinproteasen Humane Neutrophilen Elastase (HNE), Cathepsin G (Cat G), Proteinase 3 (PR3) und Neutrophilen-Serinprotease 4 (NSP4), die in den Granula sowie nach Degranulation im Extrazellulärraum enzymatisch aktiv sind. Kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen extrazellulär freigesetzten Proteasen und körpereigenen Antiproteasen entstehen Erkrankungen. So führt ein Protease-Überschuss zu Krankheitsbildern wie „Acute Respiratory Distress Syndrome“ (ARDS) und rheumatoider Arthritis, ein Mangel an Antiproteasen z.B. bei erblichem Alpha-1-Antitrypsin-Mangel zu chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) und Lungenemphysem. Aus diesen Gründen wird seit Jahrzehnten an der Entwicklung von Hemmstoffen gearbeitet, die eine Gewebeschädigung durch die Proteasen verhindern sollen. Ein primäres Zielenzym ist die HNE; strukturell diverse Inhibitoren sind in klinischen Studien getestet worden und 2002 wurde in Japan der synthetische Inhibitor Sivelestat zur Behandlung des ARDS zugelassen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell zu entwickeln, um den Einfluss von HNE-Inhibitoren auf neutrophile Granulozyten zu untersuchen. Insbesondere sollte der Einfluss auf die enzymatische Aktivität der HNE herausgearbeitet werden, da bislang nicht gezielt überprüft wurde, inwieweit die Inhibitoren intrazellulär oder rein extrazellulär wirksam sein können. Zunächst wurde ein Zellkulturmodell etabliert, in dem die enzymatische Aktivität der Elastase nach Kultivierung der Zellen über einen Zeitraum von 26 h reproduzierbar quantifiziert werden kann. Hierzu wurden Lysate der myelo-monozytären Zelllinien U937 und HL-60 sowie von isolierten Neutrophilen als Goldstandard und der Mastzelllinie HMC-1 als Negativkontrolle gewonnen und die HNE-Aktivität über die Spaltung fluorogener Substrate quantifiziert. Überraschenderweise kann HNE nur in Neutrophilen- ($1,0 \pm 0,5$ pg/Zelle) und U937-Lysaten ($0,06 \pm 0,01$ pg/Zelle) detektiert werden, nicht dagegen in HL-60-Lysaten. Für weiterführende Experimente wurde die U937-Zelllinie ausgewählt, da sie im Gegensatz zu Neutrophilen stets verfügbar ist und die HNE-Aktivität reproduzierbar und mit geringer Varianz gemessen werden kann. Der Versuchsaufbau wurde soweit optimiert, dass U937-Zellen über 26 h in 96-Well-Mikrotiterplatten kultiviert, lysiert und die HNE-Aktivität mit einer Varianz von ≤ 6 % innerhalb einer Platte quantifiziert werden kann. Zudem wurde diese Methode auf isolierte Neutrophile übertragen, wobei 1000 Zellen aus < 1 μ l Blut für eine Aktivitätsmessung ausreichen.

Um den Einfluss von Inhibitoren auf die intrazelluläre HNE zu untersuchen, wurden 13 Substanzen einschließlich 2 Negativkontrollen ausgewählt, die hinsichtlich Struktur

(synthetisch vs. natürlich), Größe (240 Da - 52 kDa), Hemmmechanismus und Kinetik (reversibel vs. irreversibel) ein breites Spektrum abdecken. Die Affinität aller Inhibitoren wurde über die Bestimmung der K_i bzw. IC_{50} (13 pM - 126 µM) sowie der Assoziations- ($1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ - $7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und Dissoziationskonstanten (0 - 0.057 s^{-1}) im Vergleich zur Literatur validiert. Zudem wurde die Affinität zu isolierter HNE und zu HNE in Lysaten verglichen. Dabei wurden wesentliche Störfaktoren im Lysat, die die Methodik beeinflussen, ausgeschlossen.

Um die Wirkung der Inhibitoren auf die intrazelluläre Elastase zu untersuchen, wurden U937-Zellen über 0 - 26 h mit den Substanzen inkubiert, lysiert und die HNE-Restaktivität quantifiziert. Sechs der 13 getesteten Inhibitoren hemmen das intrazelluläre Enzym zeit- und konzentrationsabhängig. Unter den intrazellulär wirksamen Substanzen inhibiert der Inhibitor mit der niedrigsten molaren Masse, Pefabloc SC (240 Da), intrazelluläre und isolierte HNE gleichermaßen ($IC_{50} \sim 126 \text{ µM}$). Dagegen hemmen MeOSuc-AAPV-CMK, DMP 777, GW311616, SSR 69071 und Compound 5b das isolierte Enzym um den Faktor 10^2 - 10^4 besser als intrazelluläre HNE. Dieser Unterschied ist vermutlich auf die Diffusionsbarriere, einen veränderten pH in den Granula und z.T. die mangelnde Stabilität der Inhibitoren zurückzuführen; Toxizität und veränderte Zellproliferation spielen keine relevante Rolle. Die restlichen 5 Inhibitoren und zwei Negativkontrollen (Cathepsin G-Inhibitor, Benzamidin), verursachen keine intrazelluläre Hemmung. Zu diesen Substanzen zählen große natürliche Inhibitoren, die nicht zellpermeabel sind (α -1-PI, Eglin C, Aprotinin), Sivelestat, das trotz geringer Größe (435 Da) überraschend intrazelluläre HNE nicht hemmt und Alvelestat, das aufgrund seiner außerordentlich hohen Dissoziationskonstante in unserem Modell nur eingeschränkt beurteilbar ist.

Alle Inhibitoren, die HNE im U937-Zellkulturmodell hemmen, hemmen diese auch in Neutrophilen. Darüber hinaus hemmt Eglin C HNE in Neutrophilen bereits im nanomolaren Bereich, im U937-Modell zeigen hingegen 10 µM auch nach 26 h keinerlei Wirkung. Auch MeOSuc-AAPV-CMK und Sivelestat hemmen HNE in Neutrophilen etwas besser als im U937-Modell. Inwieweit z. B. eine unterschiedliche Zellpermeabilität, ein spezieller Transportmechanismus in reifen Neutrophilen oder eine unterschiedliche Inhibitorstabilität zugrunde liegt, muss in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

Das etablierte Verfahren ermöglicht es, die HNE-Aktivität im U937-Modell und neutrophilen Granulozyten reproduzierbar zu quantifizieren. In Pilotstudien wurden zusätzlich erste Cat G- und PR3-Aktivitätsmessungen durchgeführt, da diese Proteasen ebenfalls an Entzündungsprozessen beteiligt sind. In einem Versuchsansatz kann so systematisch die Wirkung bekannter und neu entwickelter Inhibitoren auf mehrere intrazelluläre Serinproteasen gleichzeitig untersucht werden. Diese Methode kann z.B. auf Neutrophile von COPD-Patienten übertragen werden und außerdem dazu verwendet werden, den Einfluss der Hemmstoffe auf physiologische Teilfunktionen der neutrophilen Granulozyten zu überprüfen.

2 Einleitung

2.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind zentraler Bestandteil der angeborenen Immunabwehr. Jeden Tag werden $5 - 10 \times 10^{10}$ Neutrophile aus hämatopoetischen Vorläuferzellen der myeloischen Reihe im Knochenmark gebildet (1), welches gleichzeitig das Speicherkompartiment für 90% dieser Leukozyten darstellt. Circa 10 % der Neutrophilen befinden sich im peripheren Blut, wo sie für 6 - 8 Stunden zirkulieren. Damit stellen neutrophile Granulozyten die größte Zellfraktion innerhalb der zirkulierenden Leukozyten (ca. 40 - 70 %) dar. Reife Neutrophile Granulozyten weisen einen segmentierten Kern auf und messen $8,5 - 10 \mu\text{m}$ im Durchmesser. Aufgrund der charakteristischen Gestalt des Zellkerns werden sie auch als polymorphkernige Neutrophile (PMN) bezeichnet (Abb. 2.1). Der Zellkern junger Neutrophiler ist hingegen stabförmig, weshalb sie auch „Stabkernige“ genannt werden. Wird ein menschlicher Blutausstrich nach Pappenheim angefärbt, so stellt sich das Zytoplasma der Neutrophilen rosa bis zartviolett dar, was insbesondere durch die Vielzahl an zytoplasmatischen Granula bedingt ist, die namensgebend sind (2-4).

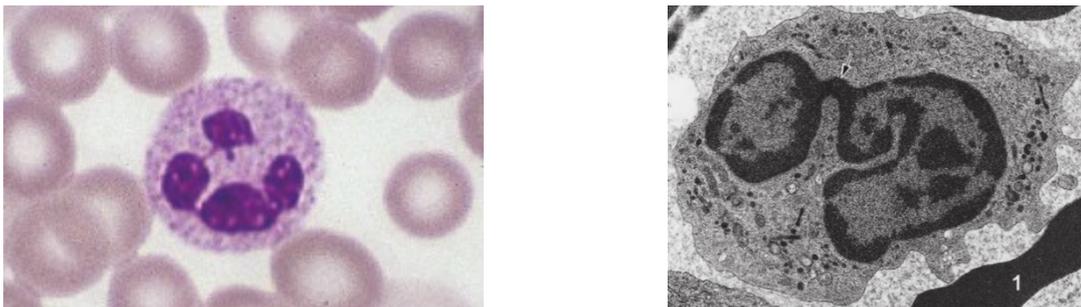


Abb. 2.1: Licht- und Elektronenmikroskopische Aufnahme eines segmentkernigen neutrophilen Granulozyten. *Links:* Ein PMN im menschlichen Blutausstrich, der von Erythrozyten umgeben ist (Färbung nach Pappenheim, ca. 1250-fache Vergrößerung). *Rechts:* Intravaskulärer PMN mit segmentiertem Kern, dessen Anteile über Kernbrücken (Pfeil) verbunden sind. Im Zytoplasma finden sich azurophile und spezifische Granula. Die „1“ markiert einen Erythrozyten (ca. 11760-fache Vergrößerung). *Entnommen aus Histologie, Welsch, 4. Auflage (4).*

2.2 Funktionen von Neutrophilen Granulozyten

Den PMN kommt eine Schlüsselrolle in der Abwehr pathogener Mikroorganismen zu. Dies zeigt sich insbesondere bei Patienten, die an einer schweren kongenitalen oder erworbenen Neutropenie leiden ($< 500 \text{ PMN}/\mu\text{l}$ Blut). Sie haben ein hohes Risiko, an ernstesten bakteriellen Infektionen zu erkranken, die selbst unter Therapie tödlich verlaufen können (5). Bei intakter Immunabwehr jedoch wandern neutrophile Granulozyten bei einer Infektion mittels Diapedese und Chemotaxis aus postkapillären Venolen in das betroffene Gewebe aus, wo sie die Entzündungsreaktion initiieren. Angelockt werden sie hierbei durch Chemokine (2, 4, 6). Am Entzündungsherd bekämpfen sie Mikroorganismen mittels Phagozytose, Degranulation und durch die Freisetzung sogenannter NETs („Neutrophil Extracellular Traps“). Letztere bestehen aus negativ geladenen DNA-Fragmenten, an welchen Serinproteasen und Myeloperoxidase anheften, die beim extrazellulären Abbau der Pathogene beteiligt sind. Für NETs wurde eine

Schlüsselrolle in der Abwehr grampositiver und gramnegativer Bakterien nachgewiesen (7). Kommt es jedoch zur Phagozytose der Mikroorganismen, so werden diese intrazellulär im Phagolysosom durch Superoxidanionen und Proteasen abgebaut (8). Dieselben Proteasen und weitere antimikrobielle Peptide können mittels Degranulation in den Extrazellulärraum freigesetzt werden. Die Serinproteasen humane neutrophilen Elastase (HNE), Cathepsin G (Cat G) und Proteinase 3 (PR3) bleiben dabei z.T. an der Zellmembran der PMN gebunden, um dort die Entzündungsreaktion zu modulieren (9, 10). Neben diesen direkten Abwehrmechanismen kommunizieren PMN durch Ausschüttung von Zytokinen mit anderen Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und T-Lymphozyten (11) und nehmen damit entscheidenden Einfluss auf den Ablauf der Immunantwort.

2.3 Zytoplasmatische Granula Neutrophiler Granulozyten

Die Inhaltsstoffe der zytoplasmatischen Granula der PMN sind an nahezu allen Abwehrfunktionen dieser Leukozyten beteiligt. Vier verschiedene Granula-Typen, primär bis quartär, werden sequenziell bei der PMN-Zelldifferenzierung gebildet. Sie unterscheiden sich im Proteingehalt (Tab. 2.1); der Synthesezeitpunkt entscheidet darüber, welche Proteine in welchen Granula gespeichert werden (12). Dies dient vermutlich dazu, Interaktionen der verschiedenen Granula-Inhalte zu verhindern. Die vier Granula-Typen werden auch unterschiedlich schnell exozytiert (13), wobei quartäre Granula nach Zellaktivierung als erstes freigesetzt werden (14). Die primären Granula können mit Azurfarbstoff violett angefärbt werden; sie werden daher auch azurophile Granula genannt und fungieren als Lysosomen. Spezifische (sekundäre) Granula kommen in höherer Anzahl pro Zelle vor und beinhalten zahlreiche antimikrobielle Substanzen wie Laktoferrin. Azurophile und spezifische Granula tragen gemeinsam zum Abbau phagozytierter Mikroorganismen im Phagolysosom bei. Die tertiären und quartären Granula sind auch als Gelatinase- bzw. sekretorische Granula bekannt (15).

Tab.2.1: Die wichtigsten in den Granula Neutrophiler Granulozyten gespeicherten Proteine (13, 15).

Primäre bzw. azurophile Granula	Myeloperoxidase, Neutrophilen Elastase, Cathepsin G, Proteinase 3, Neutrophile Serinprotease 4, Azurozidin, Defensine, Cathepsine
Sekundäre bzw. spezifische Granula	Laktoferrin, Leukolysin, Lysozym, Kollagenase, Cathelicidin, Histaminase, Cytochrom b558, Lipocalin 2
Tertiäre bzw. gelatinase-Granula	Gelatinase, Leukolysin, Lysozym, β 2-Mikroglobulin, Acetyltransferase
Quartäre bzw. sekretorische Granula	Alkalische Phosphatase, Leukolysin, Komplementrezeptoren (CR1, CR3), Plasmaproteine

2.4 Granula-assoziierte Serinproteasen

Die in den Granula gespeicherten Serinproteasen spielen für den intra- und extrazellulären Abbau von Mikroorganismen durch Neutrophile Granulozyten eine entscheidende Rolle. Die erste in PMN identifizierte Serinprotease war die humane neutrophilen Elastase (16), die nach

ihrer Eigenschaft, Elastin zu zersetzen, benannt wurde. In den Jahren 1975 und 1979 folgte die Beschreibung zweier weiterer Proteasen, die später als Cathepsin G und Proteinase 3 bekannt wurden (17-19). Erst 2012 wurde in München durch *Perera et al.* eine vierte Serinprotease, die neutrophile Serinprotease 4 (NSP4), identifiziert (20). Die kodierenden Gene für HNE, PR3 und NSP4 liegen auf Chromosom 19, das für Cat G auf Chromosom 14 (Tab. 2.2). Alle vier Proteasen sind strukturell ähnlich und haben einen konservierten Serin-Rest in ihrer katalytischen Triade („His⁵⁷, Asp¹⁰², Ser¹⁹⁵“), der sie der Superfamilie der Serinproteasen zuordnet. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Substratspezifität. HNE und PR3 zählen zu den elastolytischen Proteasen und spalten bevorzugt nach kleinen hydrophoben Aminosäure-Resten wie Valin, Isoleucin, Alanin und Threonin. Cat G weist hingegen eine chymotryptische Spezifität auf und spaltet nach großen aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan) (2, 21). NSP4 spaltet bevorzugt nach Arginin-Resten und besitzt damit eine Trypsin-ähnliche Spezifität (22). Diese Serinproteasen werden im Rahmen der myelozytären Differenzierung der PMN während des Promyelozyten-Stadiums gebildet; reife Neutrophile synthetisieren keine Serinproteasen mehr (23). Die Prä-Pro-Proteine besitzen ein N-terminales Signal- und Propeptid, wobei ersteres während der Translokation ins endoplasmatische Retikulum durch die Signalpeptidase abgespalten wird. Bevor die Serinproteasen in den azurophilen Granula gespeichert werden, entfernt Cathepsin C (Dipeptidyl Peptidase I) das Propeptid. Dadurch werden die Enzyme bereits intrazellulär in ihre aktive Form überführt (20, 24). In den Granula herrscht ein pH von 6,0, der die Aktivität der Proteasen herunterreguliert, erst nach Degranulation der PMN entfalten diese bei neutralem pH ihre volle Wirkung (25).

Tab. 2.2: Zusammenfassung genetischer, struktureller und funktioneller Merkmale der Neutrophilen Serinproteasen. Nach (10, 20, 26-30).

	Elastase	Cathepsin G	Proteinase 3	NSP4
Gen	ELANE	CTSG	PRTN3	PRSS57
Genlokus	19p13.3	14q11.2	19p.13.3	19p.13.3
Masse	~ 30 kDa	~ 28,5 kDa	~ 29 kDa	~ 29 kDa
Isoelektrischer Punkt	pH > 9	pH ~ 12	pH > 9	Keine Daten
Aktivitätsoptimum	pH 8,0-8,5	pH ~ 7,5	pH ~ 8,0	Keine Daten
Katalytische Triade	His ⁵⁷ , Asp ¹⁰² , Ser ¹⁹⁵			
Zymogen-Prozessierung	Cathepsin C (Dipeptidyl Peptidase I)			
Substratspezifität	elastolytisch	chymotryptisch	elastolytisch	tryptisch
Menge pro 10 ⁶ PMN	0,15-3,5 µg	~ 2,6 µg	~ 3,24 µg	~ 0,13 µg

2.4.1 Funktionen der Serinproteasen neutrophiler Granulozyten

Die neutrophilen Serinproteasen erfüllen zahlreiche intra- und extrazelluläre Funktionen. Da die Proteasen in den azurophilen Granula in ihrer aktiven Form vorliegen, wirken sie nach Fusion mit dem Phagolysosom entscheidend am intrazellulären Abbau von Krankheitserregern mit. Es wurde gezeigt, dass HNE insbesondere an der Abwehr

gramnegativer Bakterien mitwirkt (31). Cathepsin G wiederum ist für die intrazelluläre Elimination von *Staphylokokkus aureus* (32) relevant. Beide Proteasen wirken Pilzinfektionen entgegen (13, 33). PR3 trägt zur Beseitigung von *E. coli*, *Enterokokkus faecalis* und *Candida albicans* bei (2). Da NSP4 nur in geringen Mengen in PMN vorkommt (5 % der Menge von Cat G), hat sie neben einer antimikrobiellen vermutlich vor allem eine regulatorische Funktion, die bislang nicht aufgeklärt werden konnte (20).

Nach Aktivierung der neutrophilen Granulozyten werden die Serinproteasen mittels limitierter Exozytose in den Extrazellulärraum freigesetzt, wo sie in freier Form, membrangebunden oder als Bestandteil von NETs vorliegen. Zusammen weisen sie ein extrem breites Substratspektrum auf. Neben ihrer antimikrobiellen Wirkung spielen sie durch Spaltung von Strukturproteinen der extrazellulären Matrix (Elastin, Kollagen, Proteoglykane, Lungen-Surfactant, ...) eine wichtige Rolle beim Gewebeumbau. Gleichzeitig sind sie durch Aktivierung wie auch Inaktivierung von Zytokinen, Chemokinen und Rezeptoren verschiedener Immunzellen zentrale Entzündungsmediatoren und wirken auf komplexe Weise am Immungeschehen mit (13, 34). Es bedarf einer sensiblen Regulierung der extrazellulären Proteaseaktivität. Kommt es zu einem Überschuss der neutrophilen Serinproteasen, werden eine Vielzahl entzündlicher und degenerativer Prozesse angestoßen, die zur Krankheitsentstehung führen können (2, 35).

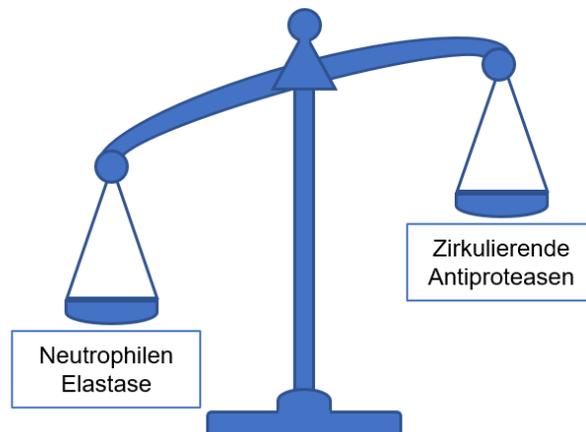
2.4.2 Regulationsmechanismen der Proteaseaktivität

Um die Aktivität der Neutrophilen Serinproteasen (NSP) zu limitieren und zu verhindern, dass sie z. B. körpereignes, gesundes Gewebe schädigen, existieren verschiedene Schutzmechanismen. Bereits direkt nach der Zymogen-Aktivierung findet eine intrazelluläre Kompartimentierung der Enzyme in den azurophilen Granula statt, wo ihre Aktivität aufgrund des niedrigen pH-Wertes (6,0) begrenzt ist. Im Zytoplasma und im Extrazellulärraum schützen endogene Inhibitoren vor einem Protease-Überschuss (25). Mengenmäßig dominierend in der Zirkulation sind die Serpine (Serinprotease Inhibitoren), die sich durch ein verhältnismäßig hohes Molekulargewicht (> 40 kDa) auszeichnen. Sie werden durch die Proteasen gespalten, was zu einer irreversiblen Enzym-Inhibitor-Bindung führt und so die Aktivität der Serinprotease hemmt (Suizidhemmung) (13). Zu den Serpinen zählen v. a. Alpha-1-Proteinase-Inhibitor (auch als Alpha-1-Antitrypsin oder Alpha-1-PI bekannt), Alpha-1-Antichymotrypsin und „Monocyte Neutrophil Elastase Inhibitor“ (MNEI). Alpha-1-PI und Alpha-1-Antichymotrypsin sind Akute-Phase-Proteine, die in der Leber synthetisiert werden und bei gesunden Individuen in hohen Serumkonzentrationen von 1,2 - 2 mg/ml bzw. 0,25 mg/ml zirkulieren. Alpha-1-PI hemmt alle neutrophilen Serinproteasen, Alpha-1-Antichymotrypsin primär Cat G (36-38). MNEI ist dagegen im Zytoplasma von PMN und Makrophagen wirksam und hemmt dort HNE und Cat G (2).

Eine zweite Gruppe von Inhibitoren sind die sogenannten „kanonischen Inhibitoren“ (lat.: canonicus = regelrecht), zu denen u. a. SLPI und Elafin gehören (39). Der „Secretory Leukocyte Protease Inhibitor“ (SLPI) inhibiert HNE und Cat G, Elafin dagegen HNE und PR3. Sie sind überwiegend an Grenzflächen zur Außenwelt aktiv; beide Inhibitoren kommen im Bronchialsekret vor, SLPI auch in anderen Körperflüssigkeiten (u. a. Tränen, Speichel, auf der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes), Elafin in der Haut (2). Alpha-2-Makroglobulin als Vertreter einer dritten Gruppe endogener Inhibitoren zirkuliert in Konzentrationen von 2 mg/ml (40) und inhibiert Enzyme aller Proteaseklassen einschließlich Serinproteasen (41).

2.5 Die Rolle der Neutrophilen-Elastase in der Krankheitsentstehung

HNE erfüllt ihre Aufgaben im Gewebeumbau und der Immunabwehr nahezu ubiquitär im gesamten menschlichen Körper. Daher ist eine sensible Regulation des Gleichgewichts zwischen aktiver extrazellulärer Protease und ihren natürlichen Antiproteasen erforderlich. Ein relativer Überschuss der extrazellulären Protease führt zu Abbauprozessen und Entzündung in den betroffenen Geweben und kann zur Krankheitsentstehung beitragen. Dieses Ungleichgewicht kann einerseits durch einen tatsächlichen Protease-Überschuss, andererseits durch einen Mangel an Antiproteasen bedingt sein (Abb. 2.2).



- COPD
- Lungenemphysem
- ARDS
- Zystische Fibrose
- Bronchiektase
- pulmonale Hypertension
- Rheumatoide Arthritis
- Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
- SIRS & Sepsis
- ...

Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Protease-Antiprotease-Ungleichgewichts. Sowohl ein HNE-Überschuss als auch ein Mangel an Antiproteasen (v.a. Alpha-1-PI, SLPI, Elafin) stört das empfindliche Protease-Antiprotease-Gleichgewicht und führt zu Krankheitsentstehung. Nach (25, 42).

Die pathophysiologische Relevanz der HNE wurde zunächst bei Lungenerkrankungen untersucht. Dort spaltet Elastase Elastin, was namensgebend für die Protease war; zudem initiiert HNE eine Entzündungsreaktion und fördert die Entstehung von Infektionen durch

Reduktion des Zilienschlages und Steigerung der Muzinsekretion in den Atemwegen (43-45). Zigarettenrauch verstärkt diese Effekte, da dieser Alpha-1-PI als primäre Antiprotease oxidiert und damit inaktiviert (46), was langfristig zur Entstehung eines Lungenemphysems führt. Die schädliche Wirkung von HNE beschränkt sich allerdings nicht auf die Lunge. In den letzten Jahren wurden weitere Krankheitsbilder identifiziert, zu deren Entstehung HNE beiträgt. Hierzu zählen akute Erkrankungen wie Sepsis, SIRS, Myokardits und das ARDS, aber auch chronische Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, chronische Wunden, Atherosklerose und Tumorerkrankungen (25, 42, 47-54). Aktuell wurde HNE auch eine Rolle beim akuten Lungenversagen und disseminierter intravasaler Gerinnung bei schweren Verläufen von COVID-19 zugesprochen (55, 56).

2.6 Elastase als pharmakologische Zielstruktur

Aufgrund der hohen pathophysiologischen Relevanz wird seit vielen Jahrzehnten an der Entwicklung wirksamer, verträglicher Elastase-Inhibitoren geforscht. Nachdem Elastase mit der Entstehung des Lungenemphysems im Rahmen des erblichen Alpha-1-Antitrypsin-Mangels in Verbindung gebracht wurde (16, 57), gelang es *Gadek et al.* 1981 (58) erstmals, fünf Patienten mit aus humanem Plasma aufgereinigtem Alpha-1-PI über einen Zeitraum von 4 Wochen hinweg zu behandeln. Die Alpha-1-PI-Präparation wurde wöchentlich intravenös über einen Zeitraum von 6-8 h verabreicht und minderte die Elastase-Aktivität in der bronchoalveolären Lavage, ohne dass unerwünschte Nebenwirkungen auftraten. Diese Therapie wurde 1987 durch die amerikanische „Food and Drug Administration“ (FDA) zur Behandlung des Lungenemphysems bei Alpha-1-Antitrypsin-Mangel zugelassen, ohne dass eine klinische Wirksamkeit eindeutig erwiesen war; großangelegte klinische Studien erschienen aufgrund der Seltenheit der Erkrankung kaum umsetzbar (59).

Seitdem wurden und werden zahlreiche natürliche und synthetische Hemmstoffe der neutrophilen Elastase hergestellt und z.T. in klinischen Studien getestet. Lange Zeit verhinderten Probleme mit der Selektivität, Stabilität, Toxizität und Bioverfügbarkeit, unerwünschte Nebenwirkungen, aber auch die Chronizität vieler Ziel-Erkrankungen (Phase II/III-Studien bei COPD/Emphysem-Patienten würden Jahrzehnte dauern), dass geeignete synthetische Elastase-Inhibitoren auf dem westlichen Markt zugelassen wurden. Im Jahr 2021 wurde dem synthetischen Inhibitor Alvelestat von der FDA erstmals im Rahmen einer Schnellzulassung der sogenannte „Orphan Drug Status“ zur Behandlung des seltenen Alpha-1-Antitrypsin-Mangels erteilt (60).

2.6.1 Natürliche Elastase-Inhibitoren

Trotz der ersten vielversprechenden Daten zur Augmentationstherapie mit Alpha-1-PI konnte über lange Zeit keine klinische Verbesserung der Lungenfunktion nachgewiesen werden. Die

regelmäßige intravenöse Verabreichung erwies sich als schwer durchführbar (61). Auch für die Verabreichung des Wirkstoffs *per inhalationem* wurde bislang keine Verbesserung der Lungenfunktion nachgewiesen (42). Erst 2015 wurde in einer randomisierten Placebo-kontrollierten Studie anhand von CT-Aufnahmen der Lunge densitometrisch gezeigt, dass intravenös verabreichtes Alpha-1-PI das Fortschreiten eines Lungenemphysems bei Alpha-1-Antitrypsinmangel verlangsamen kann (62). Rekombinant hergestellte Varianten des Hemmstoffes wiesen bisher keine ausreichende Stabilität auf. Zusätzlich hat die Therapie mit Alpha-1-PI den Nachteil, dass der Inhibitor membrangebundene Elastase schlecht hemmt (63).

Neben Alpha-1-PI wird auch SLPI in der Lunge exprimiert und ist grundsätzlich zur Therapie der COPD geeignet. Rekombinant hergestelltes SLPI ist ein stark basischer, reversibler Elastase-Hemmstoff (2). Inhalativ verabreicht zeigte es lediglich kurze Wirksamkeit und musste in größeren Mengen als Alpha-1-PI appliziert werden, um dieselbe Wirkung zu erzielen (34). Zudem wiesen *Taggart et al.* 2001 nach, dass humane Zystein-Proteasen SLPI spalten und damit inaktivieren können (64).

Auch Elafin ist ein hochpotenter HNE-Inhibitor, der gleichzeitig durch das Binden bakterieller Lipopolysaccharide antimikrobiell wirkt. Ein Elastase-Überschuss führt allerdings zur Spaltung des Elafins; hierbei bleibt die hemmende Wirkung auf HNE erhalten, doch die antibakterielle Wirkung geht verloren (65). Die Augmentation von Elafin im Mausmodell konnte u.a. die inflammatorische Gewebeerstörung und Mortalität bei viraler Myokarditis reduzieren (66). In einer randomisierten, doppelblinden Placebo-kontrollierten klinischen Studie (Phase II) zur Wirkung einer perioperativen intravenösen Elafin-Gabe während Bypass-Operationen konnte hingegen keine Reduktion der myokardialen Verletzung und Inflammation erreicht werden (67). Weitere klinische Studien zum Einsatz von Elafin zur Elastase-Hemmung sind noch nicht abgeschlossen.

Aus Blutegeln aufgereinigtes und rekombinant hergestelltes Eglin C zeigte eine Besserung des Lungenemphysems im Hamstermodell (68). Da der Hemmstoff jedoch auf den Menschen allergen wirken kann, wurde es in der klinischen Entwicklung nicht weitergeführt. Auch weitere natürlich vorkommende Elastase-Inhibitoren konnten klinisch nicht überzeugen (34).

2.6.2 Synthetisch hergestellte Elastase-Inhibitoren

Über die letzten Jahrzehnte wurde eine Vielzahl synthetischer, niedermolekularer HNE-Inhibitoren entwickelt. Der erhoffte Vorteil dieser Hemmstoffe sollte eine verbesserte Penetration zum Wirkort bei ausreichend großer Stabilität, Selektivität und Assoziationsgeschwindigkeit sein, ohne dabei toxisch zu wirken (69, 70). Im Folgenden wird auf einzelne wichtige synthetische Inhibitoren eingegangen, um die Herausforderungen und Fortschritte bei der Entwicklung von HNE-Inhibitoren aufzuzeigen.

Die Sulfonylfluoride wurden bereits 1963 als Serinproteaseinhibitoren beschrieben (71) und ihre hemmende Wirkung auf Elastase nachgewiesen (72). Ein bekannter Vertreter ist AEBSF (Pefabloc SC®). Da die Inhibitoren jedoch unspezifisch binden und vergleichsweise geringe Assoziationsraten zeigen (69), waren sie für die klinische Anwendung ungeeignet.

Bei der Gruppe der Chloromethylketon-Inhibitoren handelt es sich um irreversible, alkylierende Hemmstoffe, unter denen sich MeOSuc-AAPV-CMK als effektiver Elastase-Inhibitor hervorgetan hat (73). Der Inhibitor konnte im Hamstermodell erfolgreich eine HNE-induzierte pulmonale Hämorrhagie reduzieren (74), ist jedoch in den notwendigen Konzentrationen toxisch und damit für die Therapie untauglich (34).

1991 wurde Sivelestat (*Ono Pharmaceutical Co., Ltd.*), ein kompetitiver, selektiver Elastase-Inhibitor beschrieben (70), der in Japan (2002) und Südkorea (2006) zur intravenösen Behandlung des ARDS zugelassen ist (25). Japanische Studien zeigten unter Sivelestat eine Verbesserung der Lungenfunktion sowie eine verkürzte Beatmungsdauer und einen verkürzten Aufenthalt auf der Intensivstation gegenüber der Placebo-Behandlung (75). Multizentrische Studien außerhalb Japans konnten diese Wirkung nicht reproduzieren, sodass die FDA die Substanz 2002 als nicht hinreichend wirksam deklarierte, woraufhin die weitere Entwicklung in westlichen Ländern zunächst abgebrochen wurde (76). Im Hinblick auf die Therapie der COVID-19 Erkrankung könnte dies reevaluiert werden (77).

Ono Pharmaceutical entwickelte ebenfalls Freselestat, einen oral verfügbaren Elastase-Inhibitor, der in Hamstern eine HNE-induzierte pulmonale Hämorrhagie reduziert (78). In Phase II klinischen Studien musste die Entwicklung aufgrund erhöhter Leberwerte abgebrochen werden (25).

Der reversible Elastase-Inhibitor Alvelestat zeigte in zwei klinischen Studien zur Therapie der COPD über 3 Monate und einer klinischen Studie zur Mukoviszidose-Therapie (ein Monat Dauer) gute Verträglichkeit ohne signifikante Toxizität, allerdings auch keine positiven Effekte auf die Lungenfunktion. Es wurde diskutiert, dass ein längerer Beobachtungszeitraum nötig sei, um positive Resultate zu verzeichnen (79). In einer kleinen randomisierten doppelblinden Placebo-kontrollierten Studie zur Therapie von Bronchiektasen konnte dann eine Verbesserung der FEV₁ um 0,1 l gegenüber der Placebo-Gruppe nachgewiesen werden (80). Nachdem zwei Phase II-Studien (ASTRAEUS (NCT03636347) und ATALANTa (NCT03679598)) eine Verbesserung von Biomarkern (Elastase-Aktivität im Blut, A α -val³⁶⁰ und Desmosin als Elastin-Abbauprodukt) und eine Verbesserung der subjektiven Gesundheit, erfasst durch den St George's Respiratory Questionnaire (SGRQ), unter Alvelestat zeigten, wurde Alvelestat im Rahmen eines Schnellverfahrens durch die amerikanische FDA als „Orphan Drug“ zur Behandlung des Alpha-1-Antitrypsin-Mangels zugelassen. Phase III-Studien zur klinischen Wirksamkeit von Alvelestat laufen, um eine volle Zulassung in den USA und in Europa zu ermöglichen (81).

BAY 85-8501 wurde 2015 als hochselektiver HNE-Inhibitor beschrieben, der bereits im pikomolaren Bereich inhibiert. Zudem erwies er sich in einem Mausmodell für ARDS als effektiv (82). Aktuell befindet sich BAY 85-8501 in Phase II einer klinischen Studie zur Anwendung bei Patienten, die unter Bronchiektasie leiden (42).

Über die beschriebenen Inhibitoren hinaus wurde eine Vielzahl strukturell diverser Inhibitoren beschrieben (83, 84). Einige dieser Substanzen sind für *in-vitro*-Studien verfügbar und wurden in dieser Arbeit eingesetzt (Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Weitere im Rahmen dieser Arbeit verwendete Elastase-Inhibitoren und ihre Herkunft.

Inhibitor	Struktur	Referenz
Aprotinin	Natürlicher peptidischer Inhibitor	(85)
Compound 5b	Synthetisches N-Benzoylindazol-Derivat	(86)
DMP 777	Synthetisches monozyklisches β -Lactam	(87)
GW311616	Synthetisches Pyrrolidine-trans-Lactam	(88)
SSR 69071	Synthetisches Saccharin-Derivat	(89)

2.7 Ziele und geplantes Vorgehen

Die Elastase neutrophiler Granulozyten erfüllt intra- und extrazelluläre Aufgaben in der Immunabwehr. Aufgrund ihres großen Schadenspotentials bei übermäßiger Freisetzung in den Extrazellulärraum wurden zahlreiche Elastase-Hemmstoffe entwickelt. Bislang wurde allerdings nicht systematisch untersucht, ob die Inhibitoren nur extrazellulär oder auch intrazellulär wirksam sind. Unklar ist ebenfalls, welche Auswirkungen eine Hemmung der intrazellulären Elastase auf physiologische Funktionen der Neutrophilen hat. Zur Klärung dieser Fragen sollte in der vorliegenden Arbeit ein *in vitro* Modell zur reproduzierbaren Quantifizierung intrazellulärer Elastase-Aktivität entwickelt werden. Durch Inkubation von Elastase-synthetisierenden Zelllinien bzw. isolierten PMN mit natürlichen und synthetischen Elastase-Inhibitoren, anschließender Zellyse und Elastase-Aktivitätsmessung sollte die Wirkung der Hemmstoffe auf das intrazelluläre Enzym quantifiziert werden. Hierbei sollten auch Faktoren wie Zellproliferation, Toxizität und Inhibitor-Stabilität berücksichtigt und experimentell erfasst werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Autoklav LTA400	Zirbus, Bad Grund
BluePower 500 Netzgerät	Serva, Heidelberg
CASY 1 Zellzählgerät	Schärfe System, Reutlingen
CO ₂ -Zellkultur-Inkubator	Binder, Tuttlingen
Bio Assay Reader HTS 7000	PerkinElmer, Waltham, USA
Spektralfluorometer SFM25	Tegimenta AG, Rotkreuz, Schweiz
Safire ² Multimode Microplate Reader	Tecan, Schweiz
Inkubationsschüttler Typ 3006	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Magnetrührer mit Heizplatte, IKAMAG, RCT	IKA [®] -Labortechnik, Staufen i. Br.
Lichtmikroskop Typ IMT-2	Olympus, Tokio, Japan
Lichtmikroskop Laborlux	Ernst-Leitz GmbH, Wetzlar
Akkubetriebene Pipettierhilfe, Easypet	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
pH-Meter inoLab	WTW GmbH, Weilheim
Pierce G2 Fast Blotter	Thermo Scientific, Rockford, USA
Präzisionswaage TE 124S	Sartorius GmbH, Göttingen
Feinwaage Typ 1419	Sartorius GmbH, Göttingen
Sicherheitswerkbank SterilGARD	The Baker Company, Sanford, USA
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät Sonifier B-12	Branson, Danbury, USA
Ultraschallbad Labson 200	Bender & Hobein, Singen
Mikrozentrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg
Rotofix 32 mit Zyto-Rotor	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen
Varifuge 3.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode
XCell SureLock Mini-Cell Elektrophoresesystem	Invitrogen, Life Techn., Darmstadt

3.1.2 Materialien für die Zellkultur

HL-60 Zelllinie, human (caucasian, promyelotic leukemia)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
U937 Zelllinie, human (caucasian, histiocytic lymphoma)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Humane Mastzelllinie HMC-1	Dr. J. H. Butterfield, Mayo Clinic, Rochester, USA und AG Sommerhoff
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) with L-Glutamine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
RPMI 1640 with L-Glutamine and Sodium Bicarbonate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf

Foetal Bovine Serum (FCS) Gold	PAA Laboratories GmbH, Pasching
PBS Dulbecco without Ca/Mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PBS Dulbecco with Ca/Mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Zellkulturflasche (T25, T75, T125)	Sarstedt, Nümbrecht
96-V-Well-Mikrotiterplatte, steril	M&B Stricker, Bernried
96-V-Well-Mikrotiterplatte, unsteril	Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg
96-U-Well-Mikrotiterplatte, steril	TPP, Schweiz
Klebefolie für Mikrotiterplatten, steril	Wagner und Munz GmbH, München
CASYton, Messlösung	OLS Omni Life Science GmbH, Bremen
CASYcups mit Deckel	OLS Omni Life Science GmbH, Bremen

3.1.3 Materialien und Reagenzien für die Enzymkinetik

Enzyme

Benzonase Nuclease, 70746-4	Novagen, Merck, Darmstadt
Humanes Cathepsin G (Cat G)	Elastin Products, Missouri, USA
Humane neutrophilen Elastase (HNE)	Merck, Darmstadt
Humane Proteinase 3 (PR3)	Elastin Products, Missouri, USA

Substrate und Standard

MeOSuc-AAPV-AMC	Bachem, Bubendorf, Schweiz
MeOSuc-AAPV-pNA	Merck, Darmstadt
Suc-AAA-pNA	Peptanova Peptide Institute, Sandhausen
Suc-AAPF-AMC	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Abz-Val-Ala-Asp-Nva-Arg-Asp-Arg-Gln-EDDnp	Peptanova Peptide Institute, Sandhausen
7-Amino-4-methylcoumarin (AMC)	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Inhibitoren

Alpha-1-PI, ab91136	Abcam, USA
Alvelestat	Hycultec GmbH, Beutelsbach
Aprotinin (Trasylol)	Bayer, Leverkusen
Benzamidin Hydrochlorid, B-6506	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cathepsin G Inhibitor, ab142181	Abcam, USA
Compound 5b (Neutrophil Elastase Inhibitor), Cay 14922-5	Biomol GmbH, Hamburg
DMP 777	Hycultec GmbH, Beutelsbach
Eglin C	Ciba, Geigy, Basel
GW311616	Hycultec GmbH, Beutelsbach
MeOSuc-AAPV-CMK	Merck, Darmstadt
Pefabloc-SC	Merck, Darmstadt

Sivelestat Sodium Salt Hydrate SSR 69071	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen R & D Systems, Wiesbaden
---	--

Mikrotiterplatten

96-Well, schwarz, Flachboden	Corning, NY, USA
96-Well, transparent, Flachboden	Dynatech, Denkendorf

3.1.4 Materialien und Reagenzien für SDS-Page und Western Blot

4 x Tris-Glycin Probenpuffer	0,4 M TRIS-HCl, 20 % Glycerin, 8 % SDS, ca. 1 µg Bromphenolblau, pH 6,8
10 x Pierce Fast Semi-Dry Transfer Buffer	Thermo Scientific, Rockford, USA
10 x Tris-Glycin-Laufpuffer	0,25 M Tris-Base, 2,5 M Glycin, 1 % SDS, pH 8,3 – 8,5
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DryEase™ Mini-Gel Drying System	Invitrogen, Carlsbad, USA
Filterpapier 1,2 – 1,5 mm	Whatman GmbH, Dassel
Gel Code Blue Safe Protein Stain	Thermo Scientific, Rockford, USA
High performance chemiluminescence film	GE Healthcare, Frankfurt a. M.
Kodak processing chemicals for autoradiography films GBX fixer/replenisher	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Konservierungslösung für SDS-Gele	20 % Ethanol, 5 % Glycerin
Magic Mark XP Western Protein Standard	Life Technologies, Darmstadt
Milchpulver, fettarm	Carl Roth, Karlsruhe
Mild Stripping Buffer	1,5 % Glycin, 0,1 % SDS, 1 % Tween 20, pH 2,2
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM, Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM, KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
PBST	PBS + 0,5 % Tween-20
Protease-Inhibitor-Cocktail	Merck, Darmstadt
Protran BA 85 Nitrocellulose Blotting Membran	GE Healthcare, Frankfurt a. M.
SDS (Sodium n-Dodecyl Sulfat)	Merck, Darmstadt
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA
Tris-Glycin-Gradientengele 4-20 %, 12 Bahnen	Anamed, Groß-Bieberau

3.1.5 Antikörper

Maus anti-HNE, sc-55549, monoclonal	Santa Cruz, USA
Kaninchen anti-HNE ab68672, polyklonal	Abcam, USA
Kaninchen anti-HNE ab131260, monoklonal	Abcam, USA
Kaninchen anti-β-Actin ab8227, polyklonal	Abcam, USA

Ziege anti-Kaninchen, 111-035-045, polyklonal Dianova, Hamburg
Ziege anti-Maus, 115-035-062, polyklonal Dianova, Hamburg
Ziege anti-Kaninchen, ab97080, polyklonal Abcam, USA

3.1.6 KITS

LDH Cytotoxicity Kit II PromoKine, Heidelberg
Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit Thermo Scientific, Darmstadt
MACSxpress® Neutrophil Isolation Kit, human Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

3.1.7 Puffer für Zellkultur und Enzymkinetik

Puffer für Proteasen

Elastase-Messpuffer 1-9 s. 4.1.1
Elastase-Phosphatpuffer (ELPP) 12 mM $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, 0,637 M NaCl, 2,7 mM KCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,4
PR3-Lagerungspuffer 50 mM MES, 0,7 M NaCl, pH 4,5 (90)
Cat G-Lagerungspuffer 0,05 M NaOAz, 0,1 M NaCl, pH 5,0

Lysepuffer

Lysepuffer nach „REAP“ PBS, 0,1 % Igepal, pH 7,4
Lysepuffer 1-32 s. 4.2.6

Alle Mess- und Lysepuffer wurden vor der Detergens- und Azid-Zugabe mithilfe einer 0,2 μm Membranfilter-Einheit (Whatman, Dassel) steril filtriert. Alle Substanzen, die hier nicht näher aufgeführt sind, wurden von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich und Carl Roth bezogen.

3.1.8 Software

pro Fit Vers. 6.2.16 QuantumSoft, Uetikon am See, CH
GraphPad Prism Vers. 7 GraphPad Software, La Jolla, USA
EndNote Vers. X9 Thomson Reuters

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Suspensions-Zelllinien U937 und HL-60 wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Zellinkubator unter sterilen Bedingungen kultiviert. Als Kulturmedien dienten RPMI 1640 bzw. IMDM mit je 10 % hitzeinaktiviertem (1h, 56 °C) fetalem Kälberserum (FCS) ohne Zugabe von Antibiotika. Beide Zelllinien wurden nach Bedarf in T25, T75 und T125 Zellkulturflaschen kultiviert und zweimal wöchentlich passagiert. Dazu wurde die Zellsuspension durch sanftes Pipettieren vermischt, ein 30 µl-Aliquot entnommen, in 6 ml CASYton Messlösung verdünnt und die Zelldichte mithilfe des CASY 1-Zellzählgerätes (Schärfe System) bestimmt. Die Zellsuspension wurde anschließend in einer neuen Zellkulturflasche mit frischem Medium auf eine Dichte von 0,5 - 1 x 10⁵ Zellen/ml verdünnt. Die maximale Zelldichte von 1 x 10⁶ Zellen/ml wurde nach 3-4 Tagen erreicht.

3.2.2 Herstellung von Zelllysaten

Um Zelllysate herzustellen, wurde zunächst die Zelldichte in der Zellkultur mithilfe des CASY 1-Zellzählgerätes bestimmt. Dann wurde das gewünschte Suspensionsvolumen entnommen, in 50 ml-Falcons überführt und die Zellen dreimal in PBS gewaschen, wobei das Waschvolumen dem Doppelten der entnommenen Zellsuspension entsprach. Zwischen den Waschschrritten wurden die Zellen abzentrifugiert (150 x g, 10 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Nach dem letzten Waschschrtritt erfolgte eine weitere Zentrifugation (400 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und PBS-Reste am Rand des Falcons mithilfe eines Präzisionswischtuches abgesaugt. Die Zellyse erfolgte nach Zugabe des Lysepuffers mittels Ultraschall (4 Ultraschallpulse über 15 s auf Eis). Da enzymatische Aktivitäten in den Lysaten quantifiziert werden sollten, wurden die Lysate abzentrifugiert (2100 x g, 10 min, 4 °C), um Schwebstoffe zu entfernen. Die Menge an Zellen pro µl Lysat kann Kapitel 3.2.3 entnommen werden.

3.2.3 Quantifizierung der enzymatischen Aktivität in Zelllysaten bzw. isolierter Proteasen

Um die enzymatische Aktivität von Proteasen zu quantifizieren, wurden fluorogene und chromogene Peptidsubstrate eingesetzt. Das Enzym (E) spaltet hierbei durch die proteolytische Aktivität die fluorogene/chromogene Gruppe (P) der Substrate (S) ab:



Durch die Substratspaltung kommt es zu einer Zunahme der Fluoreszenz/Absorption, die über die Zeit betrachtet wird. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist proportional zur enzymatischen Aktivität. Für fluorogene Messungen diente 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) als fluorogene Gruppe. Mithilfe einer AMC-Standardkurve (0-500 nM) kann so einerseits die Aktivität in

nM AMC/min angegeben werden, andererseits kann der Substratverbrauch ermittelt werden, der < 5 % betragen sollte. Zur PR3-Aktivitätsmessung wurde analog das FRET-Substrat Abz-Val-Ala-Asp-Nva-Arg-Asp-Arg-Gln-EDDnp mit der fluorogenen Gruppe Abz eingesetzt (s. Tab. 3.2). Für chromogene Messungen wurden pNA-Substrate eingesetzt, deren chromogene Gruppe Nitroanilin (NA) ist. Anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes $c = \frac{E}{\epsilon \times d}$ (mit c = NA-Konzentration; E = Extinktion; ϵ = Extinktionskoeffizient: 9600, d = Durchtrittslänge [cm]) kann die gemessene Aktivität in nM NA/min ausgedrückt werden. Alle Aktivitätsmessungen wurden in der 96-Well-Mikrotiterplatte (200 µl/Well) bei 37 °C über 10 min durchgeführt, wobei für fluorogene Messungen schwarze Platten und für chromogene Messungen durchsichtige Platten verwendet wurden. Die jeweilige Protease bzw. das Zellysate wurde in ELP 1 vorverdünnt und die Reaktion durch Zugabe des Substrats gestartet. Als Messinstrumente dienten der HTS 7000 Bio Assay Reader (PerkinElmer) und der Safire² Multimode Microplate Reader (Tecan) mit folgenden Messeinstellungen:

Tab. 3.1: Messeinstellungen zur Quantifizierung der enzymatischen Aktivität von HNE, Cat G und PR3 an den Plattenfluorometern HTS 7000 und Safire².

	HTS 7000	Safire ²
HNE	<i>fluorogen</i> : 15 Zyklen, 10 Flashes, λEx: 365 nm, λEm: 460 nm <i>chromogen</i> : λAbs: 405 nm	25 Zyklen, 30 Flashes, λEx: 360 nm, λEm: 465 nm
Cat G	-/-	25 Zyklen, 30 Flashes, λEx: 360 nm, λEm: 465 nm
PR3	-/-	5 Zyklen, λEx: 320 nm, λEm: 420 nm

Die chromogene HNE-Aktivitätsmessung erfolgte nur zu Beginn der Optimierung der Elastase-Aktivitätsmessung (s. 4.1.2). Alle weiteren Aktivitätsmessungen der isolierten Proteasen und in Lysaten wurden mit fluorogenen Substraten durchgeführt. Tab. 3.2 gibt eine Übersicht über die verwendeten Substrate, Protease-Konzentrationen und die Ausgangszellichte der Lysate.

Tab. 3.2: Verwendete Substrate, Enzymkonzentrationen und Zellichte in Lysaten aus PMN, U937-, HL-60- und HMC-1-Zellen für die Aktivitätsmessung von HNE, Cat G und PR3.

Protease:	HNE	Cat G	PR3
Substrate	MeOSuc-AAPV-AMC (10 µM)	Suc-AAPF-AMC (20 µM)	Abz-Val-Ala-Asp-Nva- Arg-Asp-Arg-Gln- EDDnp (20 µM)
	MeOSuc-AAPV-pNA (600 µM)		
	Suc-AAA-pNA (600 µM)		
Konzentration der isolierten Protease	0,5 nM	3,125 - 100 nM	3 nM
Zellichte im Lysat: [PMN/µl] [U937/µl] [HL-60/µl] [HMC-1/µl]	50-100 1000 5000 1000	-/ 300-2500 300-2500 -/-	-/ 2000; 5000 4000; 10.000 -/-

Für unterschiedliche Experimente wurden unterschiedliche Pipettierschemata verwendet:

Tab. 3.3: Pipettierschema für die initiale Quantifizierung von HNE-, Cat G- und PR3-Aktivität in Zelllysaten (s. 4.2.1 - 4.2.6, 4.2.8).

	Probenvolumen [μ l]
Lysat	50
Substrat	50
Messpuffer	100

Tab. 3.4: Pipettierschema für die Quantifizierung von HNE-Aktivität nach Inkubation in der 96-Well-Mikrotiterplatte (4.2.7, 4.4.1, 4.5.1).

	Probenvolumen [μ l]
Lysat	20
Substrat	50
Messpuffer	130

3.2.4 Einfluss von Inhibitoren auf Elastase in U937

3.2.4.1 Inkubation der U937-Zelllinie mit Inhibitoren

Um den Einfluss von Protease-Inhibitoren auf intrazelluläre HNE zu untersuchen, wurden die U937-Zellen über 0 - 26 h mit einem Inhibitor oder der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle inkubiert, anschließend lysiert und die enzymatische Restaktivität quantifiziert. Dazu wurde die gewünschte Zellzahl aus der Zellkulturflasche in ein 50 ml-Falcon überführt, abzentrifugiert (150 x g, 10 min, RT), der Überstand verworfen und die Zellen in frischem Zellkulturmedium auf die gewünschte Dichte gebracht. Diese Zellsuspension wurde gleichmäßig mit der 12-Kanal-Pipette in eine sterile 96-U-Well-Mikrotiterplatte mit 180 μ l pro Well ausgesät. Die Protease-Inhibitoren und ihre Lösungsmittel (DMSO, dH₂O und 0,9 % NaCl-Lösung) wurden 26 h, 6 h, 3h und 0 h vor der Ernte 10-fach konzentriert in einem Volumen von 20 μ l zu den Zellen zugegeben. Dazu wurden sie direkt vor der Zugabe in einer separaten 96-U-Well-Mikrotiterplatte in 7 absteigenden Konzentrationen (halb-log-Schritte) in Zellkulturmedium verdünnt. Die maximal eingesetzten Konzentrationen der Inhibitoren und ihrer Lösungsmittel finden sich in Tab. 3.5.

Tab. 3.5: Maximale Inhibitorkonzentrationen mit ihren entsprechenden Lösungsmitteln.

Inhibitor	Maximale Konzentration [μ M]	Lösungsmittel
Alpha-1-PI	3	dH ₂ O
Alvelestat	1	DMSO
Aprotinin	30	0,9 % NaCl-Lösung
Benzamidin	1000	dH ₂ O
Cathepsin G Inhibitor	3	DMSO
Compound 5b	10	DMSO
DMP 777	1	DMSO
Eglin C	10 (U937); 0,3 (PMN)	dH ₂ O
GW311616	1	DMSO
MeOSuc-AAPV-CMK	100	DMSO
Pefabloc SC	1000	dH ₂ O
Sivelestat	300	dH ₂ O
SSR 69071	12,5	DMSO

3.2.4.2 Herstellung des Zelllysats in der 96-Well-Mikrotiterplatte und Aktivitätsmessung

Zur Herstellung von Zelllysaten wurde die Zellsuspension in der 96-U-Well-Mikrotiterplatte dreimal abzentrifugiert (400 x g, 5 min, 4 °C); zwischen jedem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit eiskaltem PBS (ohne Mg/Ca) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Platte kopfüber auf einem Tuch abgestellt, sodass der übrige Waschpuffer abließ, es verblieben danach ca. 5-7 µl Waschpuffer im Well. Der gesamte Waschvorgang benötigte ca. eine halbe Stunde. Die Zellpellets wurden in 200 µl Lysepuffer resuspendiert, die Platte mit einer Klebefolie luftdicht abgeklebt und drei Frieren-Tauen-Zyklen unterzogen (Trockeneis vs. 37 °C). Zwischen den Zyklen wurde das Lysat mithilfe eines Vortex-Mischers zusätzlichen Scherkräften ausgesetzt, um die Zellmembran vollständig aufzubrechen. Die Mikrotiterplatte wurde abschließend abzentrifugiert (2100 x g, 10 min, 4 °C), um Schwebstoffe zu entfernen und je 100 µl Lysat-Überstand in eine frische Mikrotiterplatte übertragen, die bei Bedarf bei -80 °C aufbewahrt werden konnte. Aus dieser Platte erfolgte die HNE-Aktivitätsmessung (s. 3.2.3). Die enzymatische Restaktivität wurde als % der Aktivität der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle angegeben; d.h. die HNE-Aktivität aus Zellen, die mit einem Inhibitor inkubiert wurden, der in DMSO gelöst ist, wird mit der Aktivität aus Zellen verglichen, die nur mit DMSO inkubiert wurden. Die Lösungsmittelkontrollen selbst wurden mit der Aktivität unbehandelter U937 verglichen. Da während der Aktivitätsmessung die Fluorophore durch Lichtblitze zum Fluoreszieren angeregt werden und AMC dabei gleichzeitig ausbleicht, ergaben sich in Wells mit vollständig gehemmter HNE „negative Aktivitäten“. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wurde der Mittelwert aller negativen Steigungen auf der Platte berechnet und zur Bleichungs-Korrektur von der Aktivität jedes Wells abgezogen.

3.2.5 Einfluss von Inhibitoren auf Elastase in Neutrophilen

3.2.5.1 Isolation von Neutrophilen aus peripherem venösem Blut

Die Isolation von PMN aus peripherem venösem Blut erfolgte mithilfe des MACSxpress® Neutrophil Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec). Hierzu wurde venöses Blut von insgesamt sechs gesunden Probanden in EDTA-Röhrchen abgenommen (Ethikantrag Nr. 018-09) und ein Differenzialblutbild angefertigt. Gemäß den Herstellerangaben wurde das restliche EDTA-Blut mit Antikörper-gekoppelten „Magnetic Beads“ inkubiert, die an alle Blutzellen außer Erythrozyten und PMN binden. Die Separierung der Zellen erfolgte über 15 min in einem Magneten (MACSxpress Separator), wobei PMN und wenige Erythrozyten im Überstand verbleiben. Der Überstand wurde in ein 50 ml Falcon abpipettiert. Um die restlichen Erythrozyten zu entfernen, wurde eine hypotone Lyse durchgeführt. Hierzu wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (150 x g, 5 min, 4 °C) und der zellfreie Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde für 30 s in destilliertem Wasser resuspendiert, um Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurde dasselbe Volumen an 1,8-prozentiger NaCl-Lösung zugegeben,

um eine isotone Lösung (0,9 % NaCl) herzustellen. Nach dreimaliger hypotoner Lyse war makroskopisch im Zellpellet kein rotes Hämoglobin mehr erkennbar. Um die Suspensionen auf die benötigte Zelldichte zu bringen, wurde das Zellpellet zunächst in 10 ml PBS mit Glucose (1g/l) resuspendiert, die Zelldichte mithilfe des CASY 1-Zellzählgerätes bestimmt und anschließend auf eine Dichte von 50-100 PMN/ μ l verdünnt. Zur Bestimmung der Reinheit der isolierten Zellpopulation wurden 4 x 50 μ l der Zellsuspension mittels Zytospin (28 x g, 7 min, RT im Rotofix 32) auf einen unbeschichteten Objektträger aufgebracht, nach Pappenheim angefärbt und die Reinheit durch Auszählen von \geq 200 Zellen unter dem Lichtmikroskop bestimmt ($>$ 99 % PMN).

3.2.5.2 Unterschiede in der Probenverarbeitung von PMN gegenüber U937-Zellen

Inkubation und Lyse sowie die anschließende Aktivitätsmessung in U937- und PMN-Lysaten erfolgten weitgehend analog; Unterschiede in der Probenverarbeitung sind in Tab. 3.6 aufgeführt.

Tab. 3.6: Methodische Unterschiede bei der Untersuchung der Wirkung von Inhibitoren auf intrazelluläre HNE in PMN und U937-Zellen.

	PMN	U937
Medium	PBS mit Glucose (1 g/l)	RPMI 1640 + 10 % FCS
Waschvolumen	200 μ l	250 μ l
Zelldichte bei der Aussaat [Zellen/ μ l]	50-100	500
Zelldichte im Lysat [Zellen/ μ l]	50-100	1000
Inkubationsdauer	1 h	0 h, 3 h, 6 h, 26 h

3.2.6 Einfluss von Inhibitoren auf die Zellproliferation

U937-Zellen wurden in einer sterilen 24-Well-Platte ausgesät (1 ml/Well) und über 24 - 72 h mit denjenigen Inhibitorkonzentrationen inkubiert, die eine maximale intrazelluläre Hemmung hervorgerufen hatten (s. 4.4.1). Im Anschluss wurde die Zelldichte mithilfe des CASY-1-Zellzählgerätes bestimmt und in % der Zellzahl unbehandelter U937-Zellen angegeben.

3.2.7 Bestimmung der Zytotoxizität von Inhibitoren

Zur Bestimmung der Inhibitor-Toxizität wurden nach 26-stündiger Inkubation von U937-Zellen mit Inhibitoren nach dem ersten Zentrifugationsschritt 100 μ l Zellkulturüberstand abgenommen. In diesem Überstand wurde mithilfe des „LDH Cytotoxicity Kit II“ von PromoKine in einer chromogenen Messung die LDH-Aktivität nach Herstellerangaben bestimmt (Absorptionswellenlänge $\lambda_{\text{Abs}}=450$ nm, Referenz $\lambda_{\text{Em}}=650$ nm am Safire² Multimode Microplate Reader). U937-Lysat (100 %) diente als maximaler Kontrollwert und Lysat der Verdünnungsstufen 50 %, 10 % und 5 % als Eichkurve, um die Sensitivität der LDH-Messung zu bestimmen. Als Positivkontrolle fungierte isolierte LDH aus dem Kit, als minimaler Kontrollwert der Zellkulturüberstand unbehandelter U937-Zellen. Die Toxizität wurde gemäß

der Formel $\frac{\text{Testprobe} - \text{minimaler Kontrollwert}}{\text{maximaler Kontrollwert} - \text{minimaler Kontrollwert}} \times 100 = \text{Zytotoxizität [\%]}$ errechnet. Für PMN wurde analog das „Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit“ (Thermo Scientific) gemäß Herstellerangaben verwendet, um LDH im Zellkulturüberstand zu bestimmen (s. 4.5.2).

3.2.8 Bestimmung der Inhibitorstabilität

Die höchsten, in den U937-Zellkulturexperimenten eingesetzten Inhibitorkonzentrationen wurden in RPMI 1640 über 26 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach 26 h wurden die Inhibitoren in einem zweiten Ansatz frisch in RPMI 1640 verdünnt und isolierte HNE (0,5 nM) mit frischem und inkubiertem Inhibitor (je 20 µl Probenvolumen) versetzt (s. Tab. 3.7). Da RPMI 1640 in der fluorogenen Aktivitätsmessung quencht, wurde darauf geachtet, dass jedes Well insgesamt 20 µl RPMI 1640 enthält, damit der Effekt alle Proben gleichermaßen betrifft. Nach abgeschlossener Inkubation (1h, 37 °C) wurde die enzymatische Restaktivität von HNE gemessen und in Bezug zu unbehandelter HNE gesetzt (% Restaktivität). Als Maß für die Inhibitorstabilität wurde die Hemmung durch frisch angesetzten Inhibitor auf 100 % gesetzt und die Differenz zur Hemmung durch inkubierten Inhibitor angegeben.

Tab.3.7: Pipettierschema zur Bestimmung der Inhibitorstabilität über 26 h in RPMI 1640. Es sind jeweils die Endkonzentrationen im Test angegeben.

Inhibitor (je 20µl)	Testpuffer (je 110 µl)	HNE	MeOSuc- AAPV-AMC	Medium
Alpha-1-PI (0,3 µM)	ELP 1			-/-
Alvelestat (0,1 µM)	ELP 1			-/-
Aprotinin (3 µM)	ELP 1			-/-
Compound 5b (1 µM)	ELPP			-/-
DMP 777 (0,1 µM)	ELP 1			-/-
Eglin C (1 µM)	ELP 1			-/-
GW311616 (0,1 µM)	ELP 1	20 µl (0,5 nM)	50 µl (10 µM)	-/-
MeOSuc-AAPV-CMK (10 µM)	ELP 1			-/-
Pefabloc SC (100 µM)	ELP 1			-/-
Sivelestat (30 µM)	ELP 1			-/-
SSR 69071 (1,25 µM)	ELP 1			-/-
-/-	ELP 1			20 µl
-/-	ELPP			20 µl

Die Inhibitorstabilität nach Inkubation von PMN wurde analog, aber direkt aus dem Zellkulturüberstand nach einstündiger Inkubation von PMN mit den höchsten Inhibitorkonzentrationen ermittelt. Da PBS nicht quencht, musste den Standards kein Medium zugesetzt werden.

3.2.9 Bestimmung der kinetischen Kenngrößen von Elastase-Inhibitoren

3.2.9.1 Hemmkinetiken zur Bestimmung von IC_{50} und K_i

Um diejenige Inhibitorkonzentration zu ermitteln, bei der die Hälfte der Elastase-Aktivität gehemmt ist, wurde isolierte HNE (0,5 nM im Test) mit steigenden Inhibitorkonzentrationen über 1 h bei 37 °C in der 96-Well-Mikrotiterplatte inkubiert. Die Inhibitor-Verdünnung erfolgte im Verhältnis 1:1 in 11 Schritten in ELP 1. Anschließend wurde die enzymatische Restaktivität in Prozent der Aktivität unbehandelter HNE ermittelt. Die Aktivitätsmessung erfolgte nach bekannter Methode (s. 3.2.3), wobei sich das Testvolumen aus je 100 µl Inhibitor, 50 µl HNE und 50 µl Substrat zusammensetzte. Nur für den Hemmstoff Compound 5b wurde ein separater Elastase-Phosphat-Puffer (ELPP) verwendet, in dem auch HNE und Substrat vorverdünnt wurden, da ELP 1 den Inhibitor destabilisiert. Alle Messungen wurden \geq dreimal durchführt, die maximalen Inhibitorkonzentrationen sind in Tabelle 3.8 aufgeführt.

Tab.3.8: Maximal verwendete Inhibitorkonzentrationen zur Erstellung von Hemmkinetiken.

Inhibitor	maximale Konzentration [µM]
Alpha-1-PI	0,01
Alvelestat	0,1
Aprotinin	100
Benzamidin	1000
Cathepsin G Inhibitor	10
Compound 5b	0,06
DMP 777	0,4
Eglin C	0,01
GW311616	0,2
MeOSuc-AAPV-CMK	0,5
Pefabloc-SC	1000
Sivelestat	4
SSR 69071	0,2

Die Restaktivität wurde gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen. Daraus wurde mittels Regressionsanalysen (pro Fit Vers. 6.2.16) für die irreversiblen Elastase-Inhibitoren die IC_{50} als Maß für die halbmaximale Hemmung ermittelt und für die reversiblen Elastase-Hemmstoffe die Gleichgewichtskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes K_i (Mittelwert \pm SD).

3.2.9.2 Pre-Steady State Kinetik zur Bestimmung von k_{on} und k_{off}

Zur Bestimmung der Assoziationskonstanten der Inhibitoren wurde die enzymatische Aktivität isolierter HNE (0,6 nM) am Spektralfluorometer SFM25 mit dem fluorogenen Substrat MeOSuc-AAPV-AMC (10 µM) bei 37 °C über 10 min gemessen. Hierzu wurde eine Mischung aus Substrat und Enzym in einem Gesamtvolumen von 500 µl in die Küvette gegeben und die Messung gestartet. Als Messpuffer dienten entweder ELP 1 oder ELPP (nur Compound 5b). Die lineare Zunahme der Fluoreszenz stellt sich als Gerade dar. Nach ca. fünf Minuten wurde der laufenden Reaktion Elastase-Inhibitor (5-20 µl) zugegeben, wodurch die Gerade abflacht. Anhand der Krümmung der Aktivitätskurve kann mit dem Programm pro Fit (Vers. 6.2.16) die

Assoziationskonstante k_{on} [$M^{-1} s^{-1}$] bestimmt werden. Jeder Inhibitor wurde hierzu in wenigstens 6 Konzentrationen eingesetzt (Tab. 3.9).

Tab.3.9: Verwendete Inhibitorkonzentrationen zur Erstellung von Pre-Steady State Kinetiken.

Inhibitor	Inhibitorkonzentration [nM]								
	0,8	1,25	1,6	2,4	3,2	5	37,5	50	200
Alpha-1-PI	0,8	1,25	1,6	2,4	3,2	5	37,5	50	200
Compound 5b	2,5	5	10	20	12,5	25	37,5	50	200
DMP 777	0,5	2	2,5	5	7,5	10	15	20	
Eglin C	0,8	1,25	1,8	2,4	3,2	5			
GW311616	2,5	10	25	50	75	100			
MeOSuc-AAPV-CMK	100	250	500	750	10^3	10^4			
Pefabloc-SC	1 x 10^6	1,25 x 10^6	2,5 x 10^6	3,75 x 10^6	4 x 10^6	5 x 10^6			
Sivelestat	12,5	25	37,5	50					
SSR 69071	5	10	15	20	100	10^3			

Zur Kalibrierung des Messgerätes wurde die Fluoreszenz von 100 nM AMC gemessen. Für reversible Inhibitoren wurde die Dissoziationskonstante (k_{off}) aus k_{on} und K_i rechnerisch gemäß der Formel $k_{off} = K_i \times k_{on}$ bestimmt. Die Bindungskinetik von Alvelestat und Aprotinin konnte in diesem Versuchsaufbau nicht näher charakterisiert werden; das Enzym-Inhibitor-Gleichgewicht stellt sich so rasch ein, dass keine Krümmung der Kurve nachweisbar ist.

3.2.10 Gelelektrophorese und Western Blot

3.2.10.1 Herstellung von Proben für den Western Blot

Um Proben aus Zelllysaten zu generieren, wurde dem Lysepuffer vor der Zellyse ein Protease-Inhibitor-Cocktail zugegeben. U937, HL-60, HMC-1 (je 2000 Zellen/ μ l) und PMN (200 Zellen/ μ l) wurden in diesem modifizierten Lysepuffer durch drei Frieren-Tauen-Zyklen lysiert. Die Lysate wurden 1:1 mit einem zweifach konzentrierten TRIS-Glycin Probenpuffer versetzt, der DTT (0,1 M) enthält, um ein reduzierendes Milieu zu schaffen. Die Proben wurden 15 min bei 95 °C denaturiert und anschließend abzentrifugiert (15.000 x g, 10 min, 4 °C). Enzym-Standards wurden analog hierzu (aber ohne Inhibitor-Cocktail und Frieren-Tauen-Zyklen) in Lysepuffer vorverdünnt und in den folgenden Schritten wie die Lysate behandelt.

3.2.10.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufzutrennen, wurden die Proben mit einem Volumen von je 20 μ l in die Taschen eines 4 - 20 % Tris/Glycin-Gradientengels (Anamed) pipettiert. Als Größenstandard wurde der Magic Mark XP Western Protein Standard (2 μ l) verwendet und als Enzymkontrolle dienen 100 ng HNE. Die Proteine wurden in der Elektrophoresekammer (Invitrogen) in einem Tris/Glycin SDS Laufpuffer bei 125 V über ca. 1,5 h aufgetrennt und das Gel anschließend für ca. 10 min in destilliertem Wasser gewaschen.

3.2.10.3 Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran

Der Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mithilfe des „Pierce G2 Fast Blotters“ (Thermo Scientific) durch die Fast Semi-Dry-Methode. Das Gel wurde für 10 min in Pierce Fast Semi-Dry Transfer Buffer gewaschen und auch die Nitrozellulosemembran und vier Filterpapiere (1,2 - 1,5 mm) mit dem Puffer befeuchtet. Alle drei Bestandteile wurden in folgender Reihenfolge in das Blot-Gerät überführt: Anode - 2 Filterpapiere - Membran - SDS-Gel - 2 Filterpapiere - Kathode. Der Transfer lief bei 25 V über 7 min. Nach dem Transfer wurde das Gel über Nacht mit Gel Code Blue Safe Protein Stain angefärbt, um verbleibendes Protein zu detektieren. Das Gel wurde anschließend in einer Konservierungslösung aus 20 % Ethanol und 5 % Glycerin im DryEase™ Mini-Gel Drying System (Invitrogen) konserviert. Im Rahmen des Optimierungsprozesses wurde zwischenzeitlich eine PVDF-Membran anstelle einer Nitrozellulosemembran verwendet.

3.2.10.4 Antikörperbindung

Die Nitrozellulosemembran wurde entweder bei 4 °C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 1 h mit Blockierungslösung (5 % Milch in PBST) inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran mit destilliertem Wasser abgespült, in PBST geschwenkt (1 min) und dann für 0,5 - 1 h (RT) der Primärantikörper zugegeben. Die Reste wurden in drei Waschschrritten mit PBST (je 5 min) entfernt, bevor der Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur zugegeben wurde. Die Primär- und Sekundärantikörper wurden zuvor in PBST mit oder ohne Milch auf die gewünschte Konzentration gebracht (s. Tab. 3.10).

Tab 3.10: Konzentrationen, Lösungsmittel und Inkubationszeit der eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper für verschiedene Zielproteine.

Zielprotein	Primärantikörper	Sekundärantikörper
HNE	Maus anti-HNE, sc-55549 1:200 bis 1:2000 In PBST ± 0,5 % Milch	Ziege anti-Maus, 115-035-062 1: 20.000; 1h In PBST + 0,5 % Milch
HNE	Kaninchen anti-HNE, ab68672 1: 1000; 1 h in PBST + 0,5 % Milch	Ziege anti-Kaninchen, 111-035-045 1: 10.000; 1h In PBST + 0,5 % Milch
HNE	Kaninchen anti-HNE, ab131260 1: 1000; 1 h in PBST + 5 % Milch	Ziege anti-Kaninchen, 111-035-045 1: 10.000; 1h In PBST + 0,5 % Milch
		Ziege anti-Kaninchen, ab97080 1: 20.000; 1h In PBST + 0,5 % Milch
β-Actin	Kaninchen anti- β-Actin 1: 70.000; 0,5 h in PBST	Ziege anti-Kaninchen, 111-035-045 1: 10.000; 1h In PBST + 0,5 % Milch

3.2.10.5 Immunodetektion mittels ECL-Substrats

Vor der Antikörper-Detektion wurden Reste des Sekundärantikörpers 3-mal über 5 min mit PBST und 2 x über 5 min mit PBS gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Spaltung eines ECL-Substrats (SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate; Thermo Scientific) durch die Antikörper-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP). Das Substrat wurde gleichmäßig auf der Nitrozellulosemembran verteilt und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um das Signal aufzufangen wurde ein Chemilumineszenz-Film für 0,5 - 5 min aufgelegt und entwickelt. Wenn auf derselben Membran eine zweite Protein-Detektion erfolgen sollte (z.B. β -Actin als Ladungskontrolle), wurde die Membran mit destilliertem Wasser abgespült und anschließend 3-mal über 5 min in PBST gewaschen. Dann erfolgten Blockierung und Inkubation mit Antikörpern gemäß den oben beschriebenen Schritten. Waren die Banden des ersten und zweiten Proteins auf derselben Höhe zu erwarten, wurde die Membran vor der Blockierung über 1 h (RT) mit „Mild Stripping Buffer“ behandelt.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung eines Enzymassays zur Quantifizierung der Elastase-Aktivität

4.1.1 Einfluss des Messpuffers

Um Bedingungen zu schaffen, unter denen die enzymatische Aktivität der humanen neutrophilen Elastase (HNE) reproduzierbar und mit hoher Sensitivität quantifiziert werden kann, wurden zunächst verschiedene Messpuffer verglichen, die sich in Puffersubstanz, Salzgehalt, Detergens und Elektrolyten unterscheiden (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Zusammensetzung der Elastase-Messpuffer ELP 1 - ELP 9.

	Puffersubstanz	NaCl [mM]	Detergens	pH	Zusätze
ELP 1	200 mM TRIS-HCl	500	0,01 % Triton X-100	8,0	
ELP 2	50 mM TRIS-HCl	150	0,01 % Triton X-100	7,6	
ELP 3	50 mM MES	300	0,05 % Tween 20	6,0	
ELP 4	50 mM MES	300	0,05 % Tween 20	6,0	50 µg/ml Heparin
ELP 5	10 mM TRIS-HCl	-	-	7,4	10 mM KCl, 3 mM MgCl ₂
ELP 6	10 mM TRIS-HCl	-	0,01 % Triton X-100	7,4	10 mM KCl, 3 mM MgCl ₂
ELP 7	10 mM TRIS-HCl	-	-	8,0	10 mM KCl, 3 mM MgCl ₂
ELP 8	10 mM TRIS-HCl	-	0,01 % Triton X-100	8,0	10 mM KCl, 3 mM MgCl ₂
ELP 9	12 mM HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻	137	0,02 % Triton X-100	7,4	2,7 mM KCl

Für die Puffer ELP 1-9 wurden als Grundsubstanzen TRIS-HCl, MES oder PBS gewählt. Da die Gegenwart von NaCl die Elastase-Aktivität steigern kann (91), wurden Konzentrationen zwischen 0 und 500 mM eingesetzt. Auch KCl und MgCl₂ (ELP 5-8) werden bei der HNE-Aktivitätsmessung eingesetzt (63, 92). Elastase ist in den azurophilen Granula bei einem pH von 6 gespeichert, laut Literatur liegt ihr Aktivitätsoptimum aber bei pH 8 (2); daher wurden pH-Werte von 6, 7,4 (physiologisch) und 8 gewählt. Die nicht-ionischen Detergenzien Triton X-100 und Tween 20 wurden eingesetzt, um die Adhäsion von HNE am Plastik zu verhindern; ELP 5 und 7 wurden ohne Detergens belassen. Die Puffer ELP 3 und 4 werden in der Arbeitsgruppe für andere Proteasen eingesetzt und dienen zum Vergleich.

Nach Herstellung der Puffer wurde die Aktivität von 2 nM HNE fluorimetrisch quantifiziert. Die Messung wurde im HTS 7000-Plattenfluorometer in der 96-Well-Mikrotiterplatte bei einem Gesamtvolumen von 200 µl je Well durchgeführt. Die Abspaltung der fluorogenen AMC-Gruppe des Elastase-Substrats MeOSuc-AAPV-AMC (20 µM) wurde über 10 min bei 37 °C mit einer Anregungswellenlänge λ_{Ex} von 365 nm und einer Emissionswellenlänge λ_{Em} von 460 nm verfolgt. Die enzymatische Aktivität entspricht der Zunahme der relativen Fluoreszenz über die Zeit, die als Steigung der Regressionsgeraden errechnet wurde. Anschließend wurde die Steigung anhand einer AMC-Standardkurve (0-0,5 µM) von RF/min in nM AMC/min umgerechnet.

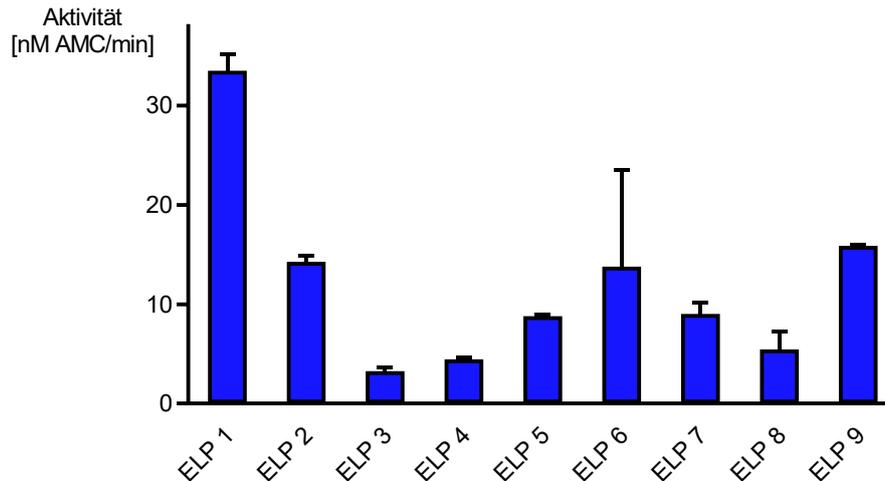


Abb. 4.1: Elastase-Aktivität in verschiedenen Messpuffern. Die enzymatische Aktivität der Elastase (2 nM) wurde über die Spaltung des Substrats MeOSuc-AAPV-AMC (20 μ M) bei 37°C über 10 min verfolgt und mittels einer AMC-Standardkurve in nM AMC/min ausgedrückt. Werte sind Mittelwert \pm SD, n = 2-4 Replikate.

Im Puffer ELP 1 hat HNE die höchste Aktivität bei vergleichsweise geringer Varianz der Messungen von 5,1 % (Abb. 4.1), weshalb dieser Puffer für alle weiteren Experimente als Elastase-Messpuffer verwendet wurde. In den restlichen Puffern ist die enzymatische Aktivität deutlich niedriger, insbesondere hat hierauf auch die Zugabe von $MgCl_2$ und KCl keinen Einfluss. Ebenso beeinflusst das Fehlen von Detergens die gemessene Aktivität kaum (ELP 5 und 7). Die niedrigsten Aktivitäten ergaben sich bei einem pH von 6 (ELP 3 und 4).

4.1.2 Vergleich fluorogener und chromogener Elastase-Substrate

Zur Messung der enzymatischen Aktivität von HNE sind fluorogene und chromogene Substrate beschrieben (65, 93, 94). Um zu untersuchen, welches Substrat am besten zur sensitiven Quantifizierung der HNE mit dem im Labor verwendeten Plattenfluorometer bzw. -photometer geeignet ist, wurde die Spaltung von 3 verschiedenen Substraten durch Elastase verglichen.

Die Spaltung des fluorogenen Substrats MeOSuc-AAPV-AMC (20 μ M) und der chromogenen Substrate MeOSuc-AAPV-pNA und Suc-AAA-pNA (je 600 μ M) durch HNE (0,5 nM) wurde über 10 min bei 37 °C in der 96-Well-Mikrotiterplatte verfolgt (s. 3.2.3). Die Menge des gespaltenen fluorogenen Substrats wurde anhand einer AMC-Standardkurve (0 - 0,5 μ M) quantifiziert, die der chromogenen Substrate gemäß des Lambert-Beerschen Gesetzes.

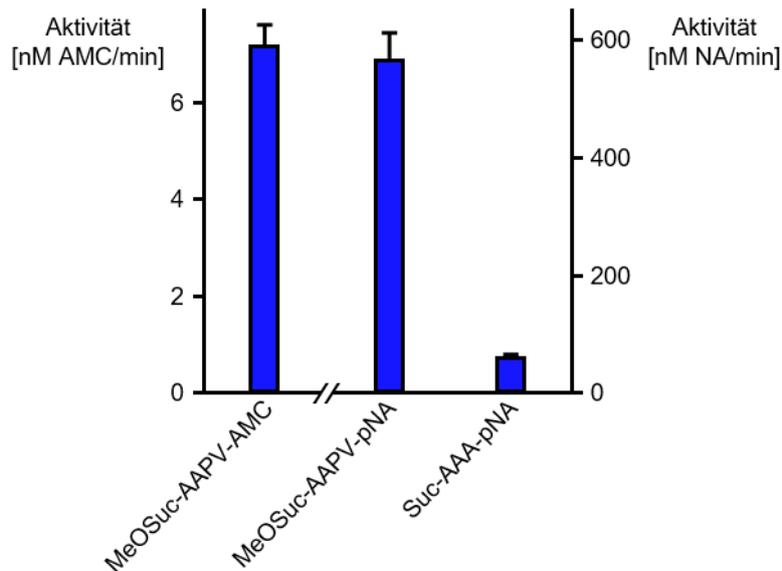


Abb. 4.2: Vergleich der Spaltung von fluorogenen und chromogenen Substraten durch HNE. Die Elastase-Aktivität (0,5 nM) wurde mithilfe des fluorogenen Substrats MeOSuc-AAPV-AMC (20 μ M, linke Ordinate) und den chromogenen Substraten MeOSuc-AAPV-pNA und Suc-AAA-pNA (600 μ M, rechte Ordinate) quantifiziert. Die Spaltung des fluorogenen Substrats wurde anhand einer AMC-Standardkurve in nM AMC/min umgerechnet, diejenige für die chromogenen Substrate mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes in nM NA/min. Mittelwert \pm SD, n = 2 Replikate.

Alle drei Substrate werden durch HNE gespalten (Abb. 4.2). MeOSuc-AAPV-pNA wird gegenüber Suc-AAA-pNA um den Faktor 9 besser umgesetzt. Die Peptidsequenz Ala-Ala-Pro-Val ist somit gegenüber Ala-Ala-Ala besser geeignet, um HNE möglichst sensitiv zu detektieren. Sowohl MeOSuc-AAPV-AMC als auch -pNA sind geeignete HNE-Substrate für unsere Messungen. Da das AMC-Substrat jedoch in deutlich niedrigeren Konzentrationen eingesetzt werden kann (20 μ M gegenüber 600 μ M) und zudem kostengünstiger ist, wurde MeOSuc-AAPV-AMC als Standard-Substrat für weitere Experimente ausgewählt.

4.1.3 Sensitivität des optimierten Enzymassays

Zur Planung weiterer Aktivitätsmessungen wurde zunächst die Sensitivität und der Messbereich ermittelt, innerhalb dessen die HNE-Aktivität mithilfe des gewählten Substrats MeOSuc-AAPV-AMC detektiert werden kann. Dazu wurde eine Elastase-Verdünnungsreihe hergestellt (0-2 nM). Die Aktivität wurde über die Spaltung des Substrats MeOSuc-AAPV-AMC (5 μ M, 37°C) über 10 min in ELP 1 quantifiziert und mithilfe einer AMC-Standardkurve (0 - 0,5 μ M) in nM AMC/min umgerechnet.

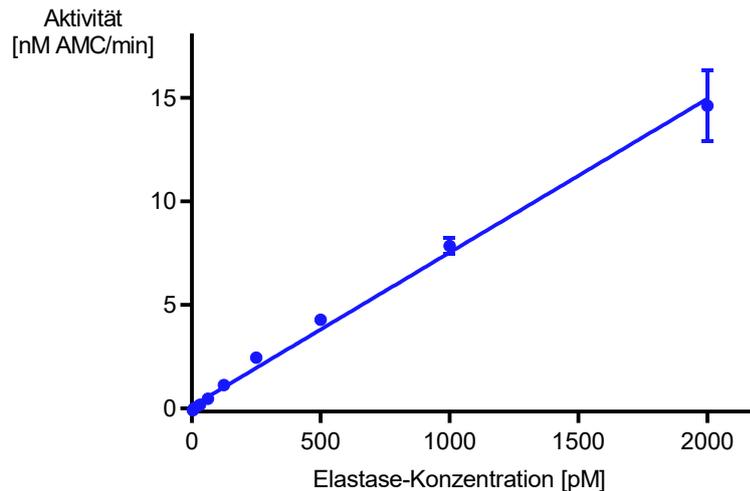


Abb. 4.3: Abhängigkeit der Elastase-Aktivität von der Enzymkonzentration. Die enzymatische Aktivität der isolierten HNE (0-2000 pM) wurde über die Spaltung des Substrats MeOSuc-AAPV-AMC (5 μ M, 10 min, 37°C) bestimmt und mittels einer AMC-Standardkurve in nM AMC/min angegeben. Es wurde eine lineare Regressionsgerade durch die Datenpunkte gelegt ($R^2=0,9958$). Mittelwert \pm SD, n = 2 Replikate.

Die gemessene Aktivität ist weitgehend linear von der eingesetzten Enzymkonzentration abhängig (Abb. 4.3); der Korrelationskoeffizient beträgt $R^2=0,9958$. Die Fluoreszenz von Puffer und Substrat zeigt eine Standardabweichung von ± 14 RF/min (relative Fluoreszenz/min); Aktivitäten ≥ 2 Standardabweichungen ($\approx > 28$ RF/min $\approx 0,2$ nM AMC/min) sollten als signifikant über dem Hintergrundrauschen erkannt werden. Die Sensitivität der Elastase-Detektion liegt damit unter den gewählten Messeinstellungen bei ca. 60 pM. Der Substratverbrauch bei allen HNE-Assays war $< 3\%$. Als Elastase-Standard für spätere Experimente wurde 0,5 nM HNE gewählt, da diese mit ca. 600 RF/min $\approx 4,3$ nM AMC/min im mittleren Messbereich liegt, wodurch einerseits Hemmung gut quantifizierbar ist und andererseits auch längerdauernde Messungen möglich sind, ohne dass der Messbereich überschritten wird.

4.2 Entwicklung eines Zellkulturmodells zur Messung der Aktivität intrazellulärer Elastase

4.2.1 Quantifizierung Elastase-ähnlicher Aktivität in myeloischen Zelllinien und PMN

Im Gegensatz zu isolierten neutrophilen Granulozyten (PMN) bietet ein Zellkulturmodell den Vorteil, dass Zellen stets verfügbar sind und über Wochen in Zellkultur gehalten werden können. Um die Eignung der myeloischen Zelllinien U937 und HL-60 zur Quantifizierung intrazellulärer Elastase-Aktivität zu überprüfen, wurde die HNE-ähnliche Aktivität in Lysaten der Zelllinien mit derjenigen aus Neutrophilen-Lysaten verglichen. Hierzu wurden PMN mithilfe des „MACSxpress Neutrophil Isolation Kit“ aus dem peripheren Blut von drei gesunden Probanden isoliert (s. 3.2.5). Lysate von PMN, U937- und HL-60-Zellen sowie der Mastzelllinie HMC-1 (Negativkontrolle) wurden nach dem „REAP-Protokoll“ (95) in einem Lysepuffer aus PBS, 0,1 % Igepal, pH 7,4 mit anschließender Ultraschallbehandlung (4 Ultraschall-Pulse zu je 15 s auf Eis) hergestellt. Die enzymatische Aktivität wurde über die Spaltung von

MeOSuc-AAPV-AMC bestimmt (vgl. 4.1.3). Um aus der gemessenen Aktivität den HNE-Gehalt errechnen zu können, wurde ein HNE-Standard (0,5 nM) mitgeführt.

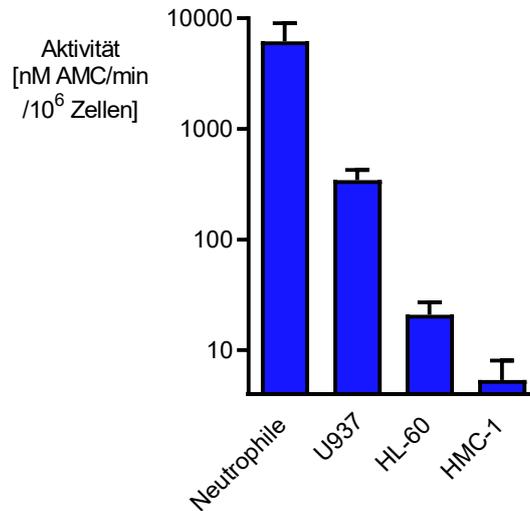


Abb. 4.4: Quantifizierung Elastase-ähnlicher Aktivität in Zellysaten. Elastase-ähnliche Aktivität wurde fluorimetrisch in Lysaten von U937, HL-60, HMC-1 und aus peripherem Blut gewonnenen Neutrophilen (PMN) gemessen. Die Aktivität wurde nach zwanzigminütiger Vorinkubation mit dem Substrat (MeOSuc-AAPV-AMC, 10 μ M, 37 °C) bestimmt und ist in nM AMC/min/ 10^6 Zellen angegeben. Mittelwert \pm SD, n = 3.

In Lysaten von PMN, U937- und HL-60-Zellen konnte signifikante HNE-ähnliche Aktivität nachgewiesen werden, während sie in HMC-1-Lysaten an der Grenze des Detektionslimits lag (Abb. 4.4). PMN-Lysate enthalten mit Abstand am meisten Elastase-ähnliche Aktivität, die in U937- und HL-60-Lysaten ist um den Faktor ~ 20 bzw. ~ 300 geringer. Über den HNE-Standard wurde ein Elastase-Gehalt von $1,0 \pm 0,5$ μ g HNE pro 10^6 PMN ermittelt; dies deckt sich mit Literaturangaben, wonach der HNE-Gehalt zwischen 0,15 und 3,5 μ g/ 10^6 PMN liegt (27-29, 96). Die Aktivität in U937-Lysaten ist deutlich geringer und entspricht $0,06 \pm 0,01$ μ g HNE pro 10^6 Zellen. Sie ist im Vergleich zur Aktivität im PMN-Lysat aber reproduzierbar mit einer deutlich geringeren Varianz von 24 % vs. 46 % messbar, die im Rahmen der Modelletablierung noch weiter auf 6 % reduziert werden konnte (s. 4.2.7).

4.2.2 Validierung der Elastase-Aktivitätsmessung mittels Elastase-Inhibitoren

Um zu verifizieren, dass es sich bei der in Lysaten gemessenen HNE-ähnlichen Aktivität um Elastase handelt, wurden Protease-Inhibitoren verwendet. Lysate von PMN, U937- und HL-60-Zellen sowie isolierte HNE (0,5 nM) wurden über 1 h bei 37 °C mit dem Serinproteaseinhibitor Pefabloc SC (1000 μ M), dem selektiven Elastase-Inhibitor Sivelestat (4 μ M) bzw. ohne Inhibitor inkubiert. Anschließend wurde die Restaktivität gemessen und als % der Aktivität in unbehandelten Proben dargestellt (Abb. 4.5).

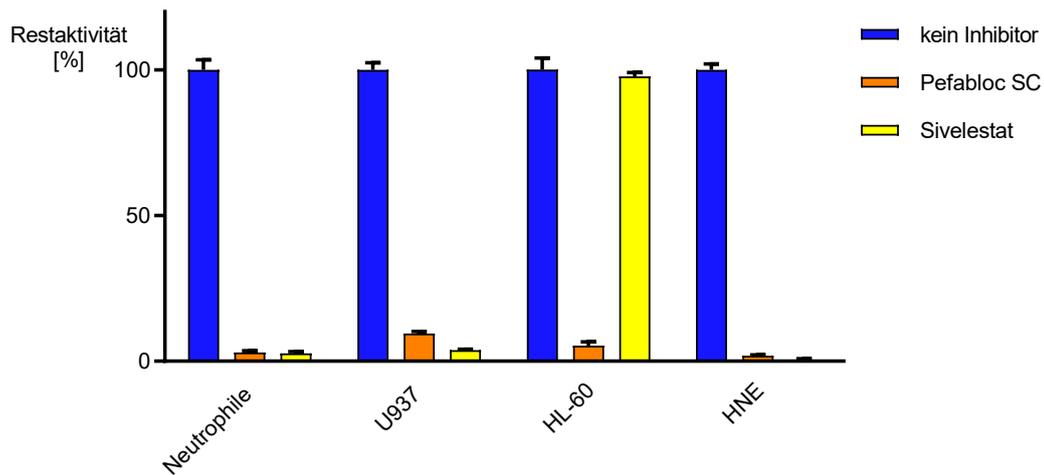


Abb. 4.5: Validierung der Messung der HNE-Aktivität mittels Elastase-Inhibitoren. Lysate von U937- und HL-60-Zellen und Neutrophilen sowie HNE (0,5 nM) wurden über eine Stunde mit dem Serinproteaseinhibitor Pefabloc SC (1000 μ M), dem HNE-Inhibitor Sivelestat (4 μ M) oder ohne Inhibitor inkubiert. Die Elastase-Restaktivität wurde fluorimetrisch bestimmt und in Bezug auf die unbehandelten Proben in Prozent angegeben. Mittelwert \pm SD, n = 3.

In allen Proben wird die Elastase-ähnliche Aktivität durch Pefabloc SC nahezu vollständig (>90%) gehemmt, sie ist damit durch eine Serinprotease bedingt. Der spezifische HNE-Inhibitor Sivelestat hemmt die Aktivität im Lysat von PMN und U937 sowie das isolierte Enzym, nicht jedoch die im HL-60-Lysat. Somit handelt es sich bei der in HL-60-Zellen gemessenen Elastase-ähnlichen Aktivität zwar um eine Serinprotease, nicht aber um HNE.

4.2.3 Kryostabilität der Enzymaktivität in Lysaten

Um die Kryostabilität der Elastase-ähnlichen Aktivität in Lysaten zu überprüfen, wurde die Aktivität im Vergleich zu isolierter HNE (0,5 nM) vor und nach einem Frieren-Tauen-Zyklus fluorimetrisch bestimmt.

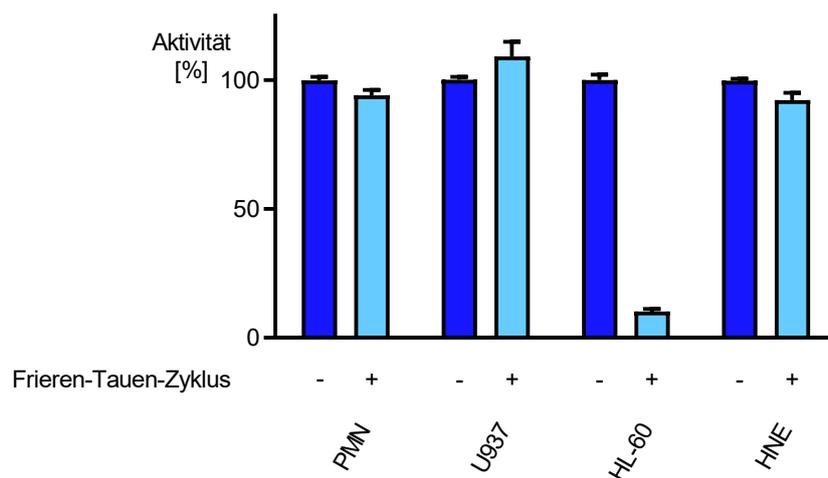


Abb. 4.6: Kryostabilität der Elastase-ähnlichen Aktivität in Zelllysaten. Elastase-ähnliche Aktivität in Lysaten aus PMN, U937- und HL-60-Zellen sowie von isolierter HNE (0,5 nM) wurde vor (-) und nach (+) einem Frieren-Tauen-Zyklus gemessen. Die enzymatische Aktivität ist in % der mittleren Aktivität des frischen Lysates angegeben. Die Messung erfolgte 20 min nach Substrat-Zugabe (MeOSuc-AAPV-AMC, 10 μ M, 37 °C). Mittelwert \pm SEM, n = 3.

Die gemessene Aktivität in PMN- und U937-Lysaten sowie die isolierter HNE ist kryostabil (Abb. 4.6). Die Aktivität in U937-Lysaten nimmt nach dem Tauen sogar etwas zu, was mit

Literaturdaten übereinstimmt (91). Dies erleichtert den experimentellen Ablauf deutlich, da Proben über Nacht eingefroren werden können, ohne an Aktivität zu verlieren. Die HNE-ähnliche Aktivität in HL-60-Lysaten hingegen sinkt um ca. 90% nach einem einmaligen Frieren-Tauen-Zyklus; dies bestätigt die Ergebnisse der Hemmversuche, dass es sich hierbei nicht um HNE handelt (s. 4.2.2).

4.2.4 Nachweis endogener Elastase-Hemmstoffe im Zelllysat

Sowohl in menschlichen als auch in tierischen Neutrophilen sind zytoplasmatische Hemmstoffe beschrieben, welche die Zellen vor Serinproteasen aus ihren Granula schützen (16, 97). Um zu überprüfen, ob solche endogenen Inhibitoren die Elastase-Aktivitätsmessung in unseren Modellzellen modulieren, wurde den Zelllysaten isolierte HNE (0,2 nM) hinzugefügt und die enzymatische Aktivität dieser Proben mit unbehandelten Lysaten und isolierter HNE (0,2 nM) verglichen.

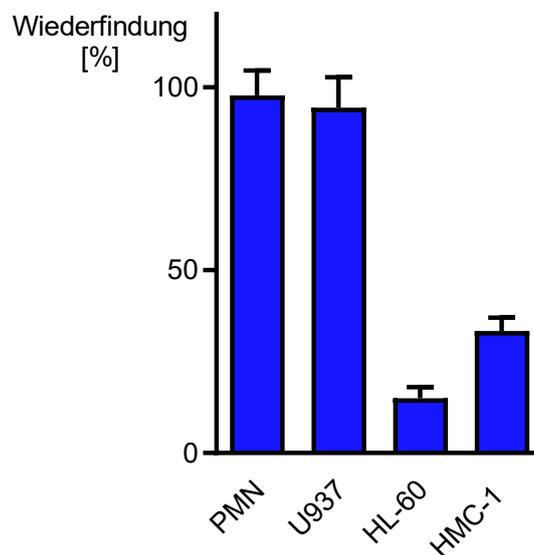


Abb. 4.7: Wiederfindung hinzugefügter Elastase in Zelllysaten. Lysate (PMN, U937, HL-60 und HMC-1) wurden mit HNE (0,2 nM) versetzt und die Aktivität im Vergleich mit unbehandelten Lysaten sowie isolierter HNE (0,2 nM) bestimmt. Die Wiederfindung der hinzugefügten HNE ist in Prozent angegeben. Mittelwert \pm SEM, n = 3.

Die zusätzlichen 0,2 nM HNE werden in PMN- und U937-Lysaten im Rahmen der Messgenauigkeit vollständig wiedergefunden, während die Wiederfindung in HMC-1-Lysaten nur ~ 33 % und in HL-60-Lysaten ~ 15 % beträgt (Abb. 4.7). Diese Reduktion der Aktivität lässt vermuten, dass sich sowohl in HL-60 als auch HMC-1-Zellen endogene Modulatoren befinden, die die Aktivität zugegebener HNE inhibieren.

Um zu überprüfen, ob der Einfluss solcher endogener Modulatoren während der Aktivitätsmessung durch Konkurrenz mit dem Substrat verringert wird, wurde die enzymatische Aktivität von Lysaten in PMN, U937- und HL-60-Zellen, sowie isolierte HNE (0,5 nM) in drei konsekutiven Messungen über 30 min nach Substratzugabe verfolgt. Die Aktivität direkt nach Substratzugabe wurde hierbei als 100 % angesetzt und die Substratspaltung 10 und 20 min nach Messbeginn hierzu in Bezug gesetzt.

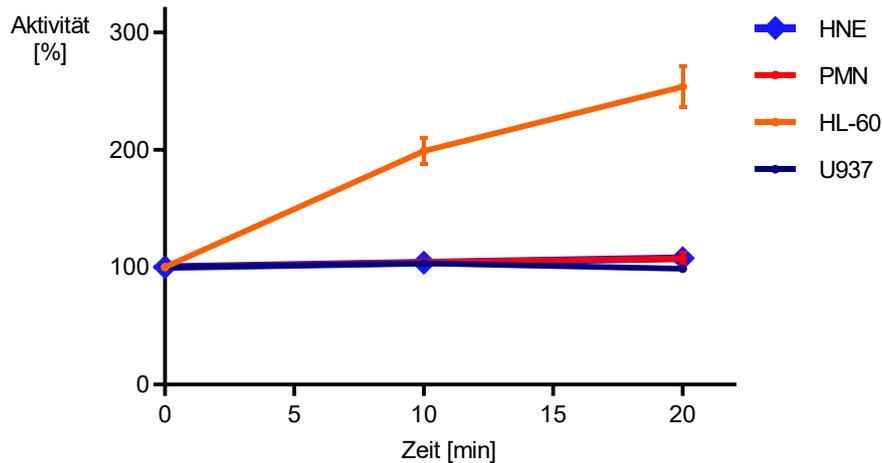


Abb. 4.8: Entwicklung der HNE-ähnlichen Aktivität nach Substratzugabe. Die enzymatische Aktivität wurde in Lysaten von PMN, U937 und HL-60, sowie von 0,5 nM HNE je 0, 10 und 20 min nach Substratzugabe (MeOSuc-AAPV-AMC, 10 μ M) bestimmt. Werte sind in Prozent der Aktivität nach 0 min ausgedrückt. Mittelwert \pm SEM, n = 3.

Die enzymatische Elastase-Aktivität von isolierter HNE, sowie in U937- und PMN-Lysaten bleibt über die Zeit nach Substratzugabe konstant (Abb. 4.8). In HL-60-Lysaten steigt die enzymatische Aktivität 20 min nach Substratzugabe um mehr als das Doppelte an. Dieses Phänomen kann auf reversibel-bindenden Störfaktoren (z.B. endogene Inhibitoren) im Lysat beruhen, die während der Messung durch das Substrat verdrängt werden.

4.2.5 Optimierung der Lysemethode

Während der Modelletablierung wurden Zellen nach der „REAP-Methode“ (95) mittels Ultraschall lysiert. Da weiterführende Experimente in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt werden sollten und eine Ultraschall-Lyse dort nicht umsetzbar ist, wurde die Effektivität der Lyse durch Ultraschallpulse mit drei Frieren-Tauen-Zyklen verglichen. Dazu wurden U937-Zellen in einer Dichte von 1000 Zellen/ μ l in Lysepuffer aufgenommen und homogen vermischt. Die Zellsuspension wurde auf fünf 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße aufgeteilt, wovon vier mit Ultraschall behandelt wurden (2 x, 3 x, 4 x oder 6 x 15 s im Ultraschallbad; 60 W), das fünfte Gefäß wurde drei Frieren-Tauen-Zyklen unterzogen (Trockeneis vs. 37 °C). Die Lysate wurden durch Vortexen gut vermischt und nach Abzentrifugation von Schwebstoffen (20.000 x g, 10 min, 4 °C) die HNE-Aktivität im Überstand bestimmt (Abb. 4.9). Alle fünf Ansätze wiesen vergleichbare Elastase-Aktivitäten auf. Daher wurden für weitere Experimente drei Frieren-Tauen-Zyklen als praktikabelste Lyse-Methode in der Mikrotiterplatte gewählt.

Ergebnisse

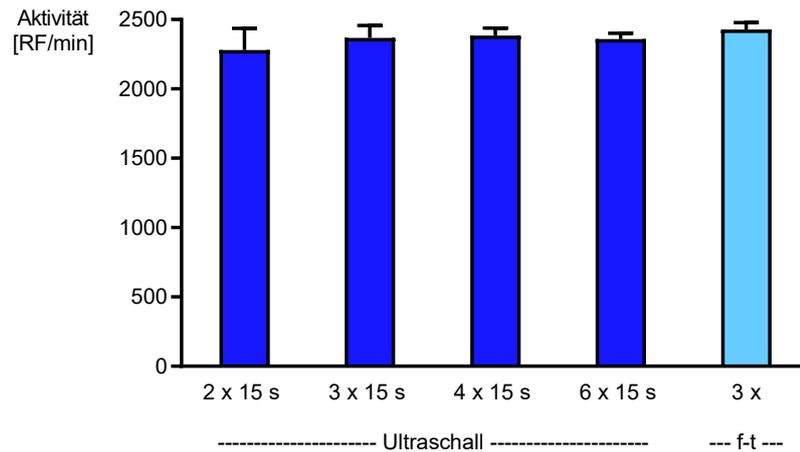


Abb. 4.9: Optimierung der Lyse von U937-Zellen. U937 (1000 Zellen/ μ l in Lysepuffer) wurden mit Ultraschall (2, 3, 4 oder 6 Zyklen à 15 s im Ultraschallbad bei 60 W) bzw. drei Frieren-Tauen-Zyklen (f-t) behandelt. Anschließend wurde die HNE-Aktivität fluorimetrisch quantifiziert. Mittelwert \pm SD, n = 6 Replikate.

4.2.6 Wiederfindung der Elastase in verschiedenen Lysepuffern

Um den Lysepuffer mit der höchsten reproduzierbaren Wiederfindung von HNE-Aktivität im U937-Lysat zu identifizieren, wurden 32 Lysepuffer verglichen. Als Puffersubstanzen dienten PBS (mit Mg^{2+} und Ca^{2+}) und TRIS-HCl (50 mM). Analog zur Optimierung des HNE-Messpuffers (s. 4.1.1) wiesen die Lysepuffer verschiedene pH-Werte auf (6, 7,4 und 9), zudem unterschieden sie sich in ihrem Salzgehalt (0,3 oder 1 M NaCl). Da die Elastase-Aktivität durch DNA gemindert werden kann (98), wurden Puffer mit und ohne Benzonase (spaltet DNA und RNA) hergestellt. Die Detergenzien Igepal, Triton X-100 und Tween 20 wurden in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. U937-Zellen (1000 Zellen/ μ l) wurden dreimal in PBS gewaschen, durch Zugabe eines der 32 Lysepuffer und drei Frieren-Tauen-Zyklen lysiert und anschließend die HNE-Aktivität im Lysat verglichen.

Die Zusammensetzung des Lysepuffers hat deutlichen Einfluss auf die HNE-Aktivität, zwischen der höchsten und niedrigsten gemessenen Aktivität liegt der Faktor 6,4 (Abb. 4.10). Puffer auf PBS-Basis sind Puffern auf TRIS-Basis in der Aktivitätsmessung überlegen, ebenso zeigen eine hohe Salzkonzentration (1M NaCl) und ein physiologischer pH von 7,4 einen positiven Einfluss. Die höchste Aktivität lässt sich nach Lyse in einem Puffer bei pH 7,4 auf PBS-Basis mit 1 M NaCl und 0,1 % Tween 20 mit einer geringen Variabilität von 4,1 % messen. Dieser wurde als Lysepuffer für die folgenden Versuche festgelegt. Der Zusatz von Benzonase hat keinen oder sogar einen negativen Einfluss auf die HNE-Aktivität. Für die Wahl des Detergens ist kein systematischer Effekt auf die Aktivitätsmessung nachweisbar.

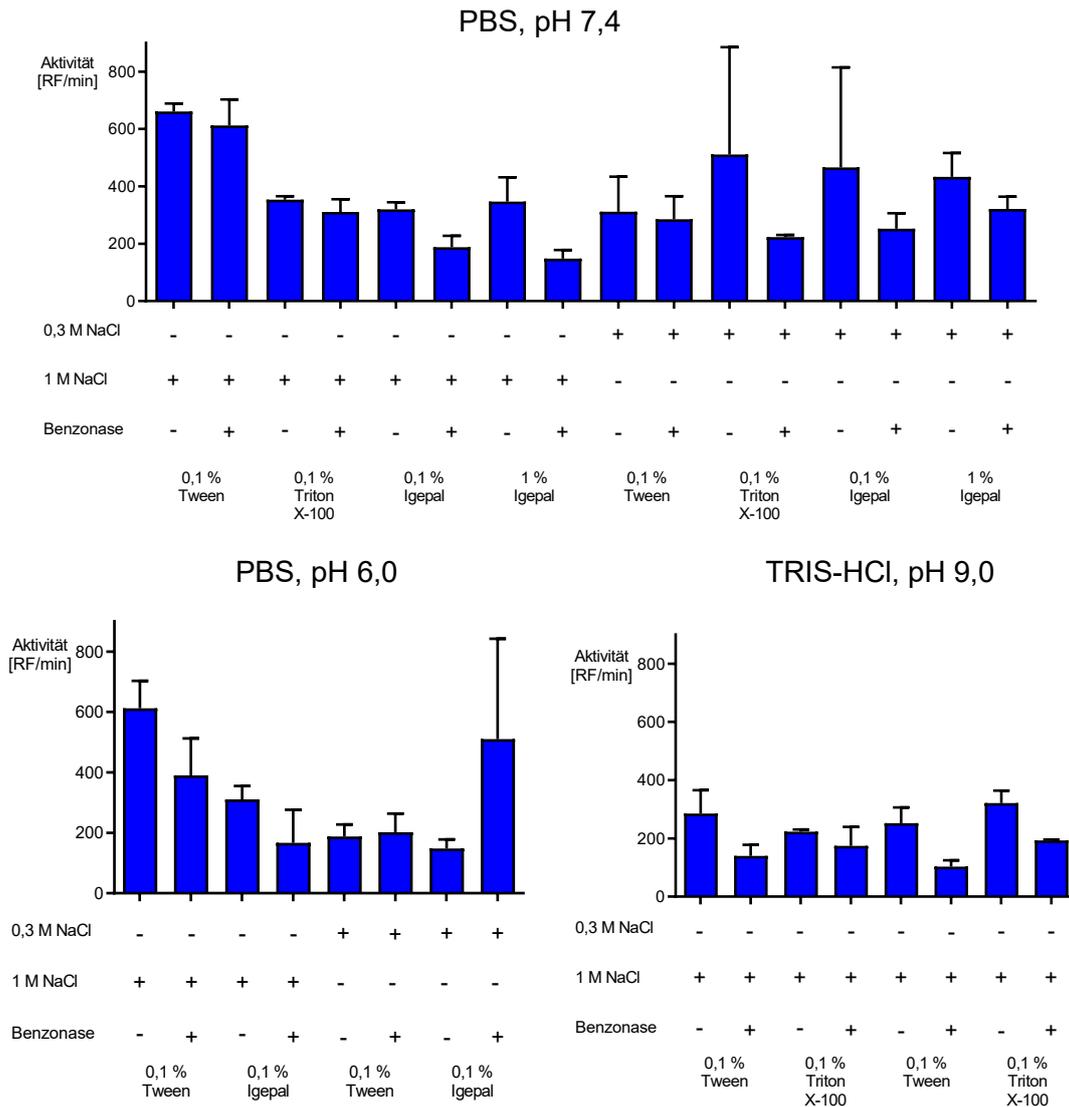


Abb. 4.10 Einfluss des Lysepuffers auf die Elastase-Aktivität in U937-Lysaten. U937-Zellen wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten in verschiedenen Puffern lysiert und die resultierende HNE-Aktivität im Lysat mithilfe des Substrats MeOSuc-AAPV-AMC (10 μ M, 37 °C) quantifiziert. Mittelwert \pm SD, n = 2 Replikate.

4.2.7 Anpassung der Methodik an das 96-Well-Format

Um einen hohen Probendurchsatz zu ermöglichen wurde untersucht, inwieweit reproduzierbare Elastase-Aktivitätsmessungen möglich sind, wenn U937-Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten sowohl kultiviert als auch lysiert werden und ob U- oder V-Well-Platten besser geeignet sind.

U937-Zellen wurden in U- und V-Well-Platten in je 200 μ l pro Well ausgesät, bei 37 °C kurzzeitkultiviert und bei einer Dichte von 1000 Zellen/ μ l geerntet. Die Zellen wurden mit 400 x g abzentrifugiert, 3-mal in PBS (4 °C) gewaschen und anschließend in 200 μ l Lysepuffer aufgenommen. Die Platte wurde drei Frieren-Tauen-Zyklen unterzogen und bei 2100 x g abzentrifugiert (s. 3.2.4.2). Aus 50 μ l Überstand je Well erfolgte die Messung der HNE-Aktivität.

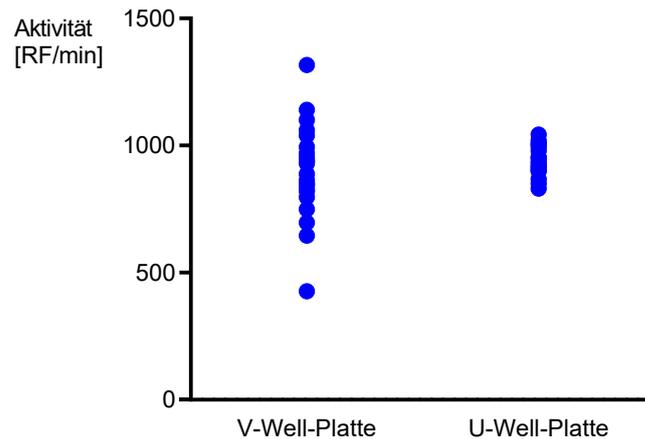


Abb. 4.11: Streuung der HNE-Aktivität nach Lyse von U937-Zellen in 96-U-Well- und 96-V-Well-Mikrotiterplatten. U937-Lysate wurden in 96-V-Well- (n = 23 Replikate) und 96-U-Well-Platten (n = 18 Replikate) hergestellt. Aus jedem Well wurde die Elastase-Aktivität in RF/min bestimmt.

Die mittlere HNE-Aktivität nach Kultur und Lyse in U- und V-Well-Platten ist ähnlich (Abb. 4.11). Die Streubreite in der V-Well Platte liegt jedoch mit einer Varianz von 20 % und einem Faktor 3,4 zwischen minimalem und maximalem Wert deutlich über der in der U-Well-Platte (Varianz 6 %, Faktor 1,3). Da in der U-Well-Platte Elastase-Aktivität mit geringer Streubreite und Varianz quantifiziert werden kann, wurde diese für alle weiteren Zellkulturexperimente eingesetzt.

4.2.8 Detektion weiterer Serinproteasen in Zelllysaten

Neben HNE enthalten PMN weitere sogenannte „Granula-assoziierte Serinproteasen der Immunabwehr“ (GASPIDs). Hierzu zählen insbesondere Proteinase 3 (PR3) und Cathepsin G (Cat G) (26). Um zu überprüfen, ob in unserem Zellkulturmodell auch Cat G- und PR3-Aktivität detektiert werden kann, wurden in einer Pilotstudie U937- und HL-60-Zellen nach optimiertem Protokoll lysiert (s. 3.2.2) und die Enzymaktivitäten anschließend fluorimetrisch gemessen. Die PR3-ähnliche Aktivität wurde dazu durch die Spaltung des FRET-Substrats Abz-Val-Ala-Asp-Nva-Arg-Asp-Arg-Gln-EDDnp (20 μ M) (90) quantifiziert, die Cat G-ähnliche Aktivität mit Suc-AAPF-AMC (99) (20 μ M). Mithilfe von Enzymstandards (3 nM PR3 und 0-100 nM Cat G) wurde anhand der gemessenen Aktivität der Protease-Gehalt in 10^6 Zellen berechnet.

Sowohl in U937- als auch in HL-60-Lysaten war PR3- und Cat G-ähnliche Aktivität nachweisbar (Abb. 4.12). Anhand der Enzymstandards beträgt der PR3-Gehalt $0,47 \pm 0,03 \mu\text{g}/10^6$ in U937-Zellen und $0,26 \pm 0,02 \mu\text{g}/10^6$ in HL-60-Zellen (n = 4 Replikate). Der Cat G-Gehalt liegt in U937 bei $3,8 \pm 0,7 \mu\text{g}/10^6$ Zellen und in HL-60 bei großen Messschwankungen zwischen 2,6 und $5,7 \mu\text{g}/10^6$ Zellen (n \geq 2 Replikate). Die Varianz in der Messung des Enzymstandards beträgt 3,9 % (PR3) und 5,5 % (Cat G). Damit ist in beiden Zelllinien scheinbar mehr Cat G als PR3 enthalten. Die PR3-Messung zeichnet sich durch eine deutlich geringere Varianz aus; zudem zeigte sich, dass die Cat G-Aktivität in Lysaten im Gegensatz zu PR3 nicht kryostabil ist (Daten nicht gezeigt). Um verifizieren zu können, dass

es sich bei den gemessenen Aktivitäten um PR3 und Cat G handelt, müssen Messungen mit spezifischen Inhibitoren folgen.

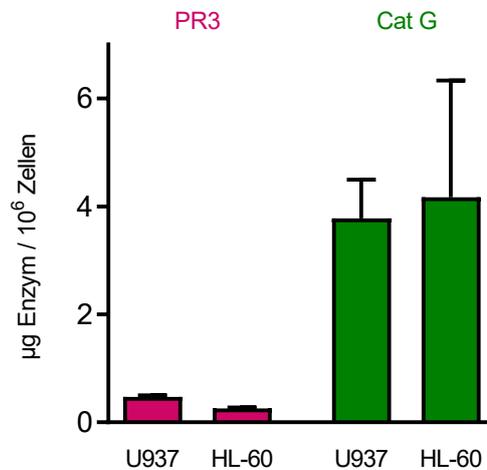


Abb. 4.12: Quantifizierung des PR3- und Cat G-Gehaltes von Zelllysaten. Die PR3-ähnliche Aktivität von U937- und HL-60-Lysaten sowie von isolierter PR3 (3 nM) wurde in RF/min über 10 min quantifiziert (20 µM Abz-Val-Ala-Asp-Nva-Arg-Asp-Arg-Gln-EDDnp, 37 °C); anhand des Enzymstandards wurde der PR3-Gehalt in 10⁶ Zellen ermittelt. Die Cat G-ähnliche Aktivität von U937- und HL-60-Lysaten unterschiedlicher Zellzahl sowie von isoliertem Cat G wurde über 10 min quantifiziert (20 µM Suc-AAPF-AMC, 37°C, 15 min nach Substratzugabe). Anhand der Enzymstandards wurde der Cat G-Gehalt in 10⁶ Zellen ermittelt. Mittelwert ± SD, n = 2-4 Replikate.

4.3 Hemmkinetische Charakterisierung von Elastase-Inhibitoren

4.3.1 Hemmkinetiken zur Ermittlung von IC₅₀ und K_i

Proteaseinhibitoren lassen sich abhängig von der Art der Bindung an das Zielenzym in reversible und irreversible Inhibitoren einteilen (100). Um die Wirkung der Inhibitoren auf isolierte HNE und HNE in U937-Lysaten zu vergleichen, wurden Hemmkinetiken erstellt. Dazu wurde HNE (0,5 nM) bzw. U937-Lysat (1000 Zellen/µl) über 1 h bei 37 °C mit steigenden Inhibitorkonzentrationen inkubiert und anschließend die enzymatische Restaktivität fluorimetrisch quantifiziert. Als Bezugspunkt diente die ungehemmte Aktivität isolierter HNE bzw. von U937-Lysaten. Der Trypsin-Inhibitor Benzamidin sowie der Cat G-Inhibitor fungierten als Negativkontrollen. Der Inhibitor Compound 5b wurde im Gegensatz zu allen anderen Hemmstoffen in einem Phosphatpuffer gemessen (s. 3.1.7), da der Messpuffer ELP 1 den Inhibitor destabilisiert (Daten nicht gezeigt).

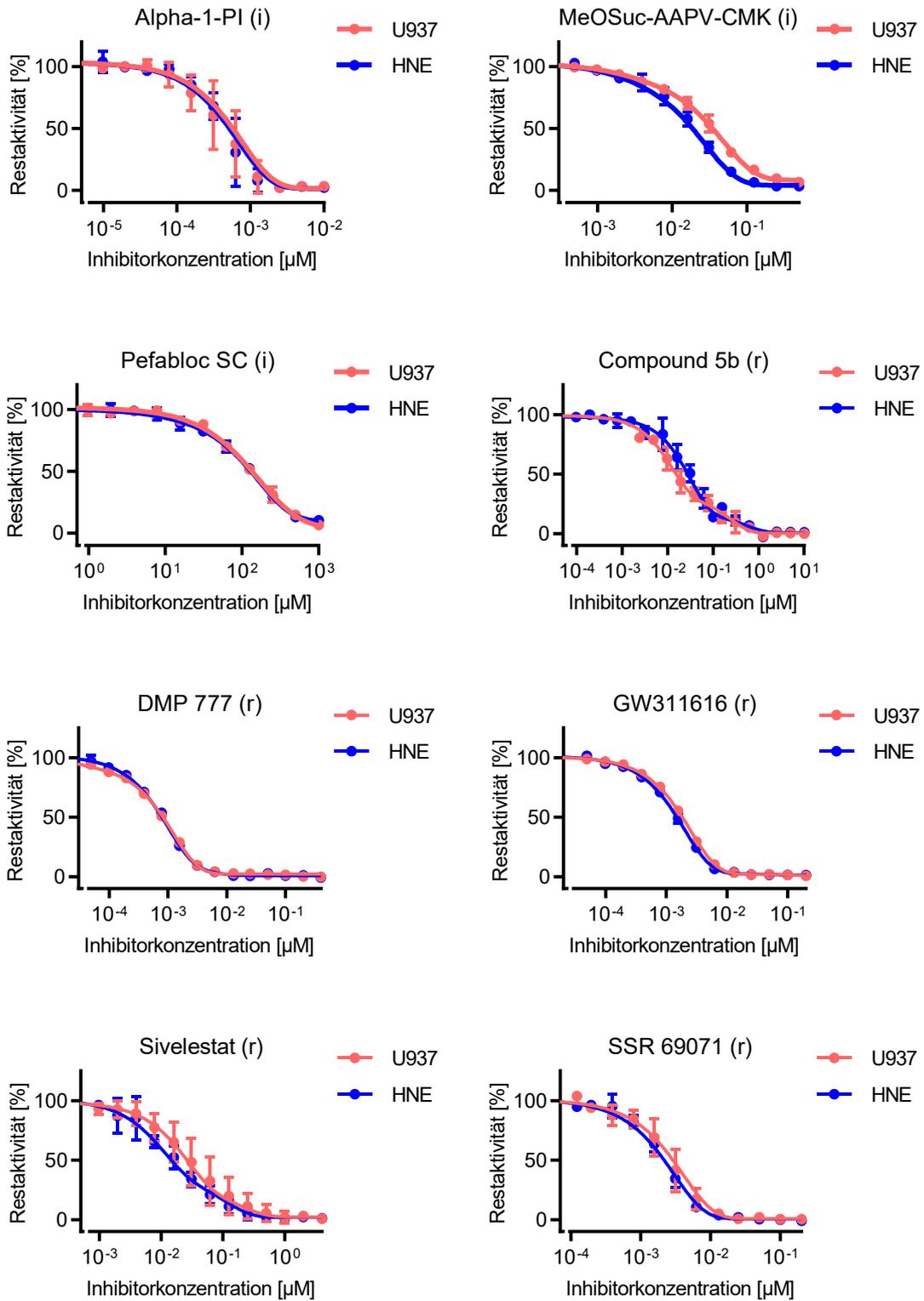


Abb. 4.13: Legende siehe nächste Seite

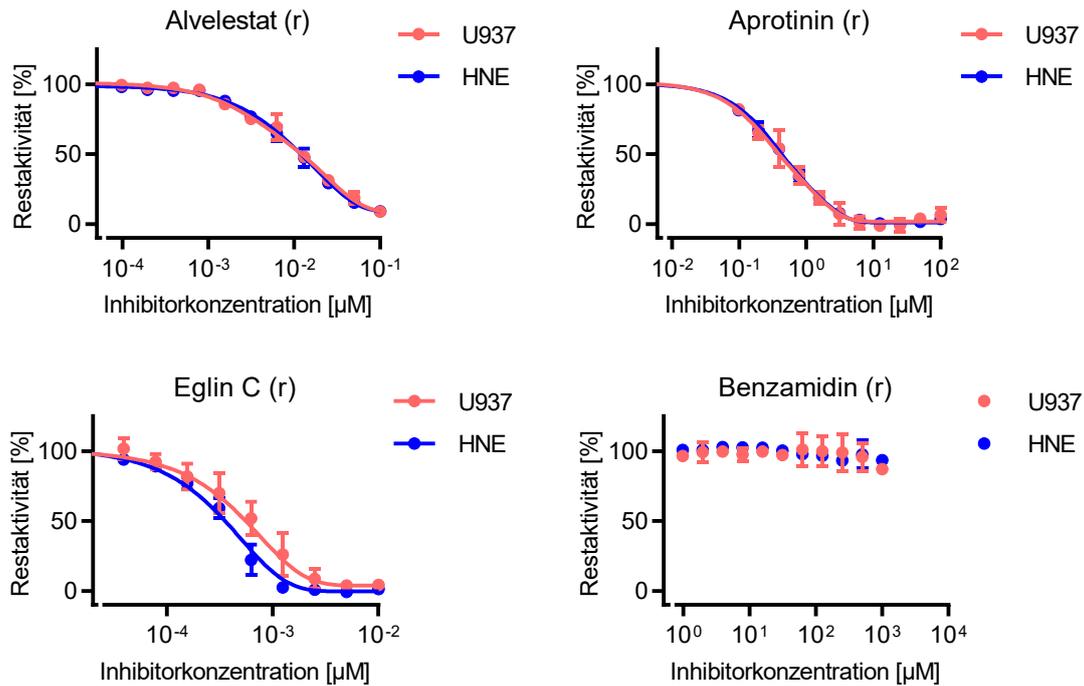


Abb. 4.13: Interaktion von HNE mit reversiblen (r) und irreversiblen (i) Inhibitoren. HNE (0,5 nM) und U937-Lysate (1000 Zellen/µl) wurden über 1 h bei 37 °C mit steigenden Inhibitor-Konzentrationen inkubiert. Die HNE-Aktivität wurde im Anschluss fluorimetrisch quantifiziert, in % der ungehemmten Aktivität dargestellt und eine Ausgleichskurve durch die Datenpunkte gelegt (GraphPad Prism). $n \geq 3$, Mittelwert \pm SD.

Bei allen eingesetzten Elastase-Inhibitoren führen höhere Inhibitor-Konzentrationen zu einer abnehmenden enzymatischen Restaktivität (Abb. 4.13). Eglin C und MeOSuc-AAPV-CMK hemmen isolierte HNE etwas effektiver als das Enzym im Lysat (um den Faktor 7 bzw. 2). Dies kann auf Wechselwirkungen der Inhibitoren mit Lysat-Bestandteilen wie Proteoglykanen zurückzuführen sein oder auf die Interaktion mit verwandten Proteasen wie Proteinase 3 und Cathepsin G im Zelllysate. Die restlichen Hemmstoffe haben im Rahmen der Messgenauigkeit vergleichbaren Einfluss auf isolierte HNE und das Enzym im Lysat. Die Negativkontrollen Benzamidin ($\leq 1000 \mu\text{M}$) und Cathepsin G-Inhibitor ($\leq 10 \mu\text{M}$, Daten nicht gezeigt) haben keinen Einfluss auf die HNE-Aktivität.

Anhand der Hemmkurven wurden die Gleichgewichtskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes K_i für reversible Inhibitoren bzw. die IC_{50} -Werte für irreversible Inhibitoren als Maß der Affinität zwischen HNE und den Inhibitoren bestimmt (s. 3.2.9). Für reversible Inhibitoren unterscheidet sich die Affinität zwischen den Substanzen um den Faktor 10^4 mit K_i -Werten zwischen $1,3 \pm 0,2 \times 10^{-11} \text{ M}$ (Eglin C) und $3,9 \pm 0,4 \times 10^{-7} \text{ M}$ (Aprotinin). Die IC_{50} -Werte der irreversiblen Inhibitoren unterscheiden sich um den Faktor 10^6 und lagen zwischen $4,6 \pm 1,8 \times 10^{-10} \text{ M}$ (Alpha-1-PI) und $1,3 \pm 0,1 \times 10^{-4} \text{ M}$ (Pefabloc SC) (Tab. 4.2). Diese Daten decken sich weitgehend mit Literaturangaben, Unterschiede sind überwiegend durch abweichende Messbedingungen erklärt (s. 5.2.1). Basierend auf den errechneten K_i - und IC_{50} -Werten wurden Inhibitor-Konzentrationen für die nachfolgenden Zellkulturexperimente gewählt, die mindestens um den Faktor 10 höher liegen.

Tab. 4.2: K_i - bzw. IC_{50} -Werte aller verwendeten Inhibitoren für isolierte HNE und HNE in Lysat. Mittelwert \pm SD, $n \geq 3$.

Inhibitor		Isolierte HNE		Lysat	
		K_i [M]	IC_{50} [M]	K_i [M]	IC_{50} [M]
Alpha-1-PI	irreversibel	-/-	$4,6 \pm 1,8 \times 10^{-10}$	-/-	$5,7 \pm 1,5 \times 10^{-10}$
MeOSuc-AAPV-CMK		-/-	$1,7 \pm 0,3 \times 10^{-8}$	-/-	$3,1 \pm 0,4 \times 10^{-8}$
Pefabloc SC		-/-	$1,3 \pm 0,1 \times 10^{-4}$	-/-	$1,3 \pm 0,1 \times 10^{-4}$
Alvelestat	reversibel	$9,0 \pm 2,0 \times 10^{-9}$	-/-	$1,1 \pm 0,2 \times 10^{-8}$	-/-
Aprotinin (BPTI)		$3,9 \pm 0,4 \times 10^{-7}$	-/-	$3,3 \pm 1,4 \times 10^{-7}$	-/-
Benzamidin		$> 1 \times 10^{-3}$	-/-	$> 1 \times 10^{-3}$	-/-
Cat G Inhibitor		$> 1 \times 10^{-5}$	-/-	k.D.	-/-
Eglin C		$1,3 \pm 0,2 \times 10^{-11}$	-/-	$1,9 \pm 0,8 \times 10^{-10}$	-/-
Compound 5b		$2,5 \pm 0,8 \times 10^{-8}$	-/-	$1,9 \pm 0,7 \times 10^{-8}$	-/-
DMP 777		$2,5 \pm 0,1 \times 10^{-10}$	-/-	$3,4 \pm 0,7 \times 10^{-10}$	-/-
GW311616		$4,3 \pm 0,5 \times 10^{-10}$	-/-	$4,9 \pm 0,6 \times 10^{-10}$	-/-
Sivelestat		$1,7 \pm 0,3 \times 10^{-8}$	-/-	$1,9 \pm 0,4 \times 10^{-8}$	-/-
SSR 69071		$3,3 \pm 3,5 \times 10^{-10}$	-/-	$3,3 \pm 2,1 \times 10^{-10}$	-/-

k.D: keine Daten

4.3.2 Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskonstanten der Inhibitoren

Die Dynamik der Bindung der Inhibitoren wird durch deren Assoziations- (k_{on}) und Dissoziationskonstanten (k_{off}) beschrieben. Zur Erhebung der Parameter wurde die Aktivität von 0,6 nM HNE über die Spaltung von MeOSuc-AAPV-AMC ($10 \mu\text{M}$, 37°C) verfolgt, die sich als lineare Zunahme der Fluoreszenz über die Zeit darstellt; die Aktivität entspricht der Steigung, also der Menge des pro Zeit gespaltenen Substrats. Während der laufenden Messung wurden die Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Die Aktivität nimmt ab, was sich als Krümmung der Aktivitätskurve darstellt. Aus dieser Krümmung lässt sich die Assoziationskonstante k_{on} [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$] ermitteln. Für reversible Inhibitoren stellt sich ein Gleichgewicht zwischen gebundener und freier Elastase ein, sodass sich eine neue Gerade mit geringerer Steigung ergibt. Bei irreversiblen Inhibitoren geht die Steigung der Kurve über die Zeit auf null zurück, sofern der Inhibitor wenigstens in derselben Konzentration wie das gemessene Enzym vorliegt. Abb. 4.14 zeigt exemplarisch die kinetischen Messungen („Presteady-State-Kinetik“) des Inhibitors Sivelestat; mit steigender Inhibitor-Konzentration flacht die Kurve zunehmend rasch ab, anhand der Krümmung der Kurve wurde eine k_{on} von $1,2 \pm 0,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt.

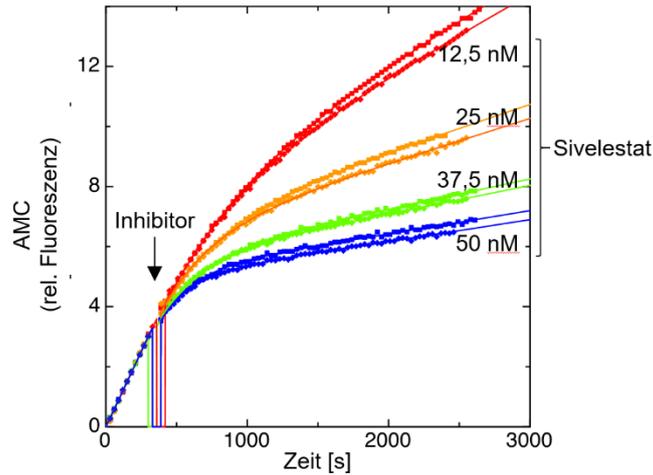


Abb. 4.14: Presteady-State-Kinetik mit dem Elastase-Inhibitor Sivelestat. Die enzymatische Aktivität von HNE (0,6 nM) wurde fluorimetrisch über die Zeit quantifiziert (10 μ M MeOSuc-AAPV-AMC, 37 °C) und der laufenden Reaktion nach ca. 5 min Sivelestat (12,5-50 nM) zugegeben. n = 2.

Die Dissoziationskonstante k_{off} wurde für reversible Inhibitoren rechnerisch nach der Formel $k_{off} = K_i \times k_{on}$ bestimmt. Für irreversible Inhibitoren liegt die k_{off} (nahe) Null, da der Enzym-Inhibitor-Komplex stabil ist und nicht dissoziiert.

Tab. 4.3: Assoziations- und Dissoziationskonstanten der HNE-Inhibitoren. Die Assoziationskonstanten (k_{on}) der reversiblen und irreversiblen Inhibitoren wurden experimentell mit isolierter HNE (0,6 nM) über Presteady-State-Kinetiken bestimmt. Die Dissoziationskonstanten (k_{off}) wurden für reversible Inhibitoren rechnerisch ermittelt. Mittelwert \pm SD, n \geq 3.

Inhibitor		Eigene Daten		Literaturdaten		Referenz
		k_{on} [$M^{-1} s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	k_{on} [$M^{-1} s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	
Alpha-1-PI	irreversibel	$2,1 \pm 0,1 \times 10^6$	≈ 0	$9,7 \times 10^6$ $2,4 \times 10^7$	-/-	(101) (102)
MeOSuc-AAPV-CMK		$5,5 \pm 0,7 \times 10^3$	≈ 0	$1,6 \times 10^3$	-/-	(73)
Pefabloc SC		$1,0 \pm 0,1$	≈ 0	k. D.	-/-	-
Compound 5b	reversibel	$1,8 \pm 0,2 \times 10^5$	$4,5 \times 10^{-3}$	k. D.	k. D.	-
DMP 777		$4,9 \pm 0,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^6$	k. D.	(87)
Eglin C		$2,9 \pm 0,09 \times 10^6$	$3,8 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^6$ $1,3 \times 10^7$ $2,4 \times 10^7$	$8,0 \times 10^{-4}$ $3,5 \times 10^{-5}$	(103) (102) (104)
GW311616		$7,0 \pm 0,2 \times 10^4$	$3,9 \times 10^{-5}$	$6,6 \times 10^3$	$2,1 \times 10^{-6}$	(88)
Sivelestat		$1,2 \pm 0,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^{-3}$	k. D.	k. D.	-
SSR 69071		$2,8 \pm 0,06 \times 10^5$	$9,2 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^5$	$3,1 \times 10^{-6}$	(105)
Alvelestat		-/-	-/-	7×10^6	0,057	(106)
Aprotinin (BPTI)		-/-	-/-	k. D.	k. D.	-

k. D. keine Daten

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die gemessenen Assoziations- und Dissoziationskonstanten zwischen den Inhibitoren deutlich unterscheiden (s. Tab. 4.3). Alvelestat und Aprotinin

reagieren so schnell mit HNE, dass in unserem Versuchsaufbau die Bestimmung der k_{on} nicht möglich war. Daher wurden die Werte für k_{on} und k_{off} von Alvelestat der Literatur entnommen (106, 107), für Aprotinin liegen keine Literaturdaten zur Assoziation mit HNE vor. Die langsamste Assoziation zeigte sich bei dem irreversiblen Serinproteaseinhibitor Pefabloc SC mit $1 \pm 0,1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die k_{off} des Enzym-Inhibitor-Komplexes entscheidet über die Dauer der Enzym-Inhibitor-Assoziation; Inhibitoren mit langsamen Dissoziationsraten werden von einigen Autoren als „*slow-tight-binding*“ bezeichnet und können auf den ersten Blick als irreversible Inhibitoren erscheinen (100). Eine k_{off} von 10^{-3} s^{-1} entspricht hierbei einer Dissoziationshalbzeit von ca. 11 min, eine k_{off} von 10^{-4} s^{-1} bereits 115 min. Damit ist für die Inhibitoren DMP 777, Eglin C, GW311616 und SSR 69071 ($k_{off} \leq 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) nicht zu erwarten, dass sie nach Inkubation von U937-Zellen im Rahmen des Waschvorganges (ca. ½ Stunde) herausverdünnt werden, im Fall von Alvelestat ist dies jedoch wahrscheinlich ($k_{off} = 0,057 \text{ s}^{-1}$, $t_{1/2} \approx 12 \text{ s}$). Für Compound 5b und Sivelestat deren k_{off} im Bereich von 10^{-3} s^{-1} liegt, ist eine teilweise Verdünnung im Rahmen des Waschvorganges möglich, auch wenn man davon ausgeht, dass die geringere Temperatur von $4 \text{ }^\circ\text{C}$ während des Waschens die Dissoziationshalbzeit verlängert.

4.4 Effekte von Elastase-Inhibitoren im Zellkulturmodell

4.4.1 Effekte der Inhibitoren auf die Elastase-Aktivität im U937-Zellkulturmodell

Um die Hemmung intrazellulärer HNE mit dem etablierten Zellkulturmodell zu untersuchen, wurden U937-Zellen mit irreversiblen und reversiblen Serinproteaseinhibitoren in 96-U-Well-Mikrotiterplatten inkubiert. Die Inhibitoren wurden in sieben halblogarithmischen Verdünnungsstufen in Zellkulturmedium verdünnt und die Zellen über 0 h, 3 h, 6 h und 26 h mit den Hemmstoffen inkubiert. Als Kontrollen dienten U937-Zellen, die mit Inhibitor-freiem Medium bzw. den Lösungsmitteln der Inhibitoren (DMSO, dH_2O , 0,9 % NaCl) inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, gewaschen und lysiert (s. 3.2.4). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass bis zum ersten Waschschrift durch Zentrifugation ca. eine viertel Stunde vergeht und diese Zeit der Inkubationsdauer zugeschlagen werden muss. Die HNE-Restaktivität der Lysate wurde fluorimetrisch bestimmt, als Bezugspunkt diente die Aktivität der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle (s. 3.2.4). Von einer signifikanten intrazellulären Hemmung wurde ab 12 % (entsprechend der doppelten Varianz vgl. 4.2.7) ausgegangen.

4.4.1.1 Irreversible Inhibitoren

Für den irreversiblen Serinproteaseinhibitor Pefabloc SC ist die Hemmung der intrazellulären HNE in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Inhibitorkonzentration dargestellt (Abb. 4.15), für alle weiteren Inhibitoren wurde letztere Darstellungsform gewählt (Abb. 4.16-19). Die maximale intrazelluläre Hemmung durch Pefabloc SC ist nach 3 - 6 h

erreicht; nach 26 h verzeichnet sich ein leichter Anstieg der Elastase-Restaktivität, was vermutlich auf die Neusynthese von HNE und auf eine mangelnde Stabilität des Inhibitors zurückzuführen ist (s. 4.4.2). Steigende Inhibitorkonzentrationen führen zu einer ausgeprägteren intrazellulären Hemmung. Das Ausmaß der intrazellulären Hemmung zum Zeitpunkt 0 h (zusätzlich der Erntezeit) entspricht etwa der Hemmung des isolierten Enzyms nach einstündiger Inkubation ($IC_{50} 111 \pm 58 \mu\text{M}$ bzw. $126 \pm 12 \mu\text{M}$ für intrazelluläre und isolierte HNE; s. Abb. 4.13 und Tab. 4.2); der Hemmstoff wirkt also intra- und extrazellulär vergleichbar effektiv.

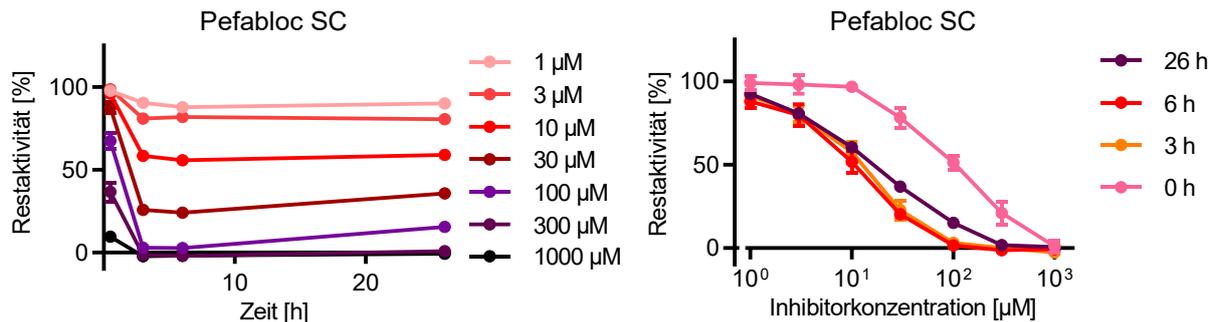


Abb. 4.15: Wirkung von Pefabloc SC auf die enzymatische Aktivität intrazellulärer HNE in U937-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (links) und Inhibitorkonzentration (rechts). U937-Zellen wurden über 0 – 26 h mit Pefabloc SC (1 - 1000 µM) inkubiert, gewaschen, lysiert und die enzymatische Aktivität im Lysat quantifiziert (10 µM MeOSuc-AAPV-AMC, 37 °C). Die Elastase-Restaktivität ist in Prozent der Aktivität in Lysaten der Lösungsmittelkontrolle (dH₂O) dargestellt. Mittelwert ± SEM, n = 8.

Der synthetische Inhibitor MeOSuc-AAPV-CMK hemmt intrazelluläre HNE erst nach 26 h in nennenswertem Ausmaß. Für eine halbmaximale Hemmung sind ca. 30 µM notwendig (Abb. 4.16), während das isolierte Enzym durch 1000-fach geringere Konzentrationen bereits nach einstündiger Inkubation gehemmt wird ($IC_{50} 1,70 \pm 0,34 \times 10^{-2} \mu\text{M}$). Der natürliche Elastase-Inhibitor Alpha-1-PI führt wie erwartet zu keiner intrazellulären Hemmung, er ist Bestandteil des Zellkulturmediums (s. 4.4.2) und des menschlichen Serums (37).

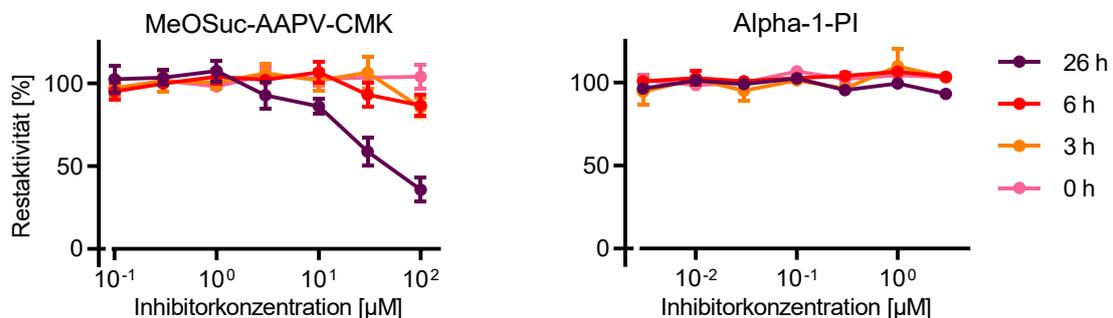


Abb. 4.16: Wirkung von MeOSuc-AAPV-CMK und Alpha-1-PI auf die enzymatische Aktivität intrazellulärer HNE in U937-Zellen in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration nach Inkubation über 0 - 26 h. Die HNE-Aktivität wurde fluorimetrisch bestimmt (10 µM MeOSuc-AAPV-AMC, 37 °C) und in Prozent der Aktivität der Lösungsmittelkontrollen dargestellt. Mittelwert ± SEM, n ≥ 3.

4.4.1.2 Reversible Inhibitoren

Unter den reversiblen synthetischen Inhibitoren zeigen 4 von 6 eine signifikante, konzentrationsabhängige Hemmung intrazellulärer HNE (Abb. 4.17). Die Hemmung intrazellulärer HNE durch DMP 777 und GW311616 nimmt über die Zeit kontinuierlich zu, die IC_{50} nähert sich dabei der mit dem isolierten Enzym bestimmten K_i an, erreicht diese jedoch innerhalb von 26 h nicht vollständig. Eine halbmaximale intrazelluläre Hemmung nach 26 h wird bei beiden Inhibitoren bei Konzentrationen von ca. $6 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ erzielt, während die mit isoliertem Enzym ermittelte K_i bei $2,5 \pm 0,1 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ und $4,3 \pm 0,5 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ für DMP 777 bzw. GW311616 liegt (s. 4.3.1), was vermutlich durch eine erhöhte Diffusionsbarriere im Zellkulturmodell bedingt ist. Damit sind diese beiden die effektivsten intrazellulär wirksamen Elastase-Inhibitoren unserer Versuchsreihe. Die vergleichsweise großen Standardabweichungen der in Gegenwart von DMP 777 bestimmten Werte (Abb. 4.17) sind durch die schlechte Löslichkeit des Inhibitors im Zellkulturmedium bedingt.

Im Gegensatz dazu nimmt die intrazelluläre Wirkung von Compound 5b und SSR 69071 über die Dauer der Inkubation ab, was durch eine Instabilität der Inhibitoren und die Resynthese der HNE bedingt sein kann. Compound 5b ist bereits in Elastase-Messpuffer nicht stabil (vgl. 4.3.1); in Zellkultur hemmt Compound 5b intrazellulär direkt nach Inhibitorzugabe nur in sehr hohen Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{M}$ und verliert dann seine Wirkung, während die K_i für die Hemmung isolierter HNE im nanomolaren Bereich liegt ($2,47 \pm 0,78 \times 10^{-2} \mu\text{M}$, s. 4.3.1). Auch SSR 69071 hemmt intrazelluläre HNE direkt nach Zugabe am besten, aber um den Faktor 10^3 schlechter als das isolierte Enzym.

Überraschenderweise beeinflusst Sivelestat (max. $300 \mu\text{M}$) die intrazelluläre HNE in unserem Modellsystem nicht. Für diesen Inhibitor könnte trotz geringen Molekulargewichtes von 434 g/mol eine erhöhte Diffusionsbarriere bestehen oder er wird intrazellulär instabil bzw. nicht wirksam. Die leicht verminderte Aktivität nach Inkubation mit $\geq 100 \mu\text{M}$ Sivelestat ist nicht signifikant und vermutlich methodisch durch zu geringes Waschvolumen bedingt (s. 5.4).

Für Alvelestat ($\leq 10 \mu\text{M}$) war wie erwartet in unserem Modellsystem keine intrazelluläre Hemmung nachweisbar. Aufgrund dessen kurzer Dissoziationshalbwertszeit von ca. 12 s (s. 4.3.2) ist davon auszugehen, dass die Substanz durch den Waschvorgang, der insgesamt 0,5 h dauert, vollständig vom Enzym diffundiert und herausverdünnt wird. Damit kann die intrazelluläre Wirkung von Alvelestat in unserem Modell nicht beurteilt werden.

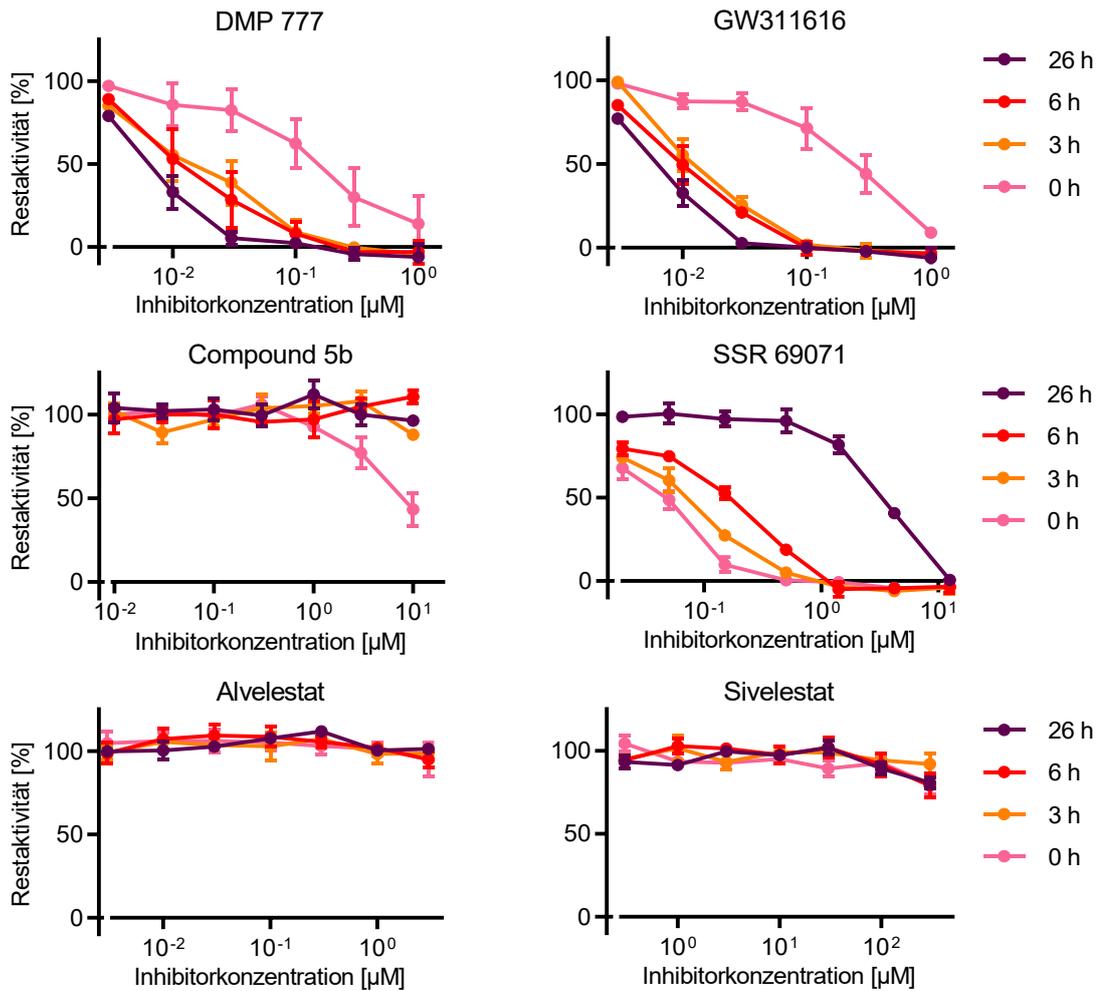


Abb. 4.17: Wirkung synthetischer reversibler Inhibitoren auf die enzymatische Aktivität intrazellulärer HNE in U937-Zellen in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration nach Inkubation über 0 - 26 h. Die HNE-Aktivität wurde fluorimetrisch bestimmt (10 µM MeOSuc-AAPV-AMC, 37 °C) und in Prozent der Aktivität der Lösungsmittelkontrollen dargestellt. Mittelwert ± SEM, n ≥ 3.

Die natürlich vorkommenden Inhibitoren Eglin C und Aprotinin hemmen intrazelluläre HNE in unserem Modellsystem wie erwartet nicht, da sie gegenüber den synthetischen Inhibitoren ein > 10-fach höheres Molekulargewicht aufweisen und dadurch eine erhöhte Diffusionsbarriere besteht (Abb. 4.18).

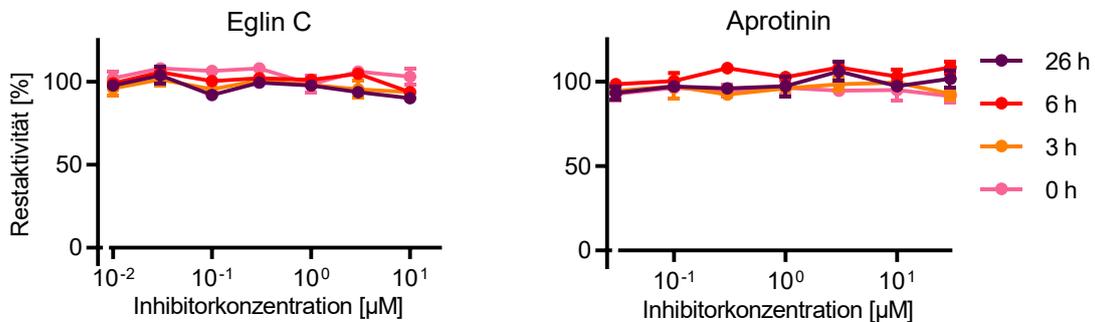


Abb. 4.18: Wirkung natürlich vorkommender, reversibler Inhibitoren auf die enzymatische Aktivität intrazellulärer HNE in U937-Zellen in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration nach Inkubation über 0 - 26 h. Die HNE-Aktivität wurde fluorimetrisch bestimmt (10 µM MeOSuc-AAPV-AMC, 37 °C) und in Prozent der Aktivität der Lösungsmittelkontrollen dargestellt. Mittelwert ± SEM, n ≥ 3.

4.4.1.3 Kontrollen

Die Negativkontrollen Benzamidin ($\leq 1000 \mu\text{M}$) und Cathepsin G-Inhibitor ($\leq 3 \mu\text{M}$), sowie die Lösungsmittelkontrollen DMSO, destilliertes Wasser (dH_2O) und 0,9 % NaCl-Lösung zeigen in den eingesetzten Konzentrationen wie erwartet keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität intrazellulärer Elastase (Abb. 4.19).

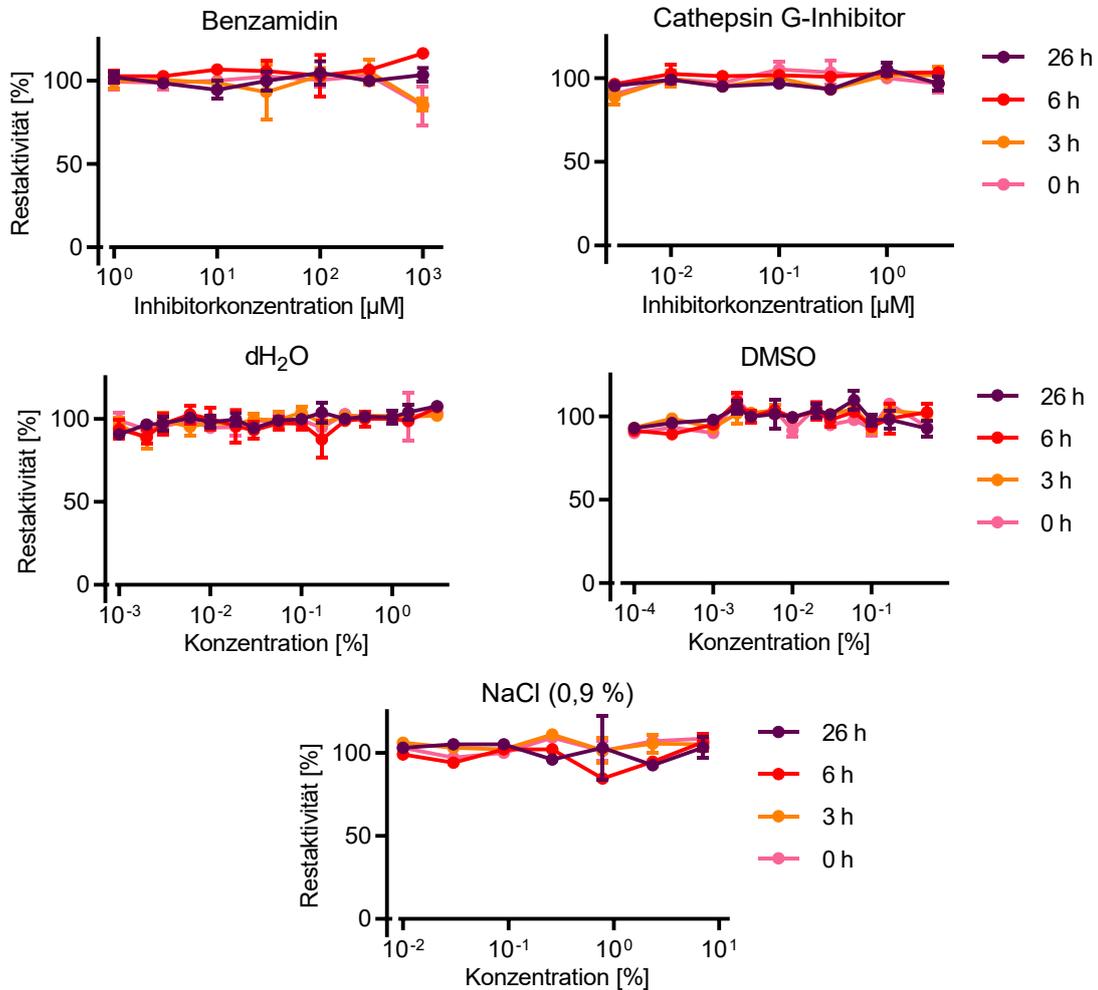


Abb. 4.19: Wirkung von Benzamidin und Cathepsin G-Inhibitor (Negativkontrollen) sowie Lösungsmittelkontrollen auf die enzymatische Aktivität intrazellulärer HNE in U937-Zellen in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration nach Inkubation über 0 - 26 h. Die HNE-Aktivität wurde fluorimetrisch bestimmt ($10 \mu\text{M}$ MeOSuc-AAPV-AMC, 37°C) und in Prozent der Aktivität der Lösungsmittelkontrollen dargestellt. Die Lösungsmittelkontrollen selbst wurden auf unbehandelte U937 bezogen. Mittelwert \pm SEM, $n \geq 3$.

4.4.2 Stabilität von Inhibitoren im Zellkulturmedium

Die Wirkung der Inhibitoren Pefabloc SC, Compound 5b und SSR 69071 auf intrazelluläre HNE in U937-Zellen nehmen über die Inkubationsdauer hinweg ab (s. 4.4.1.1 f.), was durch eine geringe Stabilität der Substanzen oder deren Abbau im Zellkulturmodell bedingt sein könnte. Um die Inhibitorstabilität zu ermitteln, wurde zunächst die Hemmung von HNE durch frisch in Medium verdünnten Inhibitor und Inhibitor nach 26-stündiger Inkubation von U937-Zellen in Medium verglichen. Die Analyse zeigte jedoch, dass bereits das Serum im Zellkulturmedium (10 % FCS) mit Proteaseinhibitoren wie Alpha-1-PI trotz der

Hitzeinaktivierung die HNE-Aktivität vollständig inhibiert (Daten nicht gezeigt). Da serumfreies Zellkulturmedium die Aktivität von HNE nicht beeinflusst, wurden die Inhibitoren in den höchsten eingesetzten Konzentrationen über 26 h in serumfreiem Zellkulturmedium RPMI 1640 bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Hemmung von 0,5 nM HNE mit frisch verdünntem Inhibitor verglichen (Abb. 4.20). Alle Proben enthielten dieselbe Menge Medium, um den Einfluss des roten Farbstoffs in RPMI 1640 auf die Messung auszugleichen.

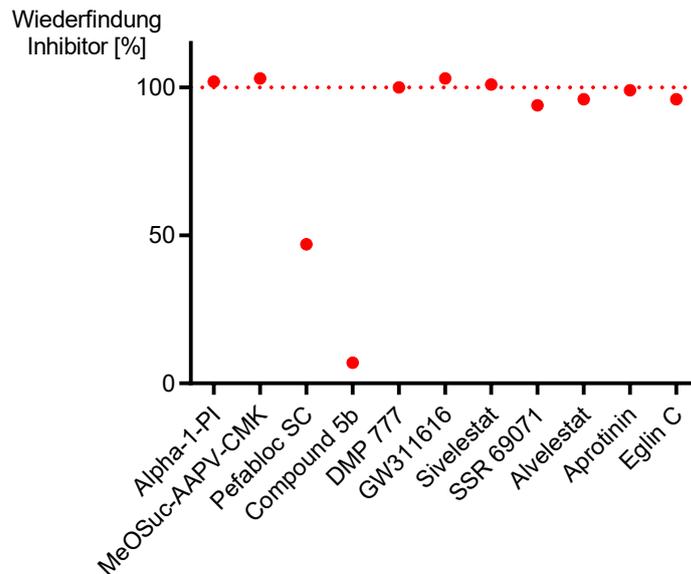


Abb. 4.20: Inhibitorstabilität nach 26 Stunden im Zellkulturmedium RPMI 1640. Die höchsten im Zellkulturmodell verwendeten Inhibitorkonzentrationen wurden in RPMI 1640 (26 h, 37°C) inkubiert und anschließend die Hemmung isolierter HNE (0,5 nM) mit frisch verdünntem Inhibitor (\triangleq 100 % Effektivität) verglichen. n = 1.

Zwei der 11 überprüften Inhibitoren verlieren über die Inkubationsdauer deutlich an Wirksamkeit. Nach 26 h im Zellkulturmedium sind Pefabloc SC und Compound 5b nur noch zu 47 % bzw. 7 % effektiv (Abb. 4.20), was ihre über die Zeit abnehmende Wirksamkeit im Zellkulturmodell erklärt (s. 4.4.1). Die Wiederfindung aller weiteren Inhibitoren liegt bei nahezu 100 %, eine limitierte Stabilität in RPMI 1640 kann also Abnahme der Wirkung von SSR 69071 im Zellkulturmodell über die Zeit nicht erklären (s. 4.4.1.2)

4.4.3 Zytotoxizität von Inhibitoren im U937-Zellkulturmodell

Die Toxizität von Testsubstanzen in unserem Zellkulturmodell könnte zum Verlust Granula-gebundener Elastase ins Zellkulturmedium und damit zu einem Aktivitätsverlust führen, der eine Hemmung intrazellulärer HNE vortäuscht. Um dies zu überprüfen, wurde nach 26-stündiger Inkubation von U937-Zellen mit den höchsten verwendeten Inhibitorkonzentrationen Zellkulturüberstand abgenommen und LDH photometrisch mithilfe des „LDH Cytotoxicity Kit II“ (PromoKine) als Marker für die Toxizität bzw. die Membranstabilität bestimmt (s. 3.2.7).

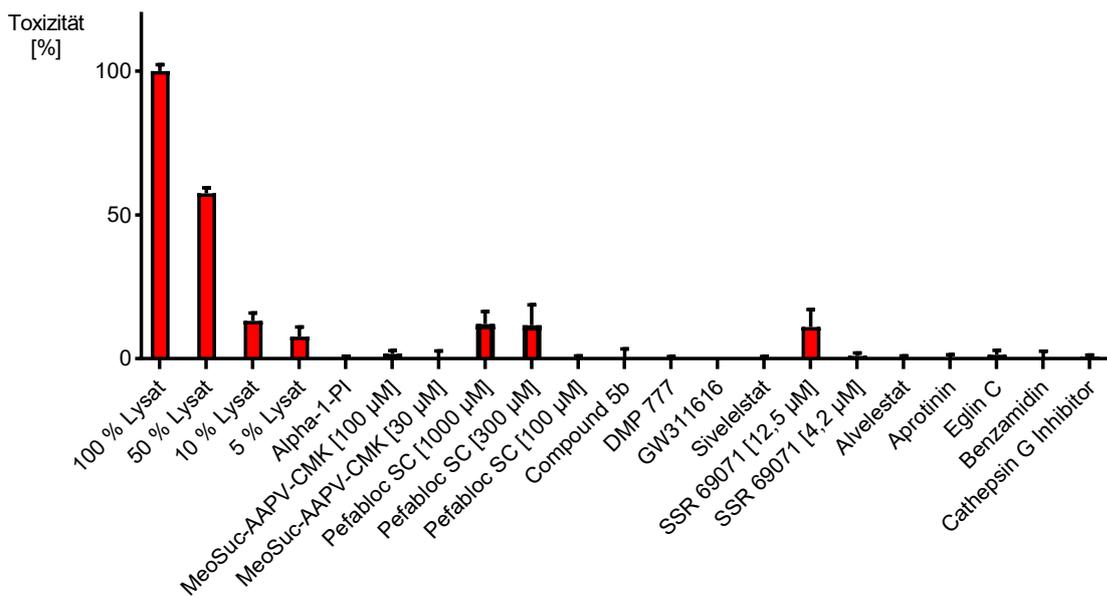


Abb. 4.21: Toxizität der Inhibitoren im U937-Modell nach 26 h Inkubation. U937-Zellen wurden über 26 h in Gegenwart und Abwesenheit der Inhibitoren inkubiert; anschließend wurde die LDH im Zellkulturüberstand photometrisch bestimmt. Die Toxizität ist in % der LDH im U937-Lysat (100 % Lysat) dargestellt. Mittelwert \pm SD, $n \geq 3$.

Lysate von U937-Zellen in verschiedenen Verdünnungsstufen wurden als Standard mitgeführt und zeigen, dass eine Toxizität $\geq 5\%$ detektiert werden kann (Abb. 4.21). Pefabloc SC (1000 und 300 μM) und SSR 69071 (12,5 μM), verursachen in den höchsten eingesetzten Konzentrationen nach der längsten Inkubationszeit (26 h) eine geringe Toxizität von 11-12 %. Es ist damit nicht auszuschließen, dass bei diesen Inhibitoren die Toxizität zur beobachteten Hemmung beiträgt, allerdings haben niedrigere, nicht toxische Konzentrationen einen nahezu identischen Effekt (s. 4.4.1).

4.4.4 Einfluss von Inhibitoren auf die Proliferation von U937-Zellen

Um zu überprüfen, ob eine verminderte Proliferation unter Inhibitoreinwirkung zur beobachteten verminderten HNE-Aktivität beitragen kann, wurde die Proliferation von U937-Zellen mittels CASY-Zellzählgerät nach einer Inkubation von 24 - 72 h mit denjenigen Inhibitoren bestimmt, die HNE intrazellulär hemmen (Tab. 4.4). Es wurden diejenigen Inhibitorkonzentrationen eingesetzt, die eine maximale intrazelluläre Hemmung verursachen.

Unter den Inhibitoren, die intrazelluläre HNE-Aktivität reduzieren, verursachen einzig 300 μM Pefabloc SC eine signifikante Minderung der Proliferation von U937-Zellen um 43 % (Tab 4.4), dies kann zu der beobachteten verminderten HNE-Aktivität beitragen, diese aber nicht vollständig erklären. Die anderen Inhibitoren haben keinen wesentlichen Einfluss auf die Zellproliferation.

Tab. 4.4: Einfluss der intrazellulär wirksamen Inhibitoren auf die Proliferation der U937-Zelllinie. U937-Zellen wurden über 24 - 72 h mit HNE-Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Proliferation ist in Bezug zu unbehandelten U937-Zellen angegeben. Mittelwert (\pm SD), n = 1-3.

Inhibitor	Konzentration [μ M]	Proliferation [%]
MeOSuc-AAPV-CMK	100	93
MeOSuc-AAPV-CMK	30	98 \pm 12
Pefabloc SC	300	57
Pefabloc SC	100	84 \pm 5
DMP 777	0,1	100 \pm 9,5
GW311616	0,1	95 \pm 8,5
SSR 69071	5	95 \pm 6,6

4.5 Effekte von Inhibitoren auf isolierte Neutrophile

4.5.1 Effekt von Inhibitoren auf die Elastase-Aktivität

Es wurde überprüft, ob mit der an U937-Zellen etablierten Methodik auch die Wirkung von Inhibitoren auf intrazelluläre HNE in PMN quantifiziert werden kann. Dazu wurden neutrophile Granulozyten aus venösem Blut von drei Probanden isoliert, in PBS mit Glucose resuspendiert (50 - 100 Zellen/ μ l) und mit 8 HNE-Inhibitoren sowie deren Lösungsmitteln über 1 h bei 37 °C inkubiert. Auf eine längerdauernde Inkubation wurde aufgrund der geringen Überlebenszeit von PMN in Zellkultur verzichtet (108). Zellernte, Lyse und Bestimmung der HNE-Restaktivität erfolgten analog zum U937-Zellkulturmodell (s. 3.2.4 f.). Abb. 4.22 vergleicht die Wirksamkeit der Inhibitoren auf U937-Zellen und PMN; für U937-Zellen sind nur die Daten nach 0 h Inkubation (zuzüglich der Erntedauer) dargestellt, für längere Inkubationszeiträume ergaben sich aber ähnliche Ergebnisse.

Die an U937-Zellen entwickelte Methode ist gut auf isolierte humane PMN übertragbar; die Wirkung von HNE-Inhibitoren auf das intrazelluläre Enzym in PMN lässt sich reproduzierbar quantifizieren (Abb. 4.22). Bei Granulozytenzahlen im Referenzbereich (4000-7000/ μ l (4)) reichen 90 - 160 μ l Vollblut aus, um die Wirkung von 8 Inhibitoren mit je 7 Konzentrationen zu untersuchen.

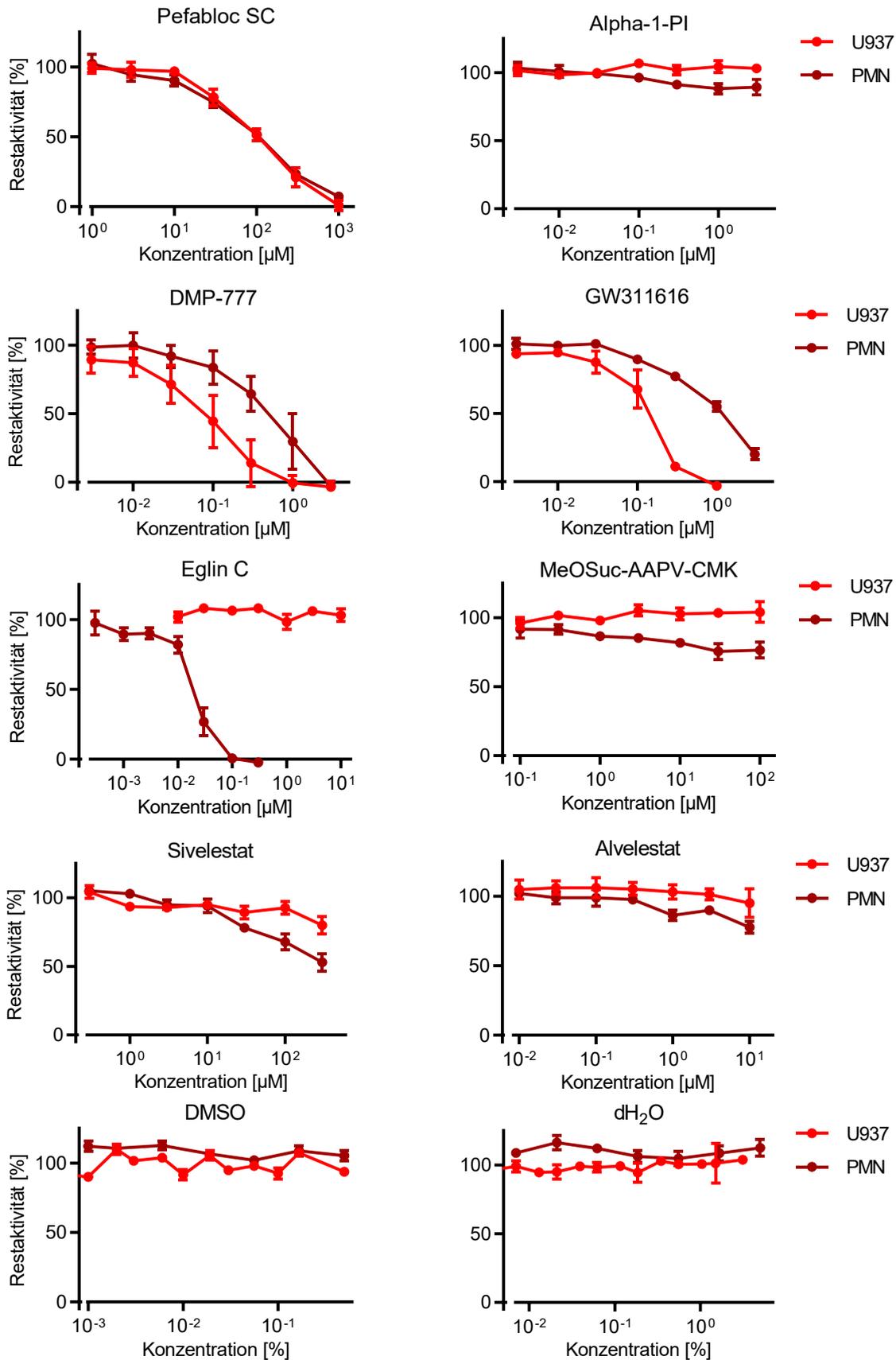


Abb. 4.22: Wirkung von Inhibitoren und ihren Lösungsmitteln auf die enzymatische Aktivität intrazellulärer HNE in U937-Zellen und PMN. U937-Zellen wurden über 0 h und PMN über 1 h (+ 15 min Erntezeit, s. 4.4.1) mit Inhibitoren und deren Lösungsmitteln inkubiert, gewaschen und lysiert. In allen Proben wurde die HNE-Aktivität fluorimetrisch quantifiziert (10 µM MeOSuc-AAPV-AMC, 37 °C) und als Restaktivität in % der Aktivität der Lösungsmittelkontrollen dargestellt. Die Lösungsmittelkontrollen selbst sind auf unbehandelte PMN bezogen. Mittelwert ± SEM, n ≥ 3.

Die irreversiblen Inhibitoren Pefabloc SC und Alpha-1-PI haben eine vergleichbare Wirkung auf intrazelluläre HNE in U937-Zellen und PMN. Pefabloc SC weist eine ähnliche IC_{50} für die Hemmung intrazellulärer HNE in U937 und PMN auf, die zudem etwa der IC_{50} des isolierten Enzyms entspricht (vgl. 4.4.1). Alpha-1-PI hemmt intrazelluläre HNE in PMN analog zu HNE in U937-Zellen nicht, was vermutlich durch das hohe Molekulargewicht (52 kDa) und die entsprechend hohe Diffusionsbarriere bedingt ist. Die leicht verminderte Restaktivität nach Inkubation mit $\geq 0,3 \mu\text{M}$ Alpha-1-PI ist mit ca. 8 % nicht signifikant.

DMP 777 und GW311616 hemmen HNE in U937 trotz kürzerer Inkubationszeit etwa um den Faktor 10 besser als in PMN; eine mögliche Ursache wäre eine höhere Membranpermeabilität. Die vergleichsweise großen Standardabweichungen der in Gegenwart von DMP 777 bestimmten Werte (Abb. 4.22) sind durch die schlechte Löslichkeit des Inhibitors in Zellkulturmedium bedingt.

MeOSuc-AAPV-CMK, Sivelestat, Alvelestat und insbesondere Eglin C hemmen intrazelluläre HNE in PMN besser als in U937. Eglin C hemmt HNE in PMN überraschend trotz des hohen Molekulargewichtes von 8,1 kDa mit einer K_i im nanomolaren Bereich, die nur um den Faktor 100 über der mit isolierter HNE ermittelten liegt (s. 4.3.1). Mit U937-Zellen wird dagegen auch nach 26-stündiger Inkubation keine Hemmung beobachtet. Aus der Literatur ist eine reversible Membranbindung von Eglin C an reife PMN bekannt (109), diese könnte der erste Schritt zu einer Internalisierung des Inhibitors sein, welche die Hemmung intrazellulärer HNE erklären könnte (s. 5.3.3); in U937-Zellen hingegen war keine intrazelluläre Hemmung nachweisbar. MeOSuc-AAPV-CMK und Sivelestat hemmen intrazelluläre HNE in PMN etwas effektiver als in U937-Zellen. Mögliche Ursachen sind die im Gegensatz zu U937-Zellen abgeschlossene HNE-Synthese in PMN oder eine erhöhte Membranpermeabilität von PMN durch den Isoliervorgang. Ein Teil der unter Einfluss von Sivelestat beobachteten Hemmung kann außerdem artifiziell durch ein zu geringes Waschvolumen entstanden sein (s. 5.4). Überraschend war auch eine geringgradige signifikante Hemmung intrazellulärer HNE durch Alvelestat zu verzeichnen, welches aufgrund der kurzen Dissoziationshalbwertszeit von ca. 12 s (s. 4.3.2) während des Waschvorganges herausverdünnt werden müsste. Möglich ist eine intrazelluläre Kompartimentierung der Substanz mit Freisetzung durch die Zellyse und anschließender HNE-Hemmung im Lysat.

Die Lösungsmittel DMSO und destilliertes Wasser haben wie erwartet in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Aktivität intrazellulärer HNE in U937-Zellen und PMN.

4.5.2 Zytotoxizität und Stabilität der Inhibitoren

Um zu überprüfen, ob die Testsubstanzen einen toxischen Effekt auf PMN haben, wurde analog zum U937-Modellsystem die LDH photometrisch im Zellkulturüberstand nach einstündiger Inkubation von PMN mit den Inhibitoren bestimmt. Aufgrund der um den Faktor

10 - 20 geringeren Zellzahl im Vergleich zum U937-Modell war eine LDH-Bestimmung mit dem „LDH Cytotoxicity Kit II“ (PromoKine) jedoch nicht möglich. Auch das laut Herstellerangaben 10-fach sensitivere „Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit“ (Thermo Scientific) detektiert lediglich die 100 %-Positivkontrolle, nicht jedoch die 50%- Kontrolle. 100 % Toxizität ergab sich für keinen der Inhibitoren. Insgesamt ist eine höhergradige Toxizität der Substanzen auf PMN unwahrscheinlich, da bei deutlich längerer Inkubation von U937-Zellen mit denselben Inhibitoren nur geringgradig toxische Effekte durch Pefabloc SC in den höchsten Konzentrationen auftraten. Für folgende Experimente müssen andere Methoden zur Toxizitäts-Bestimmung angewandt werden, z.B. die Zell-Viabilitätsbestimmung mittels Lebendfarbstoffen wie Trypanblau.

Um die Inhibitorstabilität zu überprüfen, wurde die Hemmung von isolierter HNE (0,5 nM) durch die höchsten verwendeten Inhibitorkonzentrationen im Zellkulturüberstand nach 1-stündiger Inkubation von PMN mit der Wirkung des frisch verdünnten Inhibitors verglichen (s. 3.2.8). Da das PMN-Medium (PBS mit Glucose) im Gegensatz zu U937-Medium kein FCS enthält, ist eine direkte Messung möglich (vgl. 4.4.2). Die Wirkung der Inhibitoren aus dem Zellkulturüberstand und der frisch verdünnten Inhibitoren unterschied sich um maximal 10 %, damit spielte die Stabilität der Inhibitoren für die Inkubationsdauer von einer Stunde keine wesentliche Rolle.

4.6 Detektion von Elastase in Zelllysaten mittels Western Blot

Um zu überprüfen, ob HNE-Inhibitoren einen Einfluss auf die Menge des intrazellulären HNE-Proteins haben, wurde versucht, HNE in Zelllysaten immunologisch mittels Western Blot zu detektieren. Dazu wurden Lysate von U937-, HL-60-, HMC-1-Zellen und isolierten PMN hergestellt und mit isolierter HNE als Positivkontrolle im Western Blot eingesetzt (s. 3.2.10); einzelne U937-Proben wurden zusätzlich mit Alpha-1-PI oder isolierter HNE versetzt. Zwei monoklonale und ein polyklonaler HNE-Primärantikörper verschiedener Hersteller und zwei verschiedene Sekundärantikörper wurden in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt, z.T. unter Zugabe von 0,5 - 5 % Milch zur Blockierung. Die Detektion erfolgte auf Nitrozellulose- und PVDF-Membranen.

Trotz umfangreicher Optimierung war eine konsistente Detektion von Elastase im Western Blot nicht möglich. Der polyklonale HNE-Antikörper ab68672 detektierte in einigen Blots Elastase in PMN-Lysaten und auch die Ladungskontrolle, die Ergebnisse waren jedoch schlecht reproduzierbar. Der monoklonale HNE-Antikörper sc-55549 detektierte in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:200 - 1:2000) trotz Zugabe von Milch zahlreiche unspezifische Banden, sodass sich die Elastase-Bande nicht abgrenzen ließ. Der monoklonale C-terminal bindende HNE-Antikörper ab131260 detektiert Elastase in U937-Lysaten (Abb. 4.23), nicht aber die HNE-Kontrolle oder HNE in PMN- und HL-60-Lysaten. Wurden die U937-Lysate vor Erstellung

der Western Blot-Proben mit Alpha-1-PI inkubiert, war im Western Blot ein SDS-stabiler Komplex bei ca. 80 kDa nachweisbar; dieses Molekulargewicht entspricht einem Komplex aus Alpha-1-PI und HNE. Wurde derselben Probe isolierte HNE zugegeben, war keine Bande mehr nachweisbar. Die Ergebnisse sind möglicherweise dadurch zu erklären, dass enzymatisch aktive HNE aufgrund einer C-terminalen Autoproteolyse (110) der Detektion durch den C-terminal bindenden monoklonalen Antikörper ab131260 entgeht. Trotz umfangreicher Optimierungsprozesse, Einsatz nach Protokollen aus verschiedenen Publikationen (51, 111-113) und Rücksprache mit den Herstellern war eine zuverlässige immunologische Detektion nicht möglich, sodass diese Versuchsreihe abgebrochen wurde.

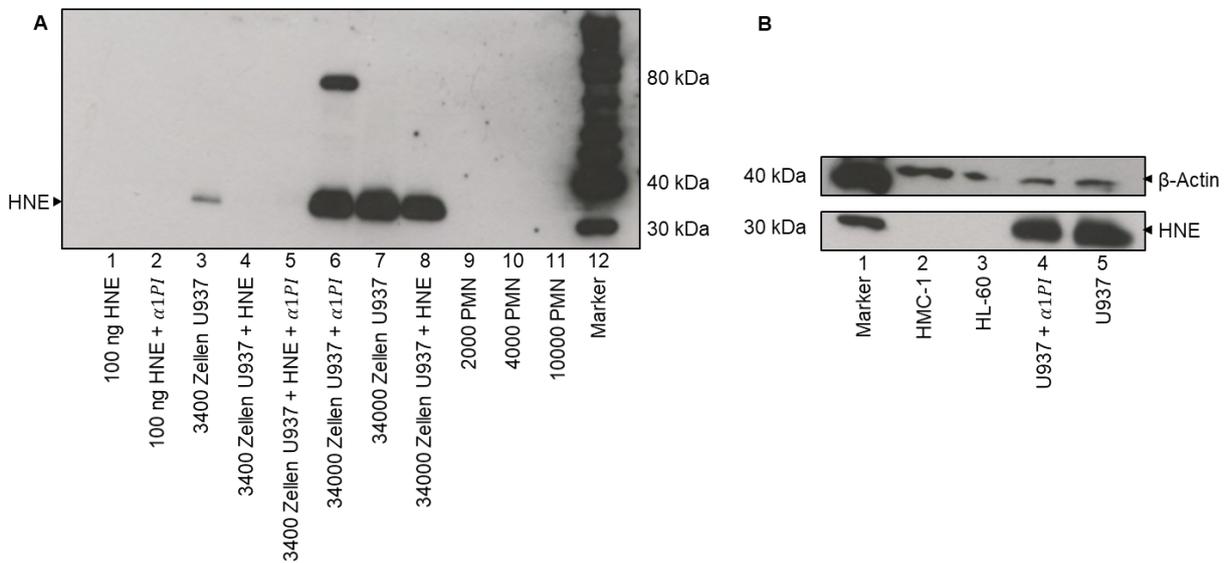


Abb. 4.23: Western Blot Analyse aus verschiedenen Zelllysaten zur Detektion von HNE (A & B) mittels HNE-Antikörper ab131260 und β -Actin als Ladekontrolle (B). A) HNE-Detektion einer HNE-Kontrolle (100 ng) und in Zelllysaten aus U937 (3400 und 34000 Zellen) und PMN (2000 - 10000 Zellen), die Proben wurden z.T. mit 320 nM $\alpha 1PI$ versetzt und ausgewählte U937-Lysate zusätzlich mit 100 ng HNE. B) Unten: immunologische HNE-Detektion in Lysaten aus je 20000 Zellen HMC-1, HL-60 und U937, eine U937-Probe wurde zusätzlich mit $\alpha 1PI$ versetzt. Oben: Immunologische Detektion von β -Actin als Ladekontrolle.

5 Diskussion

Neutrophile Granulozyten sind zentraler Bestandteil der angeborenen Immunabwehr, spielen aber auch eine Rolle bei der Entstehung akuter und chronisch-entzündlicher Erkrankungen (114, 115). Die primäre Serinprotease dieser Leukozyten, die humane neutrophilen Elastase, wurde vor mehr als 50 Jahren als pathophysiologisch relevanter Mediator identifiziert und ist seitdem Zielstruktur der pharmakologischen Inhibitor-Entwicklung. HNE ist in ihrer aktiven Form in azurophilen Granula gespeichert und entfaltet ihre Wirkung sowohl intrazellulär im Phagolysosom als auch in extrazellulären Kompartimenten (membrangebunden an PMN, in NETs, frei im Extrazellulärraum) (13). Ist das Gleichgewicht aus extrazellulärer HNE und ihren Antiproteasen (v.a. Alpha-1-PI) gestört, führt die proteolytische Aktivität des Enzyms zu ausgedehnter Entzündung und Gewebedestruktion, z.B. in Form eines Lungenemphysems bei COPD (42). Ansätze, die Interaktion von HNE und extrazellulärem Gewebe zu verhindern, sind die Hemmung der freigesetzten HNE oder alternativ die intrazelluläre Elastase-Hemmung (88). Obwohl dutzende Inhibitoren bis ins Tiermodell und in klinische Studien entwickelt wurden, ist bislang nicht systematisch untersucht, inwieweit Hemmstoffe die intrazelluläre Elastase-Aktivität beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Zellkulturmodell entwickelt, das die reproduzierbare Quantifizierung der HNE-Aktivität in der Zelllinie U937 und isolierten PMN ermöglicht. Strukturell verschiedene Elastase-Inhibitoren wurden mit isolierter HNE enzymkinetisch charakterisiert und die Ergebnisse mit der Wirkung auf das intrazelluläre Enzym verglichen. Hierbei wurde auch die Wirkung auf die Zielzelle in Hinblick auf Proliferation und Toxizität berücksichtigt.

5.1 Etablierung einer Methode zur Quantifizierung der Elastase-Aktivität

5.1.1 Einfluss von Puffern auf die Elastase-Aktivität

Zur Auswahl eines geeigneten Puffers für die Bestimmung der enzymatischen Elastase-Aktivität wurden neun Puffer mit unterschiedlichem pH und Elektrolytzusammensetzungen miteinander verglichen; die Elastase-Aktivität wurde über die Spaltung des fluorogenen Substrats MeOSuc-AAPV-AMC quantifiziert. Die höchste enzymatische Aktivität wurde bei einem pH von 8,0 beobachtet, was dem vorbeschriebenen Aktivitätsoptimum der Elastase entspricht (2), die geringste bei einem pH von 6,0, dem pH azurophiler Granula (25). In Bezug auf den Salzgehalt der Puffer konnten wir analog *Senior et al. (1982)* nachweisen, dass NaCl die Elastase-Aktivität steigert. Obwohl MgCl₂ und KCl bei Elastase-Aktivitätsmessungen beschrieben wurden (63, 92), zeigten sie in unserer Aktivitätsmessung keinen förderlichen Einfluss. Überraschenderweise minderte die Zugabe von Heparin die HNE-Aktivität nicht, obwohl *Redini et al. (1988)* (116) eine hemmende Wirkung durch dessen negative Ladungen beschrieben haben. Auch Detergenzien hatten kaum Einfluss auf die Höhe der Elastase-

Aktivität, was darauf schließen lässt, dass HNE in unseren Messungen kaum an Plastik adhärert. Die höchsten Aktivitäten und niedrige Messvarianz (5,1 %) hat HNE in einem Messpuffer auf TRIS-HCl-Basis am pH-Optimum (8,0) mit hoher Salzkonzentration (0,5 M) und dem nicht-ionischen Detergens Triton X-100 (0,01%), der für die weiteren Aktivitätsmessungen verwendet wurde.

5.1.2 Eignung fluorogener und chromogener Substrate für die HNE-Aktivitätsmessung

Um ein geeignetes Substrat auszuwählen, das HNE möglichst selektiv und sensitiv detektiert, wurde die Spaltung eines fluorogenen und zwei chromogener Substrate (MeOSuc-AAPV-AMC bzw. MeOSuc-AAPV-pNA und Suc-AAA-pNA (117, 118)) bei ansonsten identischen Messbedingungen verglichen. Die HNE-Aktivität ließ sich sowohl durch die Spaltung fluorogener als auch chromogener Substrate quantifizieren. Bei Vergleich der chromogenen Substrate zeigte sich, dass HNE die Peptidsequenz Ala-Ala-Pro-Val-x wesentlich effektiver spaltet als Ala-Ala-Ala-x. Dieses Ergebnis korreliert mit k_{cat}/K_m -Werten aus der Literatur, die für Suc-AAA-pNA $570 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und für MeOSuc-AAPV-pNA $120.000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ betragen (119). Für die chromogene Messung wurden im Vergleich deutlich höhere Substratkonzentrationen benötigt (600 μM gegenüber 20 μM in der fluorogenen Messung). Da mit dem AMC-Substrat bei vergleichbaren Kosten achtmal mehr Proben gemessen werden können als mit dem pNA-Substrat und unsere Arbeitsgruppe schwerpunktmäßig fluorogene Aktivitätsmessungen durchführt, wurde MeOSuc-AAPV-AMC als Standardsubstrat festgelegt. Die Aktivitätsmessung einer HNE-Standardkurve (0 - 2 nM) mit MeOSuc-AAPV-AMC zeigt eine lineare Zunahme der Substratspaltung bei steigender Enzymkonzentration ($R^2=0,9958$), wobei der Substratverbrauch unter den gewählten Messeinstellungen (0,5 nM HNE, 10 μM Substrat, 10 min, 37 °C) bei < 3 % lag. Nach Optimierung der Messbedingungen kann die Aktivität von 60 pM HNE über dem Hintergrundrauschen detektiert werden.

5.1.3 Eignung eines Zellkulturmodells zur Quantifizierung der Elastase-Aktivität

Eine Methode um Elastase-Aktivität in Mäusen *in vivo* mittels Fluoreszenztomographie zu quantifizieren, wurde 2011 durch *Kossodo et al.* beschrieben (120). Murine Elastase weist allerdings nur eine 69-prozentige Sequenzübereinstimmung mit humaner Elastase auf (zum Vergleich: die Sequenz-Übereinstimmung von humaner PR3 und HNE liegt bereits bei 53 %) (121). Daher ist die Übertragung der Ergebnisse aus dem Mausmodell auf den Menschen kritisch zu sehen. Ein Zellkulturmodell bietet gegenüber dem Tiermodell den Vorteil, dass Zellen humanen Ursprungs untersucht werden. Darüber hinaus kann im Zellkulturmodell die Aktivität humaner neutrophilen Elastase kostengünstig untersucht werden. Im Vergleich zu isolierten PMN bieten Elastase-exprimierende Zelllinien wie U937, HL-60 und THP-1 (91, 122,

123) den Vorteil, dass sie in Kultur stabil sind und konstitutiv HNE exprimieren. Für unser Zellkulturmodell wurden U937- und HL-60-Zellen in Betracht gezogen, die von Leukämiepatienten isoliert wurden und myelo-monozytären Ursprungs sind (124-126). Beide Zelllinien können in monozytärer Richtung ausdifferenziert werden (127, 128), HL-60-Zellen zusätzlich in granulozytärer Richtung (126). Für unsere Experimente entschieden wir uns gegen eine Differenzierung, um die Proliferation der Zellen aufrechtzuerhalten. Aufgrund der geringen Verdopplungszeiten (U937: 21 h und HL-60: 20 h, Daten nicht gezeigt) können stets große Zellpopulationen für Experimente zur Verfügung gestellt werden. Die Zellen können über mehrere Wochen in Kultur gehalten werden, sofern sie alle 3-4 Tage passagiert werden und die Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml nicht überschritten wird (129, 130). Dadurch sind Experimente von mehreren Tagen Dauer möglich, wohingegen isolierte PMN *ex vivo* wenige Stunden bis maximal einen Tag lebensfähig sind (108, 131). Außerdem exprimieren Zelllinien als Vorläuferzellen konstitutiv HNE, während die HNE-Synthese in reifen PMN abgeschlossen ist (132).

5.1.4 Quantifizierung Elastase-ähnlicher Aktivität in Zelllysaten

HNE ist enzymatisch aktiv in den azurophilen Granula von PMN gespeichert, die das Hauptreservoir der Protease darstellen (28). Um die Eignung der Zelllinien für unser Zellkulturmodell zu evaluieren, wurde die HNE-Aktivität in U937- und HL-60-Lysaten mit PMN-Lysaten als Goldstandard verglichen (s. 3.2.3); als Negativkontrolle dienten Lysate der Mastzelllinie HMC-1, die keine HNE exprimiert (133). Der hieraus errechnete Elastase-Gehalt beträgt für PMN $1,1 \pm 0,6 \mu\text{g HNE pro } 10^6 \text{ Zellen}$, was im Bereich von Literaturangaben ($0,15 - 3,5 \mu\text{g}/10^6 \text{ PMN}$) liegt (27-29, 96, 134). U937-Zellen enthalten mit $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g HNE pro } 10^6 \text{ Zellen}$ um den Faktor ~ 20 weniger Elastase, was in der Größenordnung den Angaben von *Senior et al. (1982)* entspricht, die einen Faktor ~ 30 ermittelten (91). Die HNE-ähnliche Aktivität in HL-60-Lysaten liegt um den Faktor ~ 300 unter der Aktivität der PMN-Lysate, HMC-1-Lysate enthalten keine messbare HNE-ähnliche Aktivität. Um zu untersuchen, ob die Lysate Elastase-Hemmstoffe enthalten, wurde diesen isolierte HNE zugegeben (s. 4.2.4). Diese wurde in PMN- und U937-Lysaten vollständig wiedergefunden; in HL-60- und HMC 1-Lysaten jedoch lag die Wiederfindung nur bei 15 % bzw. 33 %, was für die Präsenz intrazellulärer Elastase-Hemmstoffe spricht (16, 97, 135). Damit erwies sich die HL-60-Zelllinie als ungeeignet für unsere weiteren Inhibitor-Experimente.

Die Messvarianz verschiedener Experimente in PMN-Lysaten lag initial mit 56% gegenüber den Zelllinien (24 % für U937, 30 % für HL-60) deutlich höher. Da PMN verschiedener Probanden isoliert wurden, ist dies vermutlich durch die interindividuelle Variabilität bedingt. Für die Aktivitätsmessung aus Lysaten der Zelllinien war eine deutlich geringere Varianz wünschenswert. Diese wurde für U937-Lysate durch Umstellung der Lysemethode von

Ultraschall auf 3-maliges Frieren und Tauen (s. 4.2.5), durch Optimierung des Lysepuffers (s. 4.2.6) und durch Lyse in der 96-U-Well-Mikrotiterplatte (s. 4.2.7) erreicht, wonach die Messvarianz innerhalb eines Experiments bei nur noch 6 % lag.

5.1.5 Validierung der Elastase-Aktivitätsmessung in Zelllysaten

Um zu validieren, dass die in PMN-, U937- und HL-60-Lysaten gemessene enzymatische Aktivität auf HNE zurückzuführen ist, wurde die Hemmung durch spezifische Serinprotease- und HNE-Inhibitoren sowie enzymatische Eigenschaften wie Kryostabilität und Stabilität nach Substratzugabe überprüft.

Tab.5.1: Charakterisierung der Elastase-ähnlichen Aktivität in Lysaten von PMN, U937- und HL-60-Zellen im Vergleich zu isolierter HNE.

	Isolierte HNE	PMN-Lysat	U937-Lysat	HL-60-Lysat
Hemmung durch Serinprotease-inhibitor	ja	ja	ja	ja
Hemmung durch HNE-spezifischen Inhibitor	ja	ja	ja	nein
Kryostabilität	ja	ja	ja	nein
Aktivität nach Substratzugabe	konstant	konstant	konstant	Anstieg um 250 %

Aus den Ergebnissen (Tab. 5.1) ist abzuleiten, dass es sich bei der enzymatischen Aktivität in HL-60-Lysaten zwar um eine Serinprotease, nicht aber um HNE handelt. Dies steht im Widerspruch zu Literaturangaben, wonach HL-60-Zellen HNE synthetisieren (122); andererseits sind verschiedene HL-60-Subtypen beschrieben, die nicht vollständig charakterisiert sind (136), sodass in dieser Arbeit möglicherweise ein Subtyp eingesetzt wurde, der keine oder nur wenig Elastase exprimiert. Dass die enzymatische Aktivität in HL-60-Lysaten über die Zeit nach Substratzugabe zunimmt, weist erneut auf die Gegenwart eines kompetitiven, reversiblen, intrazellulären Hemmstoffes hin, der über die Zeit durch das zugegebene Substrat verdrängt wird (s. 4.2.4). Derartige Hemmstoffe wurden sowohl in menschlichen als auch in tierischen Neutrophilen beschrieben und sollen die Zellen vor den aktiven Serinproteasen aus ihren Granula schützen (16, 97), stören aber die HNE-Detektion in unserem Modellsystem. Da sich in U937- wie auch in PMN-Lysaten HNE-Aktivität reproduzierbar quantifizieren lässt, wurden sie für die folgenden Experimente als Modellzellen ausgewählt.

In einem weiteren Ansatz wurde versucht, HNE immunologisch mittels Western Blot in den Zelllysaten nachzuweisen. Es wurden drei HNE-Primärantikörper (zwei mono- und ein polyklonaler) und 2 Sekundärantikörper in verschiedenen Verdünnungen auf verschiedenen Membranen (Nitrozellulose, PVDF) eingesetzt. Trotz umfangreicher Optimierungsversuche

ließen sich hierbei keine konsistenten Ergebnisse erzielen (Tab. 5.2). Da die Detektion von HNE mittels Western Blot für die Fragestellung nicht essenziell ist, wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt.

Tab.5.2: Versuch der HNE-Detektion durch 3 verschiedene Primärantikörper.

Antikörper	<i>ab68672</i>	<i>sc-55549</i>	<i>ab131260</i>
Klonalität	polyklonal	monoklonal	Monoklonal
Wirtsspezies	Kaninchen	Maus	Kaninchen
Unspezifische Banden	nein	ja	Nein
Detektion von HNE-Ladungskontrolle	ja	überlagert	Nein
Detektion von HNE in PMN-Lysaten	ja	überlagert	Nein
Detektion von HNE in U937-Lysaten	nein	überlagert	Ja

5.1.6 Optimierung der Zellaufbereitung für die Quantifizierung in 96-Well-Mikrotiterplatten

Während der Modelletablierung wurden Zellen nach dem „REAP-Protokoll“ (**R**apid, **E**fficient **A**nd **P**ractical) lysiert (95), das PBS mit 0,1 % Igepal als Lysepuffer mit anschließender Ultraschallbehandlung verwendet. Um die Methode auf 96-Well-Mikrotiterplatten umzustellen, musste eine Alternative zum Ultraschall gefunden werden. Eine gängige Methode zum Zellaufschluss ist das Frieren und Tauen (137), das gut auf die Mikrotiterplatte übertragbar ist, zumal wir zuvor gezeigt hatten, dass die HNE-Aktivität kryostabil ist (s. 4.2.3). Der Vergleich beider Methoden zeigte keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der HNE-Aktivität, sodass im Folgenden Zellen im 96-Well-Format durch drei Frieren-Tauen-Zyklen aufgeschlossen wurden.

Um die Wiederfindung von HNE im Lysat zu optimieren, wurden außerdem 32 Lysepuffer verglichen (s. 4.2.6). Da eine Hemmung der HNE-Aktivität durch DNA beschrieben ist (98), wurde einigen Puffern Benzonase hinzugefügt, um DNA und RNA abzubauen; Benzonase hat jedoch keinen wesentlichen Effekt. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass DNA-Fragmente und intakte DNA HNE gleichermaßen hemmen (138). Auch die Wahl des nicht-ionischen Detergens, das die Funktion hat, Zellmembranen zu zerstören (139), hat keinen signifikanten Einfluss auf die HNE-Aktivität. Die höchsten HNE-Aktivitäten bei geringer Varianz der Replikate (4,1 %) wurden mit einem Puffer aus PBS (pH = 7,4) mit 1 M NaCl und 0,1 % Tween 20 erzielt. Mit einem neutralen pH und hoher NaCl-Konzentration ist dieser Puffer sowohl für die Lyse geeignet, aber auch mit der anschließenden Aktivitätsmessung kompatibel. Um innerhalb der Methode nur ein Detergens einzusetzen, wurde auch im Messpuffer ELP 1 Tween 20 anstelle von Triton X-100 verwendet.

Neben der Zellaufschluss-Methode und dem Lysepuffer wurde auch der Einfluss der Mikrotiterplatte untersucht. Bisher waren V-Well-Platten in unserer Arbeitsgruppe zur Lyse von

HMC-1-Zellen verwendet worden (140). Nach Lyse von U937-Zellen in 96-V-Well-Platten zeigte sich jedoch eine große Varianz von 20 % mit dem Faktor $\sim 3,4$ zwischen minimalem und maximalem HNE-Aktivitätswert (s. 4.2.7). Mögliche Erklärungen sind eine inhomogene Durchmischung und Lyse der U937-Zellen in dem spitz zulaufenden Konus der V-Wellen oder ein Zellverlust während der Waschschriffe. Nach Umstellung auf U-Well-Platten war die Varianz mit 6 % und einem Faktor $\sim 1,3$ zwischen minimalem und maximalem Aktivitätswert deutlich geringer. 96-U-Well-Mikrotiterplatten wurden deshalb für die folgenden Zellkulturexperimente verwendet. Bei den Inhibitorstudien wurde ab einer Hemmung von 12 %, entsprechend der doppelten Messvarianz, von einer signifikanten Hemmung ausgegangen.

Auch die Inhibitor-Studien mit isolierten PMN wurden in 96-U-Well-Platten durchgeführt. Die Varianz innerhalb einer Platte lag hier bei 8 % und damit in einer ähnlichen Größenordnung wie bei U937-Zellen. Da PMN etwa 20-mal mehr Elastase-Aktivität enthalten als U937-Zellen (s. 4.2.1), wurden entsprechend niedrigere Zellzahlen eingesetzt (50-100 Zellen/ μl). Bei normwertiger Granulozytenzahl (4000 – 7000 PMN/ μl Blut (4)) genügen damit 90 - 160 μl Vollblut, um die intrazelluläre Wirkung aller 8 verwendeten Inhibitoren in je 7 Konzentrationen zu untersuchen.

5.1.7 Pilotstudie zur Anwendung des Modellsystems auf verwandte Serinproteasen

Neben Elastase sind in den letzten Jahren auch Cathepsin G und Proteinase 3 zu Zielstrukturen der Inhibitorentwicklung geworden, da alle drei Proteasen Anteil an der Entstehung zahlreicher Krankheitsbilder haben (2). Um zu überprüfen, ob mit unserem Modell auch die Aktivität von Cat G und PR3 in U937- und HL-60-Lysaten bestimmt werden kann, wurden Cat G- und PR3-Substrate aus der Literatur eingesetzt (Suc-AAPF-AMC (99), Abz-Val-Ala-Asp-Nva-Arg-Asp-Arg-Gln-EDDnp (90)). Sowohl in U937- als auch HL-60-Lysaten ist Cat G- und PR3-ähnliche Aktivität nachweisbar. Für die reproduzierbare Detektion müssen allerdings 3- bis 5-mal mehr Zellen eingesetzt werden als für die HNE-Aktivitätsmessung, da die Assays deutlich weniger sensitiv sind. Anhand von Enzymstandards wurden überraschend hohe Enzymmengen in den Zelllinien ermittelt: Der errechnete PR3-Gehalt in U937- und HL-60-Zellen liegt bei $0,46 \pm 0,025$ bzw. $0,25 \pm 0,016 \mu\text{g}/10^6$ Zellen; Vergleichsdaten aus der Literatur gibt es hierzu bislang nicht. Der errechnete Cat G-Gehalt beträgt in U937- und HL-60-Zellen $3,8 \pm 0,4$ bzw. rund $2,6 - 5,7 \mu\text{g}/10^6$ Zellen. In der Literatur wurden deutlich geringere Mengen an Cat G in U937-Zellen beschrieben ($0,58 \mu\text{g}$ bis $0,99 \mu\text{g}$ (141, 142)). Es ist durchaus möglich, dass die verwendeten Substrate neben Cat G und PR3 unspezifisch auch andere Proteasen detektieren. Analog zu der HNE-Aktivitätsmessung muss eine Validation mittels Inhibitoren erfolgen (vgl. 4.2.2), um eine spezifische und stabile Aktivitätsmessung mit möglichst geringer Zellzahl in diesem Modellsystem zu ermöglichen.

5.2 Enzymkinetische Charakterisierung von Elastase-Inhibitoren

5.2.1 Hemmkinetiken der Inhibitoren mit isolierter Elastase und U937-Lysaten

Um die Affinität der verwendeten Inhibitoren zur HNE und damit die Funktionalität der zum Teil kommerziell erworbenen Substanzen zu validieren, wurden Hemmkinetiken mit isolierter HNE angefertigt (s. 3.2.9). Aus der Literatur sind IC_{50} - und K_i -Werte für alle verwendeten HNE-Inhibitoren bekannt, die jedoch von den Messbedingungen (Temperatur, Inkubationsdauer, verwendete Messpuffer) abhängig sind; so wurden für Eglin C K_i -Werte von 800 und 75 μM veröffentlicht (102, 103). Für jeden eingesetzten Inhibitor wurde die IC_{50} bzw. K_i unter identischen Messbedingungen ermittelt (1 h Inkubation, 37°C in ELP 1) und mit Literaturwerten verglichen (Abb. 5.1).

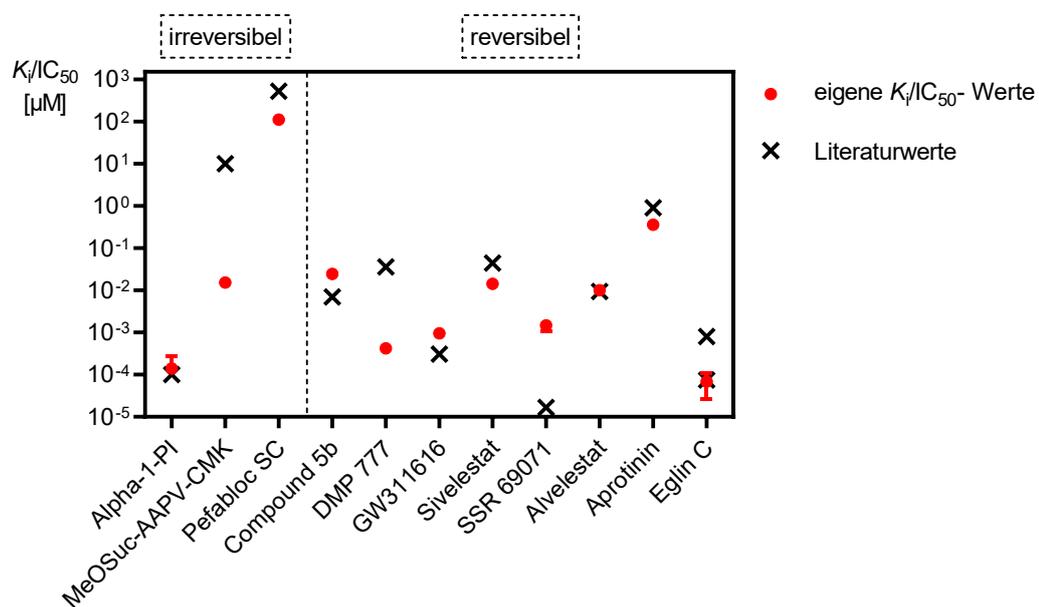


Abb. 5.1: Vergleich der Affinität der HNE-Inhibitoren (IC_{50} bzw. K_i ; Mittelwert \pm SD, $n \geq 3$) mit Literaturangaben (70, 86, 88, 89, 102, 103, 106, 143-146).

Die IC_{50} -Werte der irreversiblen Inhibitoren sind stark von der Inkubationsdauer und der Reaktionstemperatur abhängig (100), sodass Versuchsansätze, die sich in diesen Faktoren unterscheiden, nicht vergleichbar sind. So wurde für den irreversiblen Inhibitor MeOSuc-AAPV-CMK durch *Stein et al. (1986)* eine IC_{50} von 10 μM ermittelt, was um den Faktor ~ 650 höher als der in dieser Arbeit ermittelte Wert liegt. Dies ist vermutlich durch die kürzere Inkubationsdauer (10 - 20 min) und die langsamere Reaktionsgeschwindigkeit bei niedrigerer Temperatur (25°C) bedingt (145). Die K_i -Werte der reversiblen Inhibitoren wiederum sind nur im Gleichgewichtszustand der Enzym-Inhibitor-Reaktion vergleichbar (147, 148). Mit zwei Ausnahmen ergaben sich in unseren Experimenten vergleichbare Daten zu den Literaturwerten. DMP 777 hemmte in unseren Experimenten in geringeren Konzentrationen als durch *Macdonald et al.* beschrieben (144). Möglicherweise wurde bei kürzerer Inkubationsdauer von 40 min durch *Macdonald et al.* der Gleichgewichtszustand noch nicht erreicht oder ein verunreinigtes Produkt verwendet. Die K_i für SSR 69071 ist in der Literatur

gegenüber unseren Werten als niedriger beschrieben; diese wurde allerdings durch *Kapui et al. (2003)* rechnerisch und basierend auf einem andersartigen Versuchsaufbau ermittelt, weshalb hier nur bedingte Vergleichbarkeit gegeben ist. Insgesamt zeigten sich die verwendeten Substanzen hinsichtlich ihrer Funktionalität, Konzentration und Reinheit als adäquat für die Analyse der intrazellulären Hemmung.

5.2.2 Pre-Steady State Kinetiken zur Bestimmung von k_{on} und k_{off} -Werten

Neben der Affinität der Inhibitoren zu HNE wurden auch die Assoziationskonstanten (k_{on}) als Maß für die Reaktivität der Inhibitoren mit dem Enzym untersucht. Die jeweilige k_{on} wurde unter identischen Messbedingungen durch Pre-Steady State Kinetiken bestimmt (s. 3.2.9), da sie wie die K_i abhängig von Faktoren wie Temperatur und Reaktionsmilieu ist. Es ergaben sich für 10 von 12 getesteten Substanzen Werte zwischen $1,0 \times 10^0$ (Pefabloc SC) und $2,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Eglin C). Die k_{on} von Alvelestat und Aprotinin konnte in unserem Versuchsaufbau nicht bestimmt werden, da die Reaktion zwischen den Inhibitoren und HNE zu schnell erfolgt. Die ermittelten Assoziationskonstanten wurden mit Literaturdaten abgeglichen (Abb. 5.2). Für Aprotinin, Compound 5b, Sivelestat und Pefabloc SC liegen keine Vergleichsdaten vor, die restlichen Werte liegen in einer ähnlichen Größenordnung wie die in dieser Arbeit bestimmten.

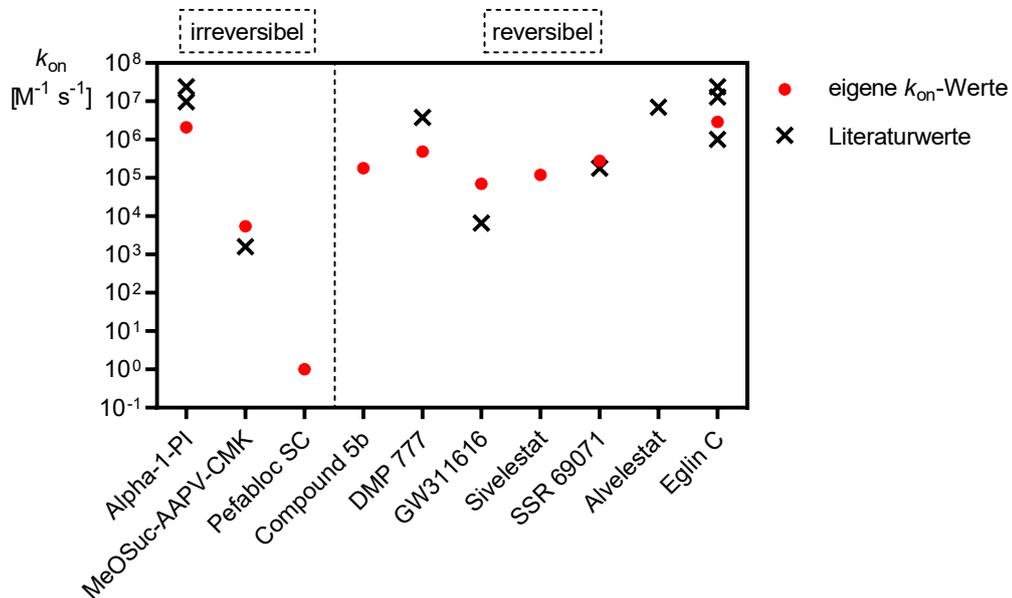


Abb. 5.2: Vergleich der eigens erhobenen k_{on} -Werte der verwendeten Inhibitoren (Mittelwerte, $n \geq 3$) mit Literaturdaten (73, 87, 88, 101-106).

Basierend auf der Assoziationskonstante k_{on} und der Gleichgewichtskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes K_i wurde für reversible Inhibitoren die Dissoziationskonstante k_{off} berechnet (s. 4.3.2); für irreversible Inhibitoren liegt diese nahe Null. Die k_{off} bestimmt die Stabilität des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Damit lässt sich beurteilen, ob die Bindung der Inhibitoren an das intrazelluläre Enzym in unserem Zellkulturmodell alle drei Waschschr

überdauert und schlussendlich die Hemmung der intrazellulären HNE bewertet werden kann. Für Alvelestat und Aprotinin ist aufgrund ihrer schnellen Dissoziation in unserem Modell die intrazelluläre Wirkung nicht beurteilbar. Für Compound 5b und Sivelestat ist eine partielle Verdünnung während der 3 Waschschrte zu je 10 min möglich (Dissoziationshalbzeit bei 37 °C ca. 3-6min). Die tatsächliche Dissoziationsrate sollte allerdings aufgrund der niedrigeren Temperatur von 4 °C während des Waschens deutlich geringer ausfallen und tatsächlich ließ sich eine intrazelluläre Wirkung für Compound 5b in U937-Zellen und für Sivelestat in PMN nachweisen (s. 4.4.1 und 4.5.1). Die Enzym-Inhibitor-Komplexe aller weiteren eingesetzten Inhibitoren sind stabil genug, um den Waschvorgang zu überdauern ($t_{1/2} \geq 100$ min).

5.3 Einfluss von Inhibitoren auf die Aktivität intrazellulärer Elastase

5.3.1 Vergleich der Hemmung isolierter HNE, HNE in Lysat und intrazellulärer HNE in U937

Damit die intrazelluläre Wirkung von Inhibitoren in unserem U937-Modell beurteilt werden kann, muss sichergestellt sein, dass die Enzym-Inhibitor-Reaktion nicht durch Lysatbestandteile wie GASPIDs, DNA und zytoplasmatische Serpine (2, 98) gestört wird. Um deren Einfluss auf die Hemmung von HNE zu untersuchen, wurden Hemmkinetiken mit isolierter HNE und mit HNE in U937-Lysaten verglichen (s. 4.3.1). Die Werte unterscheiden sich kaum voneinander, die größte Diskrepanz ergibt sich für Eglin C, welches HNE im Lysat um den Faktor ~ 7 schlechter hemmt als das isolierte Enzym. Somit ist die Voraussetzung gegeben, um die Hemmung von HNE in U937-Zellen innerhalb unseres Modellsystems zu quantifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 13 Inhibitoren hinsichtlich ihrer Wirkung auf HNE in U937-Zellen untersucht. Hierunter waren 2 Negativkontrollen (Cathepsin G Inhibitor, Benzamidin), und 3 makromolekulare Inhibitoren (Alpha-1-PI, Eglin C, Aprotinin), die wie erwartet keine Hemmung der HNE in U937-Zellen zeigten, da aufgrund ihres hohen Molekulargewichts ein passiver Transport über die Zellmembran unwahrscheinlich ist (149). Der synthetische Inhibitor Alvelestat ist aufgrund seiner kurzen Dissoziationshalbzeit von 12 s (s. 4.3.2) in unserem Modell nicht hinsichtlich seiner intrazellulären Wirkung beurteilbar, da der Enzym-Inhibitor-Komplex während des Waschvorganges zerfällt; er zeigte in unserem Modell erwartungsgemäß keinen Effekt. Überraschenderweise wurde auch für Sivelestat in den eingesetzten Konzentrationen bis 300 μM keine intrazelluläre Wirkung nachgewiesen. *Nakatani et al. (2001)* beschrieben hingegen eine intrazelluläre Elastase-Hemmung in PMN durch Sivelestat in vergleichbaren Konzentrationen (240 μM) (150). In dieser Studie wurden die Neutrophilen allerdings mit TNF- α vorbehandelt, was die Freisetzung intrazellulärer HNE fördert (10, 151). Daher ist gut denkbar, dass in der Arbeit von *Nakatani et al.* primär membrangebundene HNE gemessen wurde; dafür spricht auch, dass das zur intrazellulären

Messung verwendete Substrat, AAPV-Rhodamin 110, mit einem Molekulargewicht von ca. 800 Da recht groß ist, um die Zellmembran passiv überwinden zu können. 1997 beschrieben *Jeannot et al.*, dass Rhodamin 110 sich erst nach 14-stündiger Inkubation stabil intrazellulär anreichert (152), in der Studie mit Sivelestat betrug die Inkubationszeit mit dem Rhodamin-Substrat lediglich 10 min. Hinzu kommt, dass andere Quellen nur eine extrazelluläre Wirkung von Sivelestat angeben (153).

Die übrigen 6 niedermolekularen, synthetischen Inhibitoren hemmen HNE in U937-Zellen zeit- und konzentrationsabhängig. Pefabloc SC zeigt gleich nach Zugabe zu den U937-Zellen eine vergleichbare Hemmung der intrazellulären HNE mit isolierter Elastase (IC_{50} ca. 130 μ M). MeOSuc-AAPV-CMK, DMP 777, GW311616, SSR 69071 und Compound 5b hemmen hingegen intrazellulär um den Faktor $10^2 - 10^4$ schwächer gegenüber dem isolierten Enzym. Gründe hierfür sind am ehesten die Membranbarriere, der niedrige pH von 6,0 in den azurophilen Granula (25) und die kontinuierliche HNE-Synthese in U937-Zellen. Auch die Dynamik der intrazellulären Hemmung unterscheidet sich. MeOSuc-AAPV-CMK hemmt intrazellulär erst nach 26 h. Die Hemmung durch DMP 777 und GW311616 erfolgt zwar direkt nach Zugabe, nimmt aber ebenfalls über die Dauer der Inkubation stetig zu. Diese 3 Inhibitoren scheinen über 26 Stunden hinweg stabil zu bleiben und die Zellmembran langsam zu überwinden, sie erreichen dabei jedoch die IC_{50} bzw. K_i mit isoliertem Enzym nicht. Die intrazelluläre Hemmung durch Pefabloc SC nimmt zwar in den ersten 6 h zu, danach aber wieder ab. Die intrazelluläre Hemmung durch SSR 69071 nimmt über 26 h kontinuierlich ab und Compound 5b hemmt bereits nach 3h nicht mehr intrazellulär. Eine Erklärung für die Abnahme der intrazellulären Hemmung kann die limitierte Stabilität der Substanzen, wie dies auch für Pefabloc SC und Compound 5b gezeigt wurde (s. 4.4.2), zusammen mit der kontinuierlichen HNE-Synthese in U937-Zellen sein. Inhibitortoxizität und veränderte Zellproliferation spielen keine relevante Rolle (s. 4.4.3 f.). Es ergaben sich bei 26-stündiger Inkubationsdauer keine systematischen Unterschiede in der intrazellulären Wirkung reversibler und irreversibler Inhibitoren.

5.3.2 Vergleich der Hemmung intrazellulärer Elastase in PMN und U937-Zellen

Um das U937-Zellkulturmodell gegenüber dem Goldstandard, PMN, zu validieren, wurde die Wirkung von 8 Inhibitoren auf intrazelluläre HNE in U937-Zellen und in isolierten PMN verglichen (s. 4.5.1). Bis auf eine Ausnahme, Eglin C, ergaben sich vergleichbare Ergebnisse für die intrazelluläre Wirkung in U937-Zellen und Neutrophilen (Abb. 5.3). Kleinere Unterschiede in dem zeitlichen Verlauf und dem Ausmaß der intrazellulären Hemmung können z.T. durch methodische Unterschiede bedingt sein. So wurden PMN eines Isolationsprozesses unterzogen, der die Membranpermeabilität verändern könnte, das Zellkulturmedium von U937-Zellen enthielt Serum, das von PMN nicht, U937-Zellen wurden über 0 - 26 h mit

Inhibitoren inkubiert, PMN hingegen über 1 h (jeweils zuzüglich der Erntezeit von ca. 15 min bis zum ersten Waschen). Zudem synthetisieren U937-Zellen im Gegensatz zu PMN kontinuierlich HNE (132), sodass ein höherer Bedarf an Inhibitor besteht, was die teilweise stärkere intrazelluläre Hemmung in PMN erklären könnte. Um bei zukünftigen Experimenten eine bessere Vergleichbarkeit der intrazellulären Wirkung in U937-Zellen und PMN zu erreichen, sollte der Inkubationszeitraum vereinheitlicht werden und nach Möglichkeit die Inkubations-Medien aneinander angeglichen werden; Faktoren wie der Isoliervorgang und die HNE-Synthese in U937-Zellen sind weniger leicht beeinflussbar.

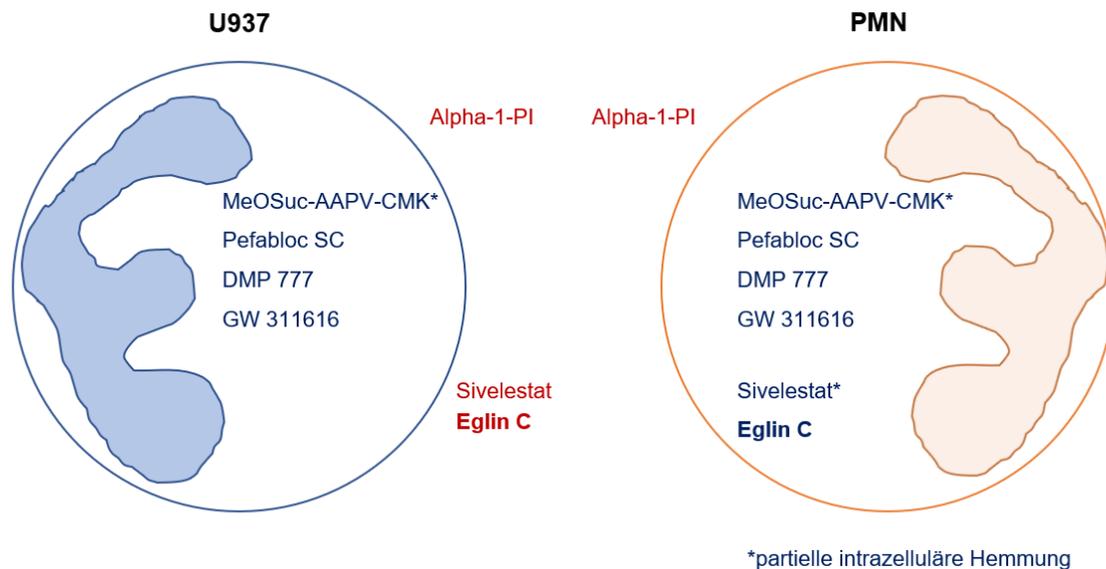


Abb. 5.3: Wirkorte der verwendeten Inhibitoren in U937-Zellen und PMN. Extrazellulär wirksame Inhibitoren sind in Rot dargestellt, intrazellulär wirksame Inhibitoren in Blau, Inhibitoren, die lediglich eine partielle intrazelluläre Hemmung bewirken sind mit einem * markiert. Alvelestat (in unserem Modell nicht beurteilbar), sowie SSR 69071, Compound 5b und Alvelestat (nur auf U937-Zellen eingesetzt) sind nicht dargestellt.

DMP 777 und GW311616 hemmen HNE in U937-Zellen direkt nach Zugabe etwas besser als in PMN. MeOSuc-AAPV-CMK hingegen verursacht in Neutrophilen bereits nach 1 h eine geringgradige intrazelluläre Hemmung von ca. 23%, was in U937-Zellen erst nach 26 h erreicht wird. Auch Alvelestat und Sivelestat zeigen unter Berücksichtigung methodischer Artefakte (s. 5.4) eine geringgradige aber signifikante intrazelluläre Hemmung in PMN, nicht aber in U937-Zellen. Die intrazelluläre Wirkung von Alvelestat ist aufgrund der kurzen Dissoziationshalbwert von 12 s nicht zuverlässig quantifizierbar. Die Tatsache, dass überhaupt eine intrazelluläre Wirkung in PMN nachweisbar war, könnte auf eine intrazelluläre Kompartimentierung der Substanz mit Freisetzung nach der Lyse zurückzuführen sein. Um mit Sivelestat eine signifikante partielle Hemmung in PMN zu erreichen, wird 100.000-mal mehr Inhibitor benötigt, als für die Hemmung des isolierten Enzyms, sodass schwerlich von einer klinisch relevanten intrazellulären Wirkung auszugehen ist. Sivelestat wird in der Behandlung des akuten Lungenversagens in Dosen von 0,16 - 0,2 mg/kg Körpergewicht/h intravenös verabreicht (154), was bei einem 70 kg schweren Menschen mit 5 l Blutvolumen einer Konzentration von 5 bis 6 μM entspricht, sofern sich der Inhibitor ausschließlich im

Blutvolumen verteilt und nicht ins Gewebe übertritt. In unserem Modell sind für eine signifikante intrazelluläre Hemmung in PMN wenigstens 300 μM erforderlich. Der einzige Unterschied in der intrazellulären Hemmung für den eine klinische Relevanz zu erwarten ist, ergibt sich für den natürlichen Inhibitor Eglin C. Dieser hemmt trotz eines großen Molekulargewichtes intrazelluläre HNE in PMN hochgradig signifikant im nanomolaren Bereich, wohingegen in U937-Zellen keinerlei intrazelluläre Wirkung nachweisbar ist. Dieser Unterschied ist durch die oben genannten Gründe nicht erklärbar und bedarf näherer Untersuchung (vgl. 5.3.3).

5.3.3 Unterschiede in der Wirkung von Eglin C auf PMN und U937

Eglin C ist ein natürlich vorkommender Hemmstoff, der aus dem Blutegel (*Hirudo medicinalis*) isoliert wurde (155). Der Inhibitor hatte sich im Tiermodell u.a. in der Therapie des Lungenemphysems beim Hamster (68) und der Sepsis bei Schweinen (156) als äußerst effektiv erwiesen. Die allergische Reaktion einiger Probanden auf das körperfremde Protein verhinderte die weitere Erprobung in klinischen Studien (34). In unserem Modell haben wir rekombinant hergestelltes Eglin C, ein Polypeptid aus 70 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ~ 8 kDa verwendet, dessen Aminosäuresequenz dem natürlichen Protein entspricht (157). Allein die Größe des Proteins macht eine intrazelluläre Hemmung mittels Diffusion unwahrscheinlich (149). In unseren Modellzellen (U937) konnte wie erwartet keine Hemmung intrazellulärer Elastase durch Eglin C beobachtet werden, in isolierten PMN hingegen schon. 1986 wurde durch *Braun et al.* die Bindung von Eglin C an die Plasmamembran von PMN beschrieben (102). Demnach hat jeder Neutrophile ca. 100.000 Bindungsstellen für Eglin C, die Bindung ist bei 5 °C reversibel und weist eine Gleichgewichts-Dissoziationskonstante von 0,2 μM auf. Selbst wenn in unserem Experiment die Bindung von Eglin C an die Zellmembran während aller drei Waschschriffe mit 4 °C kaltem PBS bestehen bleiben würde, erklärt dies allenfalls einen geringen Teil der beobachteten Hemmung: Ein neutrophiler Granulozyt enthält ca. 10^{-12} g HNE, was in etwa 2×10^7 Molekülen HNE entspricht; 10^5 Moleküle Eglin C, d.h. die an die Zellmembran bindende Menge könnten damit maximal 0,5 % Hemmung bewirken. Die Elastase wurde jedoch vollständig gehemmt, was nur durch eine deutlich umfangreichere Membranbindung oder aber durch eine Internalisierung des Inhibitors zu erklären ist. Ein solcher Transportmechanismus für Eglin C wurde bislang nicht beschrieben. Darüber hinaus ist unklar, ob es sich bei der 1986 durch *Braun et al.* beschriebenen Membranbindung an PMN um eine Bindung an membrangebundene Elastase handelt. Im selben Jahr wurde erstmals ein Elastase-Rezeptor auf PMN nachgewiesen (158), erst 9 Jahre später wurde durch *Owen et al.* beschrieben, dass HNE und Cat G auf der Membran von PMN exprimiert werden (9). Ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen wäre, ob Eglin C an diese membrangebundene HNE bindet und im Anschluss internalisiert werden kann.

5.4 Limitationen bei der Beurteilung der intrazellulären Wirkung der Inhibitoren in unserem Modell

In dieser Arbeit wurde ein *in vitro* Modell entwickelt, um die Hemmung „intrazellulärer HNE“ in den Granula von U937-Zellen und PMN zu beurteilen. Hierzu wurden die vitalen Zellen mit Hemmstoffen inkubiert und das Ausmaß der Hemmung im Anschluss an die Zellyse im Zellysat „*ex vivo*“ quantifiziert. Deshalb müssen verschiedene Störquellen in Betracht gezogen werden.

Das Zellysat enthält sämtliche Zellbestandteile, sodass neben der Elastase aus den intrazellulären Granula auch die membrangebundene HNE bzw. deren Hemmung miterfasst wird. Der Anteil membrangebundener HNE ist jedoch im Vergleich zur HNE in Granula verschwindend gering, insbesondere ohne vorherige Aktivierung der PMN (9).

Prinzipiell ist denkbar, dass die Inhibitoren in unserem Zellkultursystem zwar die Plasmamembran, nicht aber die Membran der Granula überwinden. Sie könnten im Zytoplasma verweilen und die Elastase erst im Anschluss an die Zellyse hemmen. Dagegen spricht die zunehmende Hemmung in U937-Zellen über die Zeit. Zudem sind die Granulamembranen analog zur Plasmamembran aufgebaut und werden bei Degranulation in diese integriert (6).

Eine relevante Verfälschung der Ergebnisse kann auftreten, wenn extrazellulärer Inhibitor durch die 3 Waschschrte vor der Zellyse nicht adäquat entfernt wird und das Lysat kontaminiert. In unserem Modellsystem verbleiben bei den Versuchen mit 96-Well-Platten bei jedem Waschschrte 5-7 μl Waschpuffer in der Well. Wenn zur Sicherheit von der doppelten Menge ausgegangen wird (14 μl), ergibt sich bei 3 Waschschrten (200 – 250 μl) ein Verdünnungsfaktor von 10^5 . Unter Berücksichtigung dieses absichtlich niedrig geschätzten Verdünnungsfaktors erscheint es möglich, dass einer der 13 untersuchten Inhibitoren durch die 3 Waschschrte nicht ausreichend verdünnt wurde. Von 300 μM Sivelestat könnten 3 nM ins Lysat verschleppt worden sein, was zu einer ca. 10-prozentigen Hemmung führen würde. Dies ändert jedoch nichts an der primären Tatsache, dass Sivelestat HNE in PMN besser als in U937-Zellen hemmt, jedoch nur wenn extrem hohe Konzentrationen eingesetzt werden. Für die Analyse von Sivelestat in Konzentrationen $\geq 300 \mu\text{M}$ sollte bei Folgeexperimenten ein weiterer Waschschrte ergänzt werden.

Auch eine toxische Wirkung der Inhibitoren auf U937-Zellen bzw. PMN könnte eine intrazelluläre Hemmung in unserem Modell vortäuschen. Um dies auszuschließen, wurde im Anschluss an die Inkubation die LDH-Menge im Zellkulturüberstand als Marker für Zelluntergang photometrisch bestimmt. Lediglich die höchsten Konzentrationen von Pefabloc SC und SSR 69071 bewirken eine Toxizität von 11 – 12 %; da jedoch auch niedrigere, nicht-toxische Konzentrationen eine nahezu identische hemmende Wirkung haben, spielt diese Toxizität für die Beurteilung der intrazellulären Wirkung keine relevante Rolle. Um

eine toxische Wirkung auf PMN vollständig auszuschließen, müssen noch weitere Experimente, z.B. mit Vitalfärbung mittels Lebendfarbstoffen wie Trypanblau erfolgen (159), da sich die LDH-Bestimmung als nicht ausreichend sensitiv erwiesen hat.

Da U937-Zellen proliferieren, könnte auch eine verminderte Proliferation unter Inhibitoreinwirkung eine intrazelluläre Hemmung simulieren. Daher wurde die Zelldichte von U937-Zellen nach einer Inkubation über 24 - 72 h mit den intrazellulär wirksamen Inhibitoren mit der Proliferation unbehandelter Zellen verglichen (s. 4.4.4). Pefabloc SC beeinflusst in Konzentrationen $\geq 300 \mu\text{M}$ die Proliferation, was jedoch die intrazelluläre Hemmung nicht vollständig erklärt. In zukünftigen Experimenten wäre es sinnvoll, die Proliferation und Toxizität parallel zu den Inhibitionsexperimenten in der Mikrotiterplatte zu untersuchen.

Die Grenzen des „*ex vivo*“-Zellkulturmodells liegen bei der Beurteilung reversibler Inhibitoren mit schnellen Dissoziationsraten wie z.B. Alvelestat ($k_{\text{off}} = 0,057\text{s}^{-1}$) (106), bei denen der Enzym-Inhibitor-Komplex während des Waschvorgangs zerfällt. Eine exaktere Methode zur Beurteilung der intrazellulären Hemmung wäre die HNE-Aktivitätsmessung *in situ* in den Granula, was jedoch problembehaftet ist. Kasperkiewicz et al. beschrieben eine Methode um mittels sogenannter „activity-based probes“ GASPIDs in lebenden Neutrophilen darzustellen (160, 161). Diese Substanzen entsprechen irreversiblen Inhibitoren, die an das aktive Zentrum der Proteasen binden. Daher können sie in unserem Modell-System nicht für reversible Inhibitoren angewandt werden, da damit deren Hemmung der intrazellulären Elastase unterschätzt würde. Eine geeignete Alternative wäre der Einsatz zellpermeabler Elastase-Substrate. AAPV-Rhodamin (CellProbe Reagent, Beckman Coulter) wurde vor ca. 20 Jahren mehrfach als Substrat zur intrazellulären HNE-Aktivitäts-Messung mittels Durchflusszytometrie eingesetzt (150, 162, 163). Da AAPV-Rhodamin aktuell nicht mehr von Beckman Coulter vertrieben wird, wurde in unserer Arbeitsgruppe in einem Pilotprojekt mit einem ähnlichen Elastase Substrat, Z-(AAAA)₂-Rhodamin 110 (164), intrazelluläre Elastase-ähnliche Aktivität gemessen (Daten nicht gezeigt). Hierbei ergaben sich deutlich geringere enzymatische Aktivitäten als im Zelllysat. Denkbar wäre, dass überwiegend membrangebundene HNE erfasst wird. Hierfür spricht auch das hohe Molekulargewicht von Z-(AAAA)₂-Rhodamin 110 (ca. 1200 Da). Sollte das Substrat tatsächlich die Zellmembran überwinden und intrazelluläre HNE-Aktivität erfassen, fehlen dennoch Daten zur Spezifität der Spaltung, da in den Granula neben HNE zahlreiche weitere aktive Proteasen vorliegen. Die *in situ*-Aktivitätsmessung in den Granula ist ein wichtiges langfristiges Ziel; aktuell bietet unser Zellkulturmodell jedoch eine gute Alternative, um in einem kurzen Zeitraum spezifisch die Wirkung von Inhibitoren auf intrazelluläre HNE in U937-Zellen und PMN zu untersuchen.

5.5 Bedeutung der Wirkorte der Inhibitoren für das Inhibitor-Design

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass nicht allein das Molekulargewicht und die Affinität eines Inhibitors zur Elastase über dessen intrazelluläre Wirkung entscheiden, hinzu kommen als wesentliche Faktoren die Inhibitorstabilität und die Fähigkeit, Membranen aktiv oder passiv zu überwinden. Basierend auf theoretischen Überlegungen spielt es eine entscheidende Rolle für die klinische Wirkung von HNE-Inhibitoren, ob die Substanzen nur extra- oder auch intrazellulär wirksam sind (Abb. 5.4). Extrazellulär wirksame Hemmstoffe müssen konstant hohe Wirkspiegel am Entzündungsort erreichen und damit eine hohe Stabilität aufweisen. Nur so kann bei der Aktivierung von PMN und konsekutiver Freisetzung von HNE eine sofortige Hemmung der enzymatischen Aktivität erfolgen. Für die Effektivität dieser Inhibitoren ist neben der HNE-Affinität insbesondere ihre Assoziationskonstante von großer Bedeutung, die darüber entscheidet, wie lange die Elastase nach ihrer Freisetzung Zeit hat, Gewebe zu schädigen. *Liou et al. (1995)* zeigten, dass im Rahmen des oxidativen Bursts so große Mengen an HNE aus PMN freigesetzt werden, dass diese erst nach 12,4 ms und einer räumlichen Ausbreitung von 1,33 μm durch physiologische Konzentrationen von Alpha-1-PI neutralisiert werden, obwohl Alpha-1-PI eine außerordentlich hohe Assoziationskonstante von $9,7 - 24 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (101, 102) aufweist. Bei einem Alpha-1-PI Mangel liegt der Destruktionsradius 2,5- bis 6,2-mal höher, was langfristig zur Gewebeschädigung führt (28). Neu entwickelte Inhibitoren sollten wenigstens eine ähnlich hohe Affinität zu HNE und ähnliche Assoziationsraten aufweisen.

Intrazellulär wirksame Inhibitoren haben den Vorteil, dass Elastase bereits vor ihrer Freisetzung gehemmt wird und deshalb bei der Freisetzung durch Degranulation keinen Gewebeschaden verursacht. Irreversible Inhibitoren müssen vermutlich keinen dauerhaften Wirkspiegel erreichen, da HNE in reifen PMN nicht nachsynthetisiert wird. Eine Verabreichung im Intervall sollte ausreichen, um Elastase in neu gebildeten Granulozyten zu hemmen. Auch HNE an der Zellmembran und in NETs wird erreicht, da diese aus dem Intrazellulärraum freigesetzt wird. Ein Nachteil ist, dass auch intrazelluläre HNE-Funktionen wie die antimikrobielle Wirkung eingeschränkt werden (31). Von Patienten, die am Papillon Lefèvre Syndrom leiden und kaum messbare Mengen an aktiver HNE aufweisen, ist bekannt, dass sie nur selten an schweren systemischen Infektionen erkranken (165); daher scheint die intrazelluläre Hemmung eine therapeutische Option zu sein, deren Risiken aber gut abgewogen werden müssen.

In diesem Zusammenhang wurden in dieser Arbeit für zwei Inhibitoren interessante Beobachtungen gemacht. Es zeigt sich, dass Eglin C als natürlicher Elastase-Inhibitor aus dem Blutegel HNE intrazellulär hemmt. Dies wirft die Frage auf, ob eine intrazelluläre Hemmung der HNE evolutionär sinnvoll sein kann, um eine Entzündungsreaktion - wie durch das Saugen des Blutegels induziert - zu verhindern. Andererseits weist gerade Sivelestat, als einer von zwei synthetischen Inhibitoren in der klinischen Anwendung, keine relevante

intrazelluläre Wirkung auf. Die fehlende intrazelluläre Hemmung wäre eine mögliche Erklärung für die gute Verträglichkeit, welche die Zulassung zur Behandlung in Japan und Südkorea ermöglichte (25, 42). Andererseits könnte derselbe Umstand auch zu der geringen therapeutischen Wirkung führen, die bislang einen breiten weltweiten Einsatz der Substanz verhinderte. In Hinblick auf die Wirksamkeit der extrazellulären Elastase-Hemmung könnten auch die Ergebnisse der Studien zum Einsatz von Sivelestat in der COVID-19-Pandemie Aufschluss geben (55).

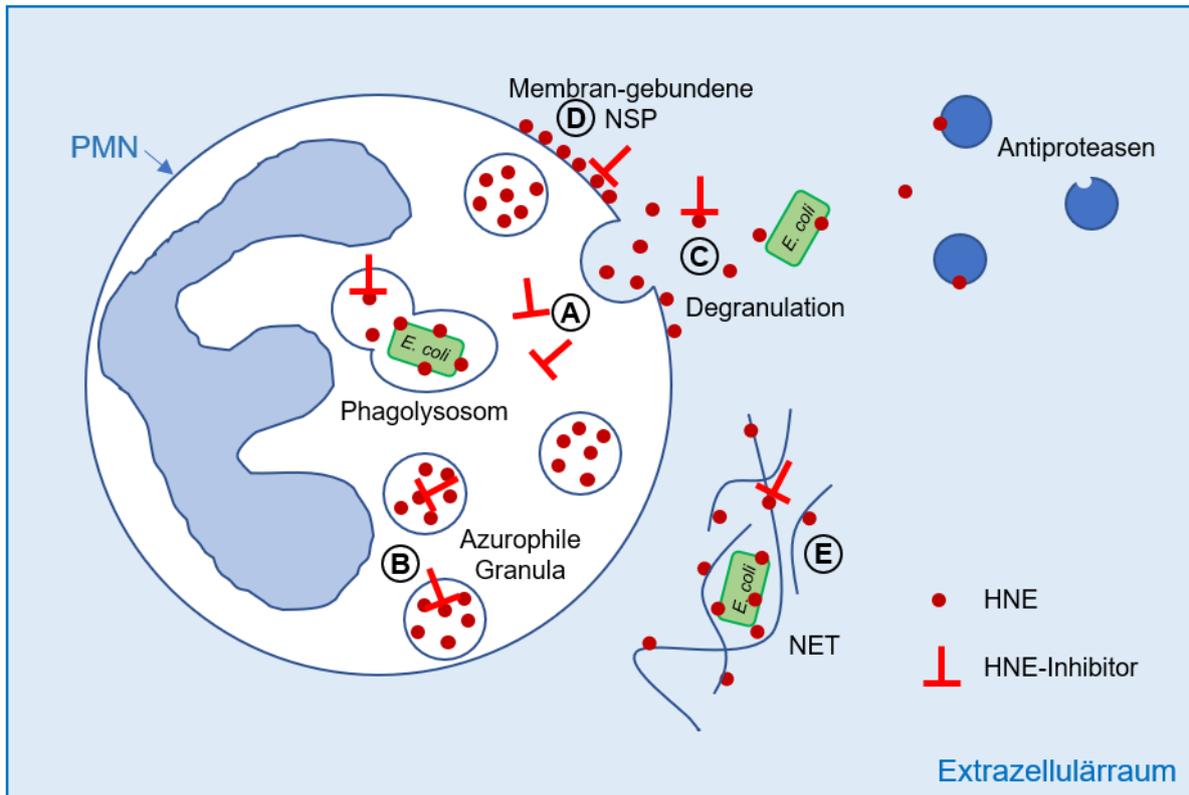


Abb. 5.4: Schematische Darstellung der extra- und intrazellulären Angriffspunkte von HNE-Inhibitoren in PMN. A) zytoplasmatisch, B) azurophile Granula, C) frei im Extrazellulärraum, D) membrangebundene HNE, E) NETs.

6 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellkulturmodell entwickelt, das es ermöglicht schnell und kostengünstig die Wirkung von Inhibitoren auf intrazelluläre HNE in U937-Zellen und PMN zu untersuchen. Gegenüber reinen enzymkinetischen Messungen mit isolierter HNE und HNE im Lysat bietet unser Modell den Vorteil einer deutlich besseren Abbildung biologischer Prozesse; so werden auch entscheidende Faktoren wie die Auswirkung der Membranbarriere, die Inhibitorstabilität, die Zytotoxizität und der Einfluss der Substanzen auf die Zellproliferation berücksichtigt. Für 2 der 13 eingesetzten Inhibitoren ergaben sich überraschende Ergebnisse. Der natürliche Inhibitor Eglin C hemmt trotz seines hohen Molekulargewichts intrazelluläre HNE in Neutrophilen Granulozyten. Dieses Phänomen spricht für eine Internalisierung des Inhibitors, was bislang nicht beschrieben worden ist. Ein solcher Transportmechanismus könnte ggf. therapeutisch eingesetzt werden, insbesondere da Eglin C trotz seiner intrazellulären Wirkung, die Fähigkeit von PMN *Staphylococcus aureus* abzutöten, laut Literatur nicht mindert (166). Dem gegenüber steht Sivelestat, als einer von nur zwei klinisch eingesetzten synthetischen HNE-Inhibitoren. Dieser ist trotz eines geringen Molekulargewichts in den verabreichten Mengen „nur“ extrazellulär wirksam und steht aktuell als potenzielles Therapeutikum zur Behandlung von COVID-19 im Fokus (55, 77). Entscheidend ist es herauszufinden, ob eine extrazelluläre Hemmung ausreichend ist, um die Entzündungsreaktion herunterzuregulieren und andersherum, ob eine intrazelluläre Hemmung möglich ist, ohne die Immunfunktion der Neutrophilen zu stark einzuschränken. Gerade in der Beantwortung dieser Frage kann unser Modellsystem in Zukunft hilfreich sein, indem die physiologische Abwehrfunktion von Neutrophilen (z. B. Elimination von Bakterien) in Abhängigkeit von der Elastase-Restaktivität bestimmt wird. Zudem kann die Wirkung der Hemmstoffe auf isolierte PMN von erkrankten Probanden, z.B. COPD-Patienten, mit gesunden Kontrollen verglichen werden.

Neben der HNE-Aktivität wurde in einer Pilotstudie Cat G- und PR3-ähnliche Aktivität in Zelllysaten quantifiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass das vorliegende Modell prinzipiell auch für die Untersuchung der Hemmung anderer Granula-assoziiierter Serinproteasen geeignet ist. So könnte aus einem einzigen Versuchsansatz die Wirkung von Hemmstoffen auf mehrere pathophysiologisch relevante Proteasen untersucht werden. In der Vorläuferzelllinie U937, kann zusätzlich die Wirkung von Cathepsin C-Inhibitoren ermittelt werden, welches für die Aktivierung von HNE, Cat G und PR3 erforderlich ist (167) (s. a. Abb. 6.1).

Langfristig ist eine Aktivitätsmessung *in situ* in den zytoplasmatischen Granula erstrebenswert. Die Entwicklung neuer, alternativer Methoden zur Darstellung intrazellulärer Proteaseaktivität mittels membrangängiger Elastase-Substrate ist ein aktuelles Forschungsfeld (168), dessen Ergebnisse den Einsatz des entwickelten Zellkulturmodells in der Inhibitorentwicklung deutlich erweitern könnten.

Anwendungsmöglichkeiten unseres Modells zur Quantifizierung intrazellulärer HNE-Aktivität

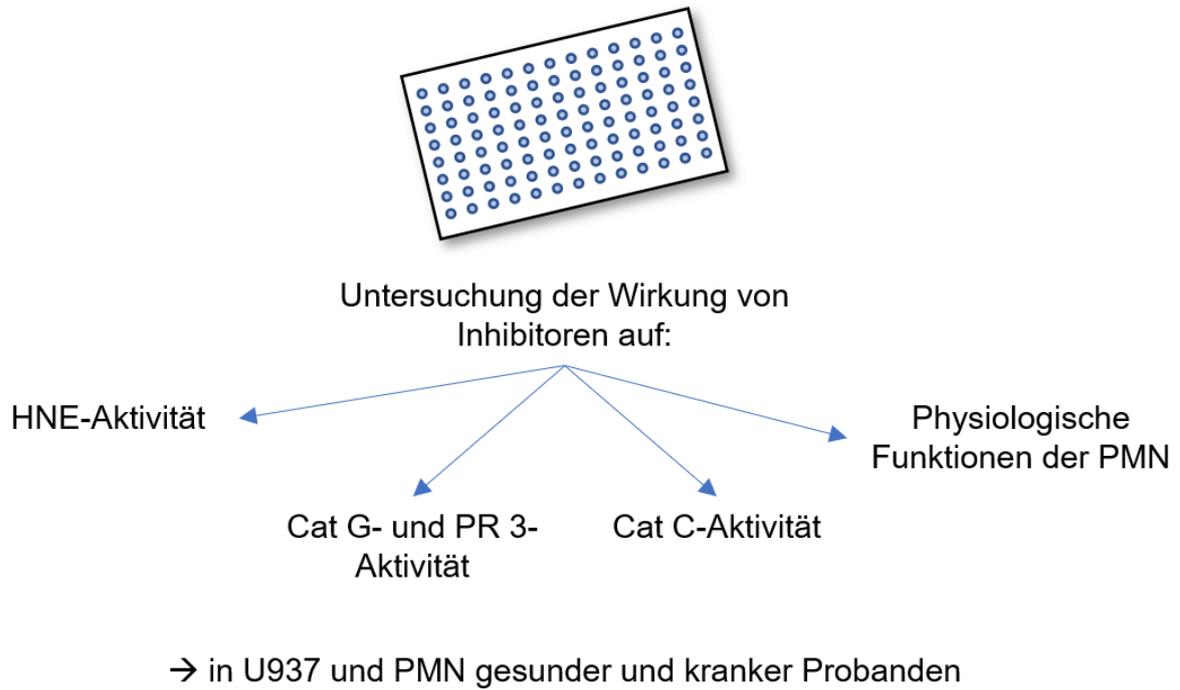


Abb. 6.1: Überblick über die Anwendungsmöglichkeiten des Modells zur Quantifizierung intrazellulärer HNE-Aktivität, das im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde.

7 Addendum

7.1 Nachweis von Elastase in Lysaten mittels Western Blot

Nach Fertigstellung der Dissertation gelang es nach weiterer Optimierung mithilfe eines vierten HNE-Primärantikörpers (MAB9167; R&D Systems, Minneapolis, USA) rekombinante HNE, sowie HNE in PMN- und U937-Lysaten mittels Western Blot nachzuweisen (s. Abb. 7.1). Hierzu wurden Lysate aus 100.000 PMN, sowie jeweils 500.000 Zellen U937, HL-60 und HMC-1 pro Spur aufgetragen; als Kontrollen fungierten 10 und 50 ng rekombinant hergestellte HNE. Es erfolgte analog zu den anderen im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Western Blots ein Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (s. 3.2.10). Die Membran wurde für zwei Stunden in 5 % BSA in TBS mit 0,05% Tween (TBS-T) bei Raumtemperatur blockiert und im Anschluss mit dem HNE-Primärantikörper MAB91671 (1: 5000) (R&D Systems, Minneapolis, USA) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Hierauf folgten fünf Waschschriffe in PBS-T. Die Membran wurde über 1 h mit dem Sekundärantikörper 115-035-062 (HRP; 1: 20000) (Jackson ImmunoResearch Europe, Ely, UK) in TBS-T mit 0,5 % Milch bei Raumtemperatur behandelt und erneut in PBS-T und PBS gewaschen. Die anschließende Detektion erfolgte mittels SuperSignal West Dura Substrate (Thermo Scientific, Darmstadt, Germany).

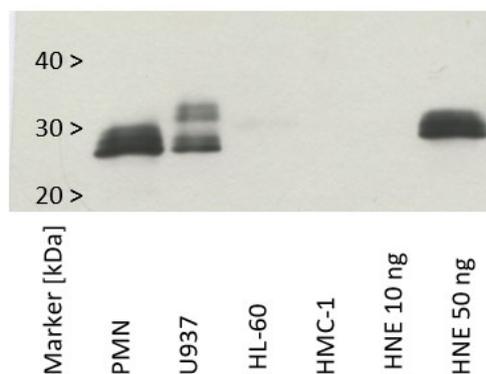


Abb. 7.1: Detektion von HNE mittels Western Blot in Lysaten aus PMN (100.000 Zellen/Spur), U937, HL-60 und HMC-1 (jeweils 500.000 Zellen/Spur). 10 und 50 ng rekombinante HNE dienten als Positivkontrolle. Es wurde der HNE-Antikörper MAB9167 (1: 5000) und der Sekundärantikörper 115-035-062 (1: 20.000) eingesetzt.

Der Western Blot bestätigt damit das auf enzymkinetischen Messungen beruhende Ergebnis dieser Arbeit, dass HNE in PMN und U937-Zellen vorliegt, nicht aber in HL-60 und HMC-1 Zellen (s. 4.2.1 ff).

8 Literaturverzeichnis

1. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 2010;31(8):318-24.
2. Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol Rev.* 2010;62(4):726-59.
3. Thomas B, Heinz D, Roland F, Kai G, Thomas N. Pappenheim-Färbung: Beschreibung einer hämatologischen Standardfärbung – Geschichte, Chemie, Durchführung, Artefakte und Problemlösungen/Pappenheim Stain: Description of a hematological standard stain – history, chemistry, procedure, artifacts and problem solutions. *Journal of Laboratory Medicine.* 2012;36(5):293-309.
4. Welsch U, Kummer W, Deller T. *Lehrbuch Histologie.* 4 ed: Elsevier; 2014. 710 p.
5. Berliner N, Horwitz M, Loughran TP. Congenital and acquired neutropenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004:63-79.
6. Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, Sengeløv H, Bastholm L, Nielsen MH, et al. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol.* 1993;51(4):187-98.
7. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.
8. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:197-223.
9. Owen CA, Campbell MA, Sannes PL, Boukedes SS, Campbell EJ. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J Cell Biol.* 1995;131(3):775-89.
10. 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;165(6):3366-74.
11. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:459-89.
12. Le Cabec V, Cowland JB, Calafat J, Borregaard N. Targeting of proteins to granule subsets is determined by timing and not by sorting: The specific granule protein NGAL is localized to azurophil granules when expressed in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(13):6454-7.
13. Pham CT. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(7):541-50.
14. Sengeløv H, Kjeldsen L, Borregaard N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol.* 1993;150(4):1535-43.
15. Faurischou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 2003;5(14):1317-27.
16. Janoff A. Inhibition of human granulocyte elastase by serum alpha-1-antitrypsin. *Am Rev Respir Dis.* 1972;105(1):121-2.
17. Dewald B, Rindler-Ludwig R, Bretz U, Baggiolini M. Subcellular localization and heterogeneity of neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med.* 1975;141(4):709-23.
18. Rindler-Ludwig R, Braunsteiner H. Cationic proteins from human neutrophil granulocytes. Evidence for their chymotrypsin-like properties. *Biochim Biophys Acta.* 1975;379(2):606-17.
19. Baggiolini M, Dewald B, Schnyder J, Ruch W, Cooper PH, Payne TG. Inhibition of the phagocytosis-induced respiratory burst by the fungal metabolite wortmannin and some analogues. *Exp Cell Res.* 1987;169(2):408-18.
20. Perera NC, Schilling O, Kittel H, Back W, Kremmer E, Jenne DE. NSP4, an elastase-related protease in human neutrophils with arginine specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(16):6229-34.

21. Fu Z, Thorpe M, Akula S, Chahal G, Hellman LT. Extended Cleavage Specificity of Human Neutrophil Elastase, Human Proteinase 3, and Their Distant Ortholog Clawed Frog PR3-Three Elastases With Similar Primary but Different Extended Specificities and Stability. *Front Immunol.* 2018;9:2387.
22. Lin SJ, Dong Ken C, Eigenbrot C, van Lookeren Campagne M, Kirchhofer D. Structures of Neutrophil Serine Protease 4 Reveal an Unusual Mechanism of Substrate Recognition by a Trypsin-Fold Protease. *Structure.* 2014;22(9):1333-40.
23. Garwicz D, Lennartsson A, Jacobsen SE, Gullberg U, Lindmark A. Biosynthetic profiles of neutrophil serine proteases in a human bone marrow-derived cellular myeloid differentiation model. *Haematologica.* 2005;90(1):38-44.
24. Kettritz R. Neutral serine proteases of neutrophils. *Immunol Rev.* 2016;273(1):232-48.
25. von Nussbaum F, Li VM. Neutrophil elastase inhibitors for the treatment of (cardio)pulmonary diseases: Into clinical testing with pre-adaptive pharmacophores. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015;25(20):4370-81.
26. Wiedow O, Meyer-Hoffert U. Neutrophil serine proteases: potential key regulators of cell signalling during inflammation. *J Intern Med.* 2005;257(4):319-28.
27. Janoff A, Roth WJ, Sinha S, Barnwell JW. Degradation of plasmodial antigens by human neutrophil elastase. *J Immunol.* 1988;141(4):1332-40.
28. Liou TG, Campbell EJ. Nonisotropic enzyme--inhibitor interactions: a novel nonoxidative mechanism for quantum proteolysis by human neutrophils. *Biochemistry.* 1995;34(49):16171-7.
29. Wilde CG, Snable JL, Griffith JE, Scott RW. Characterization of two azurophil granule proteases with active-site homology to neutrophil elastase. *J Biol Chem.* 1990;265(4):2038-41.
30. Attucci S, Korkmaz B, Juliano L, Hazouard E, Girardin C, Brillard-Bourdet M, et al. Measurement of free and membrane-bound cathepsin G in human neutrophils using new sensitive fluorogenic substrates. *Biochem J.* 2002;366(Pt 3):965-70.
31. Belaaouaj A, McCarthy R, Baumann M, Gao Z, Ley TJ, Abraham SN, et al. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med.* 1998;4(5):615-8.
32. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, et al. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature.* 2002;416(6878):291-7.
33. Tkalcovic J, Novelli M, Phylactides M, Iredale JP, Segal AW, Roes J. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity.* 2000;12(2):201-10.
34. Kelly E, Greene CM, McElvaney NG. Targeting neutrophil elastase in cystic fibrosis. *Expert Opin Ther Targets.* 2008;12(2):145-57.
35. Guyot N, Wartelle J, Malleret L, Todorov AA, Devouassoux G, Pacheco Y, et al. Unopposed cathepsin G, neutrophil elastase, and proteinase 3 cause severe lung damage and emphysema. *Am J Pathol.* 2014;184(8):2197-210.
36. Jeppsson JO, Laurell CB, Fagerhol M. Properties of isolated human alpha1-antitrypsins of Pi types M, S and Z. *Eur J Biochem.* 1978;83(1):143-53.
37. Crystal RG. The alpha 1-antitrypsin gene and its deficiency states. *Trends Genet.* 1989;5(12):411-7.
38. Calvin J, Price CP. Measurement of serum alpha 1-antichymotrypsin by immunoturbidimetry. *Ann Clin Biochem.* 1986;23 (Pt 2):206-9.
39. Bode W, Huber R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem.* 1992;204(2):433-51.
40. Petersen CM. Alpha 2-macroglobulin and pregnancy zone protein. Serum levels, alpha 2-macroglobulin receptors, cellular synthesis and aspects of function in relation to immunology. *Dan Med Bull.* 1993;40(4):409-46.

41. Salvesen G, Virca GD, Travis J. Interaction of alpha 2-macroglobulin with neutrophil and plasma proteinases. *Ann N Y Acad Sci.* 1983;421:316-26.
42. Polverino E, Rosales-Mayor E, Dale GE, Dembowsky K, Torres A. The Role of Neutrophil Elastase Inhibitors in Lung Diseases. *Chest.* 2017;152(2):249-62.
43. Smallman LA, Hill SL, Stockley RA. Reduction of ciliary beat frequency in vitro by sputum from patients with bronchiectasis: a serine proteinase effect. *Thorax.* 1984;39(9):663-7.
44. Sommerhoff CP, Nadel JA, Basbaum CB, Caughey GH. Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *J Clin Invest.* 1990;85(3):682-9.
45. Reilly CF, Travis J. The degradation of human lung elastin by neutrophil proteinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure.* 1980;621(1):147-57.
46. Taggart C, Cervantes-Laurean D, Kim G, McElvaney NG, Wehr N, Moss J, et al. Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *J Biol Chem.* 2000;275(35):27258-65.
47. Moore AR, Appelboom A, Kawabata K, Da Silva JA, D'Cruz D, Gowland G, et al. Destruction of articular cartilage by alpha 2 macroglobulin elastase complexes: role in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1999;58(2):109-13.
48. Gouni-Berthold I, Baumeister B, Wegel E, Berthold HK, Vetter H, Schmidt C. Neutrophil-elastase in chronic inflammatory bowel disease: a marker of disease activity? *Hepato-gastroenterology.* 1999;46(28):2315-20.
49. Lee JK, Zaidi SH, Liu P, Dawood F, Cheah AY, Wen WH, et al. A serine elastase inhibitor reduces inflammation and fibrosis and preserves cardiac function after experimentally-induced murine myocarditis. *Nat Med.* 1998;4(12):1383-91.
50. Barros SC, Martins JA, Marcos JC, Cavaco-Paulo A. Influence of secretory leukocyte protease inhibitor-based peptides on elastase activity and their incorporation in hyaluronic acid hydrogels for chronic wound therapy. *Biopolymers.* 2012;98(6):576-90.
51. Wen G, An W, Chen J, Maguire EM, Chen Q, Yang F, et al. Genetic and Pharmacologic Inhibition of the Neutrophil Elastase Inhibits Experimental Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(4).
52. Johnson GB, Brunn GJ, Platt JL. Cutting edge: an endogenous pathway to systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions through Toll-like receptor 4. *J Immunol.* 2004;172(1):20-4.
53. Tsujimoto H, Ono S, Majima T, Kawarabayashi N, Takayama E, Kinoshita M, et al. Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis. *Shock.* 2005;23(1):39-44.
54. Wilkinson TS, Conway Morris A, Kefala K, O'Kane CM, Moore NR, Booth NA, et al. Ventilator-associated pneumonia is characterized by excessive release of neutrophil proteases in the lung. *Chest.* 2012;142(6):1425-32.
55. Sahebnaasagh A, Saghafi F, Safdari M, Khataminia M, Sadremomtaz A, Talaei Z, et al. Neutrophil elastase inhibitor (sivelestat) may be a promising therapeutic option for management of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome or disseminated intravascular coagulation in COVID-19. *J Clin Pharm Ther.* 2020;45(6):1515-9.
56. Mohamed MMA, El-Shimy IA, Hadi MA. Neutrophil Elastase Inhibitors: A potential prophylactic treatment option for SARS-CoV-2-induced respiratory complications? *Critical Care.* 2020;24(1):311.
57. Turino GM, Seniorrm, Garg BD, Keller S, Levi MM, Mandl I. Serum elastase inhibitor deficiency and alpha 1-antitrypsin deficiency in patients with obstructive emphysema. *Science.* 1969;165(3894):709-11.
58. Gadek JE, Klein HG, Holland PV, Crystal RG. Replacement therapy of alpha 1-antitrypsin deficiency. Reversal of protease-antiprotease imbalance within the alveolar structures of PiZ subjects. *J Clin Invest.* 1981;68(5):1158-65.

59. Burrows B. A clinical trial of efficacy of antiproteolytic therapy: can it be done? *Am Rev Respir Dis.* 1983;127(2):S42-3.
60. Group MB. Mereo BioPharma Receives U.S. Orphan Drug Designation for alvelestat in the Treatment of alpha-1 antitrypsin deficiency [News release]. 2021 [updated October 26, 2021]. Available from: <https://www.globenewswire.com/news-release/2021/10/26/2320626/0/en/Mereo-BioPharma-Receives-U-S-Orphan-Drug-Designation-for-alvelestat-in-the-Treatment-of-alpha-1-antitrypsin-deficiency.html>.
61. Wewers MD, Crystal RG. Alpha-1 antitrypsin augmentation therapy. *COPD.* 2013;10 Suppl 1:64-7.
62. Chapman KR, Burdon JG, Piitulainen E, Sandhaus RA, Seersholm N, Stocks JM, et al. Intravenous augmentation treatment and lung density in severe α 1 antitrypsin deficiency (RAPID): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2015;386(9991):360-8.
63. Korkmaz B, Attucci S, Jourdan ML, Juliano L, Gauthier F. Inhibition of neutrophil elastase by alpha1-protease inhibitor at the surface of human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol.* 2005;175(5):3329-38.
64. Taggart CC, Lowe GJ, Greene CM, Mulgrew AT, O'Neill SJ, Levine RL, et al. Cathepsin B, L, and S cleave and inactivate secretory leucoprotease inhibitor. *J Biol Chem.* 2001;276(36):33345-52.
65. Guyot N, Butler MW, McNally P, Weldon S, Greene CM, Levine RL, et al. Elafin, an elastase-specific inhibitor, is cleaved by its cognate enzyme neutrophil elastase in sputum from individuals with cystic fibrosis. *J Biol Chem.* 2008;283(47):32377-85.
66. Shaw L, Wiedow O. Therapeutic potential of human elafin. *Biochem Soc Trans.* 2011;39(5):1450-4.
67. Alam SR, Lewis SC, Zamvar V, Pessotto R, Dweck MR, Krishan A, et al. Perioperative elafin for ischaemia-reperfusion injury during coronary artery bypass graft surgery: a randomised-controlled trial. *Heart.* 2015;101(20):1639-45.
68. Snider GL, Stone PJ, Lucey EC, Breuer R, Calore JD, Seshadri T, et al. Eglin-c, a polypeptide derived from the medicinal leech, prevents human neutrophil elastase-induced emphysema and bronchial secretory cell metaplasia in the hamster. *Am Rev Respir Dis.* 1985;132(6):1155-61.
69. Yoshimura T, Barker LN, Powers JC. Specificity and reactivity of human leukocyte elastase, porcine pancreatic elastase, human granulocyte cathepsin G, and bovine pancreatic chymotrypsin with arylsulfonyl fluorides. Discovery of a new series of potent and specific irreversible elastase inhibitors. *J Biol Chem.* 1982;257(9):5077-84.
70. 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;177(2):814-20.
71. Fahrney DE, Gold AM. Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. I. Rates of Reaction with Acetylcholinesterase, α -Chymotrypsin, and Trypsin. *Journal of the American Chemical Society.* 1963;85(7):997-1000.
72. Lively MO, Powers JC. Specificity and reactivity of human granulocyte elastase and cathepsin G, porcine pancreatic elastase, bovine chymotrypsin and trypsin toward inhibition with sulfonyl fluorides. *Biochim Biophys Acta.* 1978;525(1):171-9.
73. Powers JC, Gupton BF, Harley AD, Nishino N, Whitley RJ. Specificity of porcine pancreatic elastase, human leukocyte elastase and cathepsin G. Inhibition with peptide chloromethyl ketones. *Biochim Biophys Acta.* 1977;485(1):156-66.
74. Fletcher DS, Osinga DG, Hand KM, Dellea PS, Ashe BM, Mumford RA, et al. A comparison of alpha 1-proteinase inhibitor methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chloromethylketone and specific beta-lactam inhibitors in an acute model of human polymorphonuclear leukocyte elastase-induced lung hemorrhage in the hamster. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141(3):672-7.
75. Aikawa N, Kawasaki Y. Clinical utility of the neutrophil elastase inhibitor sivelestat for the treatment of acute respiratory distress syndrome. *Ther Clin Risk Manag.* 2014;10:621-9.
76. Elastase inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* 2004;14(10):1511-6.

77. El-Shimy IA, Mohamed MMA, Hasan SS, Hadi MA. Targeting host cell proteases as a potential treatment strategy to limit the spread of SARS-CoV-2 in the respiratory tract. *Pharmacol Res Perspect.* 2021;9(1):e00698.
78. Ohbayashi H. Neutrophil elastase inhibitors as treatment for COPD. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 2002;11(7):965-80.
79. Henriksen PA. The potential of neutrophil elastase inhibitors as anti-inflammatory therapies. *Curr Opin Hematol.* 2014;21(1):23-8.
80. Stockley R, De Soyza A, Gunawardena K, Perrett J, Forsman-Semb K, Entwistle N, et al. Phase II study of a neutrophil elastase inhibitor (AZD9668) in patients with bronchiectasis. *Respir Med.* 2013;107(4):524-33.
81. Group MB. Alvelestat (MPH966) 2024 [Available from: <https://www.mereobiopharma.com/our-pipeline/alvelestat-mph966/>].
82. von Nussbaum F, Li VM, Allerheiligen S, Anlauf S, Bärfacker L, Bechem M, et al. Freezing the Bioactive Conformation to Boost Potency: The Identification of BAY 85-8501, a Selective and Potent Inhibitor of Human Neutrophil Elastase for Pulmonary Diseases. *ChemMedChem.* 2015;10(7):1163-73.
83. Crocetti L, Quinn MT, Schepetkin IA, Giovannoni MP. A patenting perspective on human neutrophil elastase (HNE) inhibitors (2014-2018) and their therapeutic applications. *Expert Opin Ther Pat.* 2019;29(7):555-78.
84. Donarska B, Z Łączkowski K. Recent advances in the development of elastase inhibitors. *Future Medicinal Chemistry.* 2020;12(20):1809-13.
85. Fritz H, Wunderer G. Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs. *Arzneimittelforschung.* 1983;33(4):479-94.
86. Crocetti L, Schepetkin IA, Cilibrizzi A, Graziano A, Vergelli C, Giomi D, et al. Optimization of N-benzoylindazole derivatives as inhibitors of human neutrophil elastase. *J Med Chem.* 2013;56(15):6259-72.
87. Cvetovich RJ, Chartrain M, Hartner FW, Jr., Roberge C, Amato JS, Grabowski EJ. An Asymmetric Synthesis of L-694,458, a Human Leukocyte Elastase Inhibitor, via Novel Enzyme Resolution of beta-Lactam Esters. *J Org Chem.* 1996;61(19):6575-80.
88. Macdonald SJ, Dowle MD, Harrison LA, Shah P, Johnson MR, Inglis GG, et al. The discovery of a potent, intracellular, orally bioavailable, long duration inhibitor of human neutrophil elastase--GW311616A a development candidate. *Bioorg Med Chem Lett.* 2001;11(7):895-8.
89. Kapui Z, Varga M, Urban-Szabo K, Mikus E, Szabo T, Szeredi J, et al. Biochemical and pharmacological characterization of 2-(9-(2-piperidinoethoxy)-4-oxo-4H-pyrido[1,2-a]pyrimidin-2-ylloxymethyl)-4-(1-methylethyl)-6-methoxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-one-1,1-dioxide (SSR69071), a novel, orally active elastase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;305(2):451-9.
90. Korkmaz B, Attucci S, Juliano MA, Kalupov T, Jourdan ML, Juliano L, 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.
91. Senior RM, Campbell EJ, Landis JA, Cox FR, Kuhn C, Koren HS. Elastase of U-937 monocytelike cells. Comparisons with elastases derived from human monocytes and neutrophils and murine macrophagelike cells. *J Clin Invest.* 1982;69(2):384-93.
92. Jacobson A, Melhus H, Wadelius M. Can mutations in ELA2, neutrophil elastase expression or differential cell toxicity explain sulphasalazine-induced agranulocytosis? *BMC Blood Disord.* 2004;4(1):5-.
93. Korkmaz B, Attucci S, Hazouard E, Ferrandiere M, Jourdan ML, Brillard-Bourdet M, et al. Discriminating between the activities of human neutrophil elastase and proteinase 3 using serpin-derived fluorogenic substrates. *J Biol Chem.* 2002;277(42):39074-81.
94. Wiesner O, Litwiller RD, Hummel AM, Viss MA, McDonald CJ, Jenne DE, et al. Differences between human proteinase 3 and neutrophil elastase and their murine homologues are relevant for murine model experiments. *FEBS Lett.* 2005;579(24):5305-12.

95. Suzuki K, Bose P, Leong-Quong RY, Fujita DJ, Riabowol K. REAP: A two minute cell fractionation method. *BMC Res Notes*. 2010;3:294.
96. Campbell EJ, Silverman EK, Campbell MA. Elastase and cathepsin G of human monocytes. Quantification of cellular content, release in response to stimuli, and heterogeneity in elastase-mediated proteolytic activity. *The Journal of Immunology*. 1989;143(9):2961.
97. Remold-O'Donnell E, Nixon JC, Rose RM. Elastase inhibitor. Characterization of the human elastase inhibitor molecule associated with monocytes, macrophages, and neutrophils. *The Journal of experimental medicine*. 1989;169(3):1071-86.
98. Belorgey D, Bieth JG. DNA binds neutrophil elastase and mucus proteinase inhibitor and impairs their functional activity. *FEBS Lett*. 1995;361(2-3):265-8.
99. Burster T, Beck A, Tolosa E, Marin-Esteban V, Röttschke O, Falk K, et al. Cathepsin G, and Not the Asparagine-Specific Endoprotease, Controls the Processing of Myelin Basic Protein in Lysosomes from Human B Lymphocytes. *The Journal of Immunology*. 2004;172(9):5495.
100. Barrett AJ, Salvesen G. *Proteinase Inhibitors*: Elsevier; 1986.
101. Ogushi F, Fells GA, Hubbard RC, Straus SD, Crystal RG. Z-type alpha 1-antitrypsin is less competent than M1-type alpha 1-antitrypsin as an inhibitor of neutrophil elastase. *The Journal of clinical investigation*. 1987;80(5):1366-74.
102. Braun NJ, Bodmer JL, Virca GD, Metz-Virca G, Maschler R, Bieth JG, et al. Kinetic studies on the interaction of eglin c with human leukocyte elastase and cathepsin G. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1987;368(4):299-308.
103. Baici A, Seemüller U. Kinetics of the inhibition of human leucocyte elastase by eglin from the leech *Hirudo medicinalis*. *The Biochemical journal*. 1984;218(3):829-33.
104. Junger WG, Hallström S, Redl H, Schlag G. Inhibition of human, ovine, and baboon neutrophil elastase with Eglin c and secretory leukocyte proteinase inhibitor. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1992;373(3):119-22.
105. Varga M, Kapui Z, Bátori S, Nagy LT, Vasvári-Debreczy L, Mikus E, et al. A novel orally active inhibitor of HLE. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2003;38(4):421-5.
106. Stevens T, Ekholm K, Gränse M, Lindahl M, Kozma V, Jungar C, et al. AZD9668: pharmacological characterization of a novel oral inhibitor of neutrophil elastase. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;339(1):313-20.
107. Mehlich A, Beckmann J, Wenzel HR, Tschesche H. Aprotinin derivatives with chromophoric leaving groups can be used as highly selective active-site titrants for serine proteinases and permit the determination of kinetic constants of enzyme-inhibitor complexes. *Biochim Biophys Acta*. 1988;957(3):420-9.
108. Krabbe J, Beilmann V, Alamzad-Krabbe H, Böll S, Seifert A, Ruske N, et al. Blood collection technique, anticoagulants and storing temperature have minor effects on the isolation of polymorphonuclear neutrophils. *Scientific Reports*. 2020;10(1):14646.
109. Braun NJ, Schnebli HP. Interaction of Eglin c with polymorphonuclear cells: evidence for binding to the cell surface. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1987;368(2):155-61.
110. Dau T, Sarker RS, Yildirim AO, Eickelberg O, Jenne DE. Autoprocessing of neutrophil elastase near its active site reduces the efficiency of natural and synthetic elastase inhibitors. *Nat Commun*. 2015;6:6722.
111. Yu L, Zhong L, Xiong L, Dan W, Li J, Ye J, et al. Neutrophil elastase-mediated proteolysis of the tumor suppressor p200 CUX1 promotes cell proliferation and inhibits cell differentiation in APL. *Life Sciences*. 2020;242:117229.
112. Zhang L, Wang Q, Zhou Y, Ouyang Q, Dai W, Chen J, et al. Overexpression of MTA1 inhibits the metastatic ability of ZR-75-30 cells in vitro by promoting MTA2 degradation. *Cell Commun Signal*. 2019;17(1):4.
113. Veerappan A, Thompson M, Savage AR, Silverman ML, Chan WS, Sung B, et al. Mast cells and exosomes in hyperoxia-induced neonatal lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016;310(11):L1218-32.

114. Falloon J, Gallin JI. Neutrophil granules in health and disease. *J Allergy Clin Immunol.* 1986;77(5):653-62.
115. Soehnlein O, Steffens S, Hidalgo A, Weber C. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(4):248-61.
116. Redini F, Tixier JM, Petitou M, Choay J, Robert L, Hornebeck W. Inhibition of leucocyte elastase by heparin and its derivatives. *Biochem J.* 1988;252(2):515-9.
117. Castillo MJ, Nakajima K, Zimmerman M, Powers JC. Sensitive substrates for human leukocyte and porcine pancreatic elastase: a study of the merits of various chromophoric and fluorogenic leaving groups in assays for serine proteases. *Anal Biochem.* 1979;99(1):53-64.
118. Bieth J, Spiess B, Wermuth CG. The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase. *Biochem Med.* 1974;11(4):350-7.
119. Nakajima K, Powers JC, Ashe BM, Zimmerman M. Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase. Studies with peptide substrates related to the alpha 1-protease inhibitor reactive site. *J Biol Chem.* 1979;254(10):4027-32.
120. Kossodo S, Zhang J, Groves K, Cuneo GJ, Handy E, Morin J, et al. Noninvasive in vivo quantification of neutrophil elastase activity in acute experimental mouse lung injury. *Int J Mol Imaging.* 2011;2011:581406.
121. Hajjar E, Korkmaz B, Reuter N. Differences in the substrate binding sites of murine and human proteinase 3 and neutrophil elastase. *FEBS Lett.* 2007;581(29):5685-90.
122. Takahashi H, Nukiwa T, Basset P, Crystal RG. Myelomonocytic cell lineage expression of the neutrophil elastase gene. *J Biol Chem.* 1988;263(5):2543-7.
123. Abrink M, Gobl AE, Huang R, Nilsson K, Hellman L. Human cell lines U-937, THP-1 and Mono Mac 6 represent relatively immature cells of the monocyte-macrophage cell lineage. *Leukemia.* 1994;8(9):1579-84.
124. Sundström C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer.* 1976;17(5):565-77.
125. Gingras M-C, Margolin JF. Differential expression of multiple unexpected genes during U937 cell and macrophage differentiation detected by suppressive subtractive hybridization. *Experimental Hematology.* 2000;28(3):350.
126. Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1978;75(5):2458-62.
127. Kay GE, Lane BC, Snyderman R. Induction of selective biological responses to chemoattractants in a human monocyte-like cell line. *Infect Immun.* 1983;41(3):1166-74.
128. Ostrem VK, Lau WF, Lee SH, Perlman K, Prahl J, Schnoes HK, et al. Induction of monocytic differentiation of HL-60 cells by 1,25-dihydroxyvitamin D analogs. *J Biol Chem.* 1987;262(29):14164-71.
129. ATCC. Product Sheet U-937 (ATCC® CRL-1593.2™), https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1593.2.aspx?geo_country=de#documentation [
130. HL60 Cell Line human, 98070106, Caucasian promyelocytic leukemia https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_98070106?lang=de®ion=DE&gclid=Cj0KCCQIA88X_BRDUARIsACVMYD-5niK_9bWkhUI0CU0Ys29Yb9Nc6ofvxGniYKxGw_Bprwp5_qoaTIEaAmIMEALw_wcB
131. Hannah S, Mecklenburgh K, Rahman I, Bellingan GJ, Greening A, Haslett C, et al. Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro. *FEBS Lett.* 1995;372(2-3):233-7.
132. Fouret P, du Bois RM, Bernaudin JF, Takahashi H, Ferrans VJ, Crystal RG. Expression of the neutrophil elastase gene during human bone marrow cell differentiation. *J Exp Med.* 1989;169(3):833-45.
133. Nilsson G, Blom T, Kusche-Gullberg M, Kjellén L, Butterfield JH, Sundström C, et al. Phenotypic characterization of the human mast-cell line HMC-1. *Scand J Immunol.* 1994;39(5):489-98.

134. 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;131(2):235-45.
135. Dokai M, Madoiwa S, Yasumoto A, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Sakata A, et al. Local regulation of neutrophil elastase activity by endogenous α 1-antitrypsin in lipopolysaccharide-primed hematological cells. *Thromb Res.* 2011;128(3):283-92.
136. Toksoz D, Bunce CM, Stone PC, Michell RH, Brown G. Variant cell lines from the human promyelocyte line HL60. *Leuk Res.* 1982;6(4):491-8.
137. Shehadul Islam M, Aryasomayajula A, Selvaganapathy PR. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines (Basel).* 2017;8(3):83.
138. Durantoni J, Belorgey D, Carrère J, Donato L, Moritz T, Bieth JG. Effect of DNase on the activity of neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase 3 in the presence of DNA. *FEBS Lett.* 2000;473(2):154-6.
139. Walker JM. *The protein protocols handbook.* New York, N.Y.: Humana Press; 2009.
140. Bieringer F, Sommerhoff C. Einfluss von Inhibitoren auf Tryptase β in HMC-1 Mastzellen: Universitätsbibliothek der Ludwig-Maximilians-Universität; 2020.
141. Hanson RD, Connolly NL, Burnett D, Campbell EJ, Senior RM, Ley TJ. Developmental regulation of the human cathepsin G gene in myelomonocytic cells. *J Biol Chem.* 1990;265(3):1524-30.
142. Senior RM, Campbell EJ. Cathepsin G in human mononuclear phagocytes: comparisons between monocytes and U937 monocyte-like cells. *J Immunol.* 1984;132(5):2547-51.
143. Lestienne P, Bieth JG. The inhibition of human leukocyte elastase by basic pancreatic trypsin inhibitor. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1978;190(1):358-60.
144. Macdonald SJ, Belton DJ, Buckley DM, Spooner JE, Anson MS, Harrison LA, et al. Syntheses of trans-5-oxo-hexahydro-pyrrolo[3,2-b]pyrroles and trans-5-oxo-hexahydro-furo[3,2-b]pyrroles (pyrrolidine trans-lactams and trans-lactones): new pharmacophores for elastase inhibition. *J Med Chem.* 1998;41(21):3919-22.
145. Stein RL, Trainor DA. Mechanism of inactivation of human leukocyte elastase by a chloromethyl ketone: kinetic and solvent isotope effect studies. *Biochemistry.* 1986;25(19):5414-9.
146. Meyer JF, Bieth J, Metais P. On the inhibition of elastase by serum. Some distinguishing properties of alpha1-antitrypsin and alpha2-macroglobulin. *Clin Chim Acta.* 1975;62(1):43-53.
147. Cha S. Tight-binding inhibitors-I. Kinetic behavior. *Biochem Pharmacol.* 1975;24(23):2177-85.
148. Williams JW, Morrison JF. The kinetics of reversible tight-binding inhibition. *Methods Enzymol.* 1979;63:437-67.
149. Yang NJ, Hinner MJ. Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins. *Methods Mol Biol.* 2015;1266:29-53.
150. Nakatani K, Takeshita S, Tsujimoto H, Kawamura Y, Sekine I. Inhibitory effect of serine protease inhibitors on neutrophil-mediated endothelial cell injury. *J Leukoc Biol.* 2001;69(2):241-7.
151. Taggart C, Coakley RJ, Grealley P, Canny G, O'Neill SJ, McElvaney NG. Increased elastase release by CF neutrophils is mediated by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;278(1):L33-41.
152. Jeannot V, Salmon JM, Deumié M, Viallet P. Intracellular accumulation of rhodamine 110 in single living cells. *J Histochem Cytochem.* 1997;45(3):403-12.
153. Hansel TT, Barnes PJ. *New Drugs for Asthma, Allergy and COPD:* Karger; 2001.
154. Pu S, Wang D, Liu D, Zhao Y, Qi D, He J, et al. Effect of sivelestat sodium in patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Pulm Med.* 2017;17(1):148.
155. Betzel C, Dauter Z, Genov N, Lamzin V, Navaza J, Schnebli HP, et al. Structure of the proteinase inhibitor eglin c with hydrolysed reactive centre at 2.0 Å resolution. *FEBS Lett.* 1993;317(3):185-8.

-
156. Tschesche H. Proteinases in Inflammation and Tumor Invasion: Review Articles Including Those from an International Conference, Bielefeld, Federal Republic of Germany, March 14-16, 1985: De Gruyter; 1986.
 157. McPhalen CA, Schnebli HP, James MN. Crystal and molecular structure of the inhibitor eglin from leeches in complex with subtilisin Carlsberg. *FEBS Lett.* 1985;188(1):55-8.
 158. Dwenger A, Tost P, Holle W. Evaluation of elastase and alpha 1-proteinase inhibitor-elastase uptake by polymorphonuclear leukocytes and evidence of an elastase-specific receptor. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1986;24(5):299-308.
 159. Thorson LM, Turkalj A, Hung JC. In vitro evaluation of neutrophil viability after exposure to a hypotonic medium. *Nucl Med Commun.* 1995;16(7):615-20.
 160. Kasperkiewicz P, Altman Y, D'Angelo M, Salvesen GS, Drag M. Toolbox of Fluorescent Probes for Parallel Imaging Reveals Uneven Location of Serine Proteases in Neutrophils. *Journal of the American Chemical Society.* 2017;139(29):10115-25.
 161. Kasperkiewicz P, Poreba M, Snipas SJ, Parker H, Winterbourn CC, Salvesen GS, et al. Design of ultrasensitive probes for human neutrophil elastase through hybrid combinatorial substrate library profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(7):2518-23.
 162. Figueredo CM, Gustafsson A, Asman B, Bergström K. Expression of intracellular elastase activity in peripheral neutrophils from patients with adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000;27(8):572-7.
 163. Ito Y, Kawanishi Y, Shoji N, Ohyashiki K. Decline in Antibiotic Enzyme Activity of Neutrophils Is a Prognostic Factor for Infections in Patients with Myelodysplastic Syndrome. *Clinical Infectious Diseases.* 2000;31(5):1292-5.
 164. Rosenberger CM, Gallo RL, Finlay BB. Interplay between antibacterial effectors: a macrophage antimicrobial peptide impairs intracellular *Salmonella* replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004;101(8):2422-7.
 165. 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;173(12):7277-81.
 166. Esposito AL, Clark CA, Poirier WJ, Kephart PA. Protease inhibitor eglin-c affects superoxide anion release but not bacterial killing by human polymorphonuclear leukocytes. *Exp Lung Res.* 1988;14(6):743-56.
 167. Méthot N, Rubin J, Guay D, Beaulieu C, Ethier D, Reddy TJ, 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;282(29):20836-46.
 168. Jugniot N, Voisin P, Bentaher A, Mellet P. Neutrophil Elastase Activity Imaging: Recent Approaches in the Design and Applications of Activity-Based Probes and Substrate-Based Probes. *Contrast Media Mol Imaging.* 2019;2019:7417192-.