

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

# **Aktivitätsbasierte Quantifizierung der Granula-assoziierten Serinproteasen Neutrophiler Granulozyten**

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

vorgelegt von  
Eva Riedlinger

aus  
Neu-Ulm

Jahr  
2025

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian P. Sommerhoff

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Heiko Adler

Prof. Dr. Christian Straka

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.2025



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät  
Promotionsbüro



## Eidesstattliche Versicherung

Riedlinger, Eva

\_\_\_\_\_  
Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

### **Aktivitätsbasierte Quantifizierung der Granula-assoziierten Serinproteasen Neutrophiler 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, 21.02.2025

Ort, Datum

Eva Riedlinger

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Eva Riedlinger



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät  
Promotionsbüro



## Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Riedlinger, Eva

---

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

**Aktivitätsbasierte Quantifizierung der Granula-assoziierten Serinproteasen Neutrophiler  
Granulozyten**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 21.02.2025

---

Ort, Datum

Eva Riedlinger

---

Unterschrift Eva Riedlinger

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>7</b>
2.1 Neutrophile Granulozyten .....	7
2.1.1 Allgemeine Grundlagen.....	7
2.1.2 Funktionen .....	8
2.2 Granula Neutrophiler Granulozyten .....	9
2.3 Granula-assoziierte Serinproteasen der Immunabwehr.....	9
2.3.1 Allgemeines.....	9
2.3.2 Elastase .....	11
2.3.3 Proteinase 3 .....	11
2.3.4 Cathepsin G .....	12
2.3.5 Aktivierung durch Cathepsin C.....	12
2.3.6 Regulation und Funktionen .....	13
2.3.7 Pathophysiologie.....	14
2.4 Quantifizierung der GASPIDs und von Cathepsin C.....	16
2.4.1 Methoden .....	16
2.4.2 Anwendungsbeispiele .....	17
2.5 Ziele und Vorgehensweise.....	19
<b>3 Materialien und Methoden</b> .....	<b>20</b>
3.1 Material .....	20
3.1.1 Geräte .....	20
3.1.2 Verbrauchsmaterial .....	21
3.1.3 Puffer und Lösungen.....	21
3.1.4 Enzyme .....	22
3.1.5 Substrate und Fluoreszenz-Standards.....	22
3.1.6 Inhibitoren .....	23
3.1.7 Labor-Kits.....	23
3.1.8 Software .....	23
3.2 Methoden .....	24
3.2.1 Grundlagen enzymkinetischer Assays .....	24
3.2.2 Aktivitäts- und Mengenbestimmung .....	24
3.2.3 Analytische Spezifität .....	26

3.2.4	Blutspende zur Isolierung von Neutrophilen Granulozyten .....	27
3.2.5	Isolation Neutrophiler Granulozyten .....	27
3.2.6	Herstellung, Färbung und Beurteilung von Zytospins .....	28
3.2.7	Quantifizierung von Doppelstrang-DNA .....	28
3.2.8	Quantifizierung des Gesamtproteins .....	28
3.2.9	Quantifizierung von Calprotectin .....	29
3.2.10	Quantifizierung von Myeloperoxidase .....	29
3.2.11	Untersuchungen zum Einfluss von Hämoglobin .....	29
3.2.12	Statistische Methoden .....	30
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
4.1	Assayevaluierung mit Hilfe isolierter Proteasen .....	31
4.1.1	Linearität der Progresskurven .....	31
4.1.2	Linearität der Assays .....	33
4.1.3	Analytische Selektivität .....	35
4.1.4	Interferenz .....	36
4.1.5	Analytische Spezifität - Einsatz von Inhibitoren .....	38
4.2	Assayevaluierung mit Zelllysaten .....	41
4.2.1	Detektion der GASPIDs und von Cathepsin C im Lysat Neutrophiler Granulozyten ....	41
4.2.2	Analytische Spezifität .....	43
4.2.3	Stabilität der Zelllysate Neutrophiler Granulozyten .....	45
4.3	Weiterführende Evaluation der Assays .....	46
4.3.1	Zellisolation .....	47
4.3.2	Auswertung des Differentialblutbildes .....	47
4.3.3	Berechnung der Isolations-Effizienz .....	48
4.3.4	Bestimmung der Reinheit der Proben .....	51
4.3.5	Messung der Aktivität der GASPIDs und von Cathepsin C .....	52
4.3.6	Quantifizierung der GASPIDs und von Cathepsin C .....	53
4.3.7	Validierung der Zellzählung .....	54
4.3.8	Quantifizierung von Hämoglobin in Zelllysaten .....	59
4.3.9	Einfluss von Hämoglobin auf die Aktivitätsassays .....	61
4.3.10	Bestimmung von Myeloperoxidase .....	62
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>64</b>
5.1	Eignung von Peptidsubstraten zur Quantifizierung der GASPIDs und von Cathepsin C .....	66
5.2	Anwendung der Assays auf Zelllysate .....	69
5.3	Quantifizierung der GASPIDs und von Cathepsin C in Neutrophilen von Probanden .....	72
5.3.1	Mengenbestimmung .....	73

5.3.2	Korrelation der GASPIDs untereinander und mit Myeloperoxidase .....	74
5.3.3	Korrelation der GASPIDs mit Cathepsin C.....	75
5.3.4	Geschlechtsspezifische Unterschiede .....	76
5.3.5	Korrelation mit den Parametern des Differentialblutbildes .....	77
5.4	Ausblick.....	78
<b>6</b>	<b>Quellenverzeichnis .....</b>	<b>81</b>

## Abkürzungsverzeichnis

---

AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
AP1	Assaypuffer 1
AP2	Assaypuffer 2
$\alpha_1$ -PI	$\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
CathC	Cathepsin C
CathG	Cathepsin G
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FRET-K	Abz-Val-Ala-Asp-Nva-Arg-Asp-Arg-Gln-EDDnp
GASPIDs	Granula-assoziierte Serinproteasen der Immunabwehr
HNE	Humane Neutrophilen Elastase
MCH	Mittleres Korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	Mittlere Korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration
MCV	Mittleres Erythrozytenvolumen
MPO	Myeloperoxidase
MW	Mittelwert
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NSP-4	Neutrophilen-Serinprotease 4
OD	Optical Density
PBS	Phosphate-Buffered Saline
pNA	para-Nitroanilin
PR3	Proteinase 3
RF	Relative Fluoreszenz
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SLPI	Secretory Leucocyte Peptidase Inhibitor
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
VK	Variationskoeffizient

---

# 1 Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten sind der myeloischen Zellreihe entstammende Immunzellen, die essenzielle Effektoren der angeborenen Immunantwort sind, aber auch maßgeblich zu Entzündungsprozessen beitragen. Wesentliche Bestandteile sind die Serinproteasen Neutrophilen Elastase (HNE), Proteinase 3 (PR3), Cathepsin G (CathG) und Neutrophilen Proteinase 4 (NSP4), die auf Grund phylogenetischer und struktureller Gemeinsamkeiten den „Granula-Associated Serine Proteases of Immune Defense“ (GASPIDs) zugerechnet werden. Während der Granulopoese werden sie als Zymogene synthetisiert, durch die Cysteinprotease Cathepsin C (CathC) prozessiert und anschließend in enzymatisch aktiver Form in azurophilen Granula gespeichert. Da die Synthese ausschließlich während der Zellreifung im Knochenmark erfolgt verfügen im Blut zirkulierende Neutrophile Granulozyten über eine festgelegte Ausstattung dieser Proteasen.

Ziel dieser Arbeit war es, die in peripheren Neutrophilen enthaltenen Mengen der GASPIDs HNE, PR3, CathG und ihres Aktivators CathC mittels klassischer enzymkinetischer Assays zu quantifizieren. Ausgehend von Peptidsubstraten, die zum Nachweis der GASPIDs identifiziert worden waren, wurden zunächst aktivitäts-basierte Assays etabliert und hinsichtlich der Quantifizierung validiert. Beim Einsatz isolierter Proteasen ist die gemessene Aktivität in allen vier Assays direkt proportional zur eingesetzten Enzymkonzentration ( $r^2 > 0,99$ ), die unteren Nachweisgrenzen liegen dabei jeweils im subnanomolaren Bereich ( $< 0,5 \text{ nM}$ ). Technische Störfaktoren während der Messungen können anhand der Beobachtung des linearen Anstiegs des Substratumsatzes über die Zeit ( $r^2 > 0,90$ ) ausgeschlossen werden. Da Peptidsubstrate nicht völlig spezifisch sind wurde für jede der Proteasen ein selektiver Inhibitor identifiziert, mit dem die Aktivität zusätzlich auf die jeweilige Protease zurückgeführt werden kann (Restaktivität  $\leq 3 \%$ )

Im nächsten Schritt wurde die Übertragbarkeit der Assays auf Zelllysate untersucht. Dazu wurden Neutrophile Granulozyten mittels immunomagnetischer Depletion anderer Zellen aus Vollblut isoliert und mit tensidhaltigen Puffern lysiert. In diesen Lysaten ist die Aktivitätsmessung aller vier Proteasen problemlos möglich; beim Einsatz von  $\sim 100$  bis  $40.000$  Zellen ist die Aktivität linear von der eingesetzten Zellzahl abhängig ( $r^2 \geq 96$ ). Matrixeffekte werden nicht beobachtet. Die Beeinflussung der Assays durch andere in den Lysaten vorhandene Enzyme wurde mithilfe der zuvor etablierten selektiven Inhibitoren weitgehend ausgeschlossen (Restaktivität  $< 10 \%$ ).

Bei vergleichsweise hoher Ausbeute der Isolation ( $55 \pm 10 \%$ ) und Reinheit der Leukozytenpopulation ( $99 \pm 0,5$  Neutrophile/100 Leukozyten) verblieben trotz zweimaliger hypotoner Lyse

im Mittel  $18 \pm 21$  Erythrozyten pro 100 Leukozyten. Deshalb durchgeführte Untersuchungen zum Einfluss von Hämoglobin zeigen, dass die Zugabe von  $> 0,1$  mg/dl Hämoglobin die gemessene Aktivität von PR3 im PR3-Assay reduziert; die HNE-, CathG- und CathC-Assays werden dagegen auch durch 10-fach höhere Hb-Konzentrationen (1 mg/dl) nicht beeinflusst. Bei der Bestimmung in Neutrophilen-Lysaten korrelieren hohe Hb-Konzentrationen allerdings nicht mit niedrigen PR3-Werten ( $r \leq 0,19$ ;  $p = 0,32$ ), sodass ein relevanter Einfluss auf die Quantifizierung hier weitgehend ausgeschlossen ist.

Nach Abschluss der Validierung wurden die Assays zur Analyse der Lysatproben von 28 Probanden (Alter  $24 \pm 4,4$  Jahre) verwendet. Die Aktivität aller vier Proteasen konnte erfolgreich in allen Proben quantifiziert und somit erstmals der intrazelluläre Gehalt der GASPIDs und von CathC in einer größeren Probandenkohorte bestimmt werden. Im Mittel enthielten die Neutrophilen Granulozyten  $0,5 \pm 0,2$  pg HNE,  $0,8 \pm 0,3$  pg PR3,  $0,6 \pm 0,2$  pg CathG und  $0,2 \pm 0,07$  pg CathC pro Zelle (MW  $\pm$  SD,  $n = 28$ ). Die Messwerte zeigen deutliche interindividuelle Unterschiede, die bei der PR3-Bestimmung am ausgeprägtesten sind (PR3 0,3 - 1,4 pg, HNE 0,2 - 0,9 pg, CathG 0,2 - 0,9 pg, CathC 0,07 - 0,34 pg). Insbesondere wurden signifikant geringere Mengen aller vier Proteasen bei Probandinnen im Vergleich zu Probanden nachgewiesen (z.B. CathG weiblich  $0,5 \pm 0,2$  pg, männlich  $0,7 \pm 0,2$  pg, MW  $\pm$  SD). Korrelationen der GASPIDs untereinander und mit ihrer Aktivatorprotease Cathepsin C ergeben eine positive Abhängigkeit ( $r > 0,5$  bzw. 0,55;  $p = 0,006$  bzw. 0,002). Kein relevanter Zusammenhang hingegen besteht zur Myeloperoxidase, einer weiteren in azurophilen Granula enthaltenen Protease ( $r < 0,29$ ;  $p = 0,29$ ).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die hier etablierten Assays einen technisch einfachen und gleichzeitig präzisen Ansatz für die Quantifizierung der GASPIDs und ihres Aktivators in zirkulierenden Neutrophilen Granulozyten bieten. Diese Assays scheinen – ggf. nach weiterer Optimierung der Handhabbarkeit – geeignet zu sein, um die aufgezeigten interindividuellen und geschlechtsspezifischen Unterschiede an einem größeren Kollektiv näher zu analysieren und mögliche Variationen im Zusammenhang mit GASPID-assoziierten Erkrankungen aufzudecken. Diese Untersuchungen werden zeigen, inwieweit die GASPIDs als unabhängige Biomarker für diagnostische und prognostische Zwecke eingesetzt werden können.

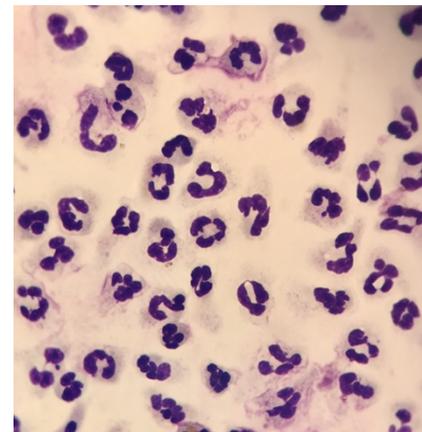
## 2 Einleitung

### 2.1 Neutrophile Granulozyten

#### 2.1.1 Allgemeine Grundlagen

Neutrophile Granulozyten sind der myeloischen Zellreihe zugehörige polymorphkernige Leukozyten, die als Effektorzellen des angeborenen Immunsystems eine tragende Rolle in der Wirtsabwehr innehaben [1]. Mit einem Anteil von 50 - 70% stellen sie die größte Subpopulation der zirkulierenden Leukozyten im menschlichen Organismus dar.

Die erste Beschreibung erfolgte im Jahr 1872 durch den russischen Naturwissenschaftler Elie Metschnikoff [2]. Er bezeichnete die im Versuch an Seestern-Larven entdeckten Immunzellen zunächst als „Mikrophagen“, da er ihre Fähigkeit zur Phagozytose von Erregern beobachtet hatte. Erst durch die Arbeiten von Paul Ehrlich etablierte sich im weiteren Verlauf der heute verwendete Begriff „Neutrophiler Granulozyt“ [3]. Dieser Begriff leitet sich von dem typischen Verhalten in der Färbung nach Pappenheim ab: Die kugelförmigen, ca. 15  $\mu\text{m}$  großen Zellen weisen ein zart-rosa oxyphiles Zytoplasma auf, da der Zellinhalt durch basische und saure Farbstoffe nur schwach angefärbt wird (s. Abb. 2.1). Während unreife Formen einen einteiligen Zellkern enthalten, liegt in den reifen Formen der typische mehrsegmentierte Kern vor. Eine weitere Besonderheit dieser Immunzellen sind die im Zytoplasma vorliegenden Granula, welche verschiedene in der Immunabwehr relevante Mediatoren speichern [4].



**Abbildung 2.1: Neutrophile Granulozyten im Blutausstrich.**  
Färbung nach Pappenheim;  
Vergrößerung 1000-fach. (vgl. Kap. 4.3.4)

Im Rahmen der Granulozytopoese im Knochenmark entstehen zunächst Myeloblasten, welche sich über verschiedene Zwischenstufen zu stabkernigen und anschließend zu reifen segmentkernigen Granulozyten entwickeln [5, 6]. Für die regelrechte terminale Differenzierung sind dabei die Transkriptionsfaktoren C/EBP- $\alpha$  und PU.1 unabdingbar [7, 8]. Auf diese Weise werden pro Tag mehr als  $10^{11}$  Zellen produziert und aus dem Knochenmark freigesetzt [9]. Anschließend zirkulieren Neutrophile Granulozyten mit einer Halbwertszeit von etwa 5 Tagen in den Blutgefäßen [10]. Ein Teil von ihnen sammelt sich in physiologischen „Reserve-Pools“ in Milz, Leber und Lunge, ein anderer Teil wird bei Entzündungsprozessen durch chemotaktische Gradienten zur Transmigration ins Gewebe angeregt [11]. Dies geschieht in

mehreren aufeinanderfolgenden Schritten. Zunächst entsteht eine reversible Bindung der Neutrophilen Granulozyten an das Endothel, welche durch P- und E-Selektine bedingt ist. Diese Phase wird auch als Rolling und Tethering bezeichnet. Anschließend entsteht eine durch Integrine (LFA-1, Mac-1) und intrazelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM1, ICAM2) vermittelte irreversible Bindung, die die Diapedese, also die transendotheliale Migration zur Folge hat [12]. Durch Chemo-, Neko- und Haptotaxis gelangen die Immunzellen schließlich an den Ort des entzündlichen Geschehens innerhalb des Gewebes [13].

### **2.1.2 Funktionen**

Dem angeborenen Immunsystem zugehörig spielen Neutrophile Granulozyten eine entscheidende Rolle in der frühen Immunantwort und sind dabei an vorderster Front an der direkten Bekämpfung von Bakterien, Pilzen und Protozoen beteiligt [14, 15]. Sind zu wenig Neutrophile Granulozyten in einem Organismus vorhanden, wie zum Beispiel bei einer erworbenen oder angeborenen Neutropenie, kommt es zu einer signifikanten Einschränkung der Immunabwehr [16]. Ebenso sind Neutrophile Granulozyten Teil des adaptiven Immunsystems und regulieren beispielsweise die T-Zell-Proliferation und Aktivierung [17]. Eine weitere wichtige Funktion besteht in der Regulation und Modulation von Entzündungsprozessen durch die Expression von Chemokinen (z.B. CXCL1, CXCL2), Cytokinen (IFN $\gamma$ , TNF, IL-4, and IL-10) und anderer humoraler inflammatorischer Mediatoren (z.B. Fc-Rezeptoren) [18-20]. Dabei wirken Neutrophile Granulozyten nicht nur pro- sondern auch antiinflammatorisch [21, 22]. Neuesten Erkenntnissen zur Folge beeinflussen Neutrophile Granulozyten mit diesen Mechanismen sowohl das Tumorwachstum als auch die Metastasierung bei malignen Erkrankungen [23, 24]. Weiterhin bewirken sie eine intensive bidirektionale Kommunikation mit anderen Immunzellen wie Makrophagen oder Dendritischen Zellen und modulieren so deren Aktivität [25].

Neutrophile Granulozyten verfügen über drei wichtige Wirkmechanismen. Dazu gehört die seit über 100 Jahren bekannte Phagozytose, im Rahmen derer Fremdkörper in die Zelle aufgenommen und anschließend im Phagolysosom zerstört werden [26]. Eine weitere, erst im Jahr 2004 entdeckte Funktion ist die Ausbildung von „Neutrophil Extracellular Traps“ (NETs) [27]. Dabei kommt es zu einer Freisetzung und netzartigen Anordnung von DNA-Stücken, in der Histone und verschiedene Enzyme verankert sind. Pathogene verfangen sich hierin und werden anschließend zerstört [28]. Der dritte Hauptmechanismus besteht in der Ausschüttung eines Arsenal von antimikrobiellen Proteinen, die die Elimination von Pathogenen unterstützen [29].

## 2.2 Granula Neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten transportieren eine Fülle schnell mobilisierbarer pro-inflammatorischer Substanzen [30]. Da diese Proteine zum Teil über ein hohes destruktives Potential verfügen, ist die präzise Regulation ihrer Freisetzung essenziell. Dies wird über die Speicherung der aktiven Substanzen in Granula erreicht [31]. Es handelt sich dabei um im Zytoplasma vorliegende, von einer Biomembran umgebene Hohlräume. Sie ermöglichen durch die Separation im Zellinneren einen sicheren Transport der hochpotenten Proteine [32]. Der Vorteil des Transports von bereits aktivierten Substanzen ist die Möglichkeit einer unmittelbaren und schnellen Reaktion auf Fremdkörper, die im Rahmen der unspezifischen Immunreaktion unabdingbar ist.

In Neutrophilen Granulozyten liegen vier Subtypen von Granula vor, azurophile, spezifische und Gelatinase-Granula sowie sekretorische Vesikel [33]. Sie werden während der Granulozytopoese gebildet und jeweils mit einer spezifischen Zusammensetzung an Proteinen beladen [34]. Azurophile Granula stellen die wichtigste Gruppe dar und enthalten eine Vielzahl an äußerst effektiven antimikrobiellen Proteinen [35]. Inhaltsstoffe der Gelatinase- und der spezifischen Granula ermöglichen die Migration im Gewebe, sekretorische Vesikel verfügen über Integrine, die die Rekrutierung von Neutrophilen aus den Blutgefäßen bedingen [4].

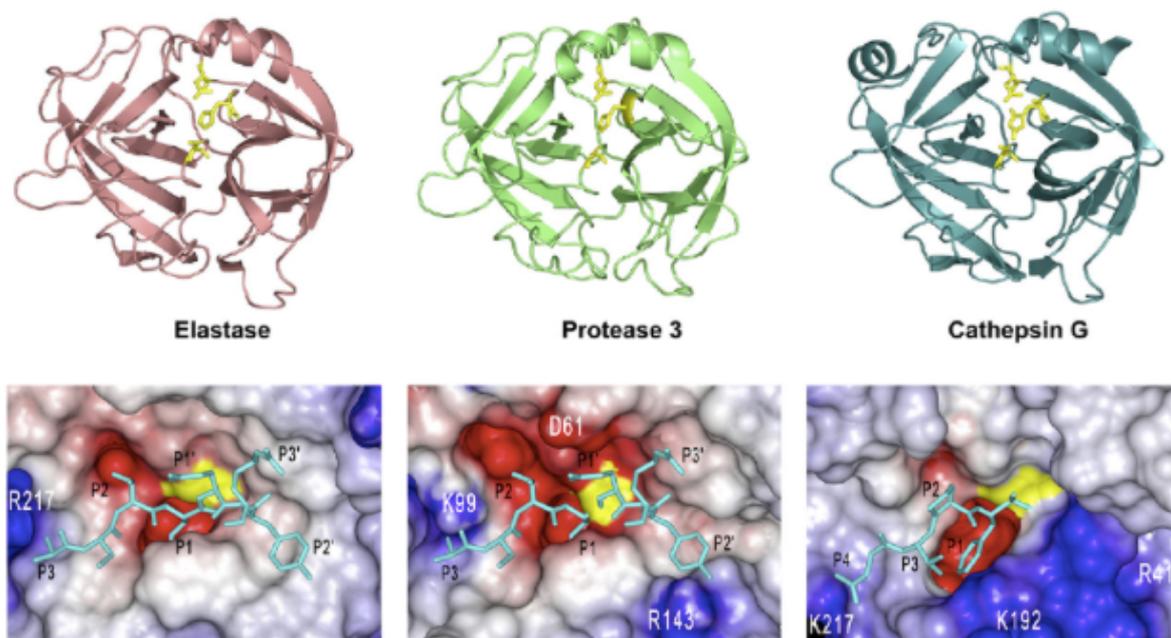
Kommt es zur Aktivierung der Neutrophilen Granulozyten, fusionieren die Granula mit Hilfe von  $Ca^{2+}$  abhängigen SNARE-Komplexen mit der Membran der Zellaußenwand oder des Phagolysosoms und es kommt zur Degranulation [14, 36].

## 2.3 Granula-assoziierte Serinproteasen der Immunabwehr

### 2.3.1 Allgemeines

Unter den in azurophilen Granula gespeicherten Effektorproteinen sind vier Serinproteasen, die zu den sog. „Granula-assoziierten Serinproteasen der Immunabwehr“ (GASPIDs) gezählt werden [37]. Es handelt sich dabei um die Neutrophilen Elastase (HNE), Proteinase 3 (PR3), Cathepsin G (CathG) sowie die erst 2012 entdeckte Neutrophilen Proteinase 4 (NSP4). Da die NSP4 bisher nur ansatzweise untersucht ist, die in Neutrophilen Granulozyten vorhandenen Mengen gering sind und Substrate, die eine Diskriminierung von den Gerinnungsproteasen mit einer ähnlichen tryptischen Substratspezifität erlauben nicht bekannt sind, wird in dieser Arbeit nicht weiter auf sie eingegangen. HNE, PR3 und CathG sind homologe, phylogenetisch und strukturell verwandte Hydrolasen aus der Familie der Endopeptidasen [38, 39]. Die Gene von HNE (*ELANE*) und PR3 (*PRTN3*) sind beide auf dem kurzen Arm des Chromosom

19p.13.3 verortet [40], während CathG (*CTSG*) auf Chromosom 14q11.2 codiert wird [41]. Die Anordnung in Clustern sowie der Vergleich der Primärstrukturen lässt Rückschlüsse auf den gemeinsamen evolutionären Ursprung zu [42]. Die in den letzten Jahrzehnten gewonnenen Erkenntnisse zur Struktur und zur proteolytischen Aktivität aller drei Proteasen wurden durch Korkmaz *et al.* ausführlich zusammengetragen [43]. So wird die Quartärstruktur von jeweils zwei homologen, aus sechs antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern bestehenden  $\beta$ -Fässern sowie einer C-terminalen  $\alpha$ -Helix gebildet (s. Abb. 2.2) [44-46]. Im Bereich der Verbindung der  $\beta$ -Fässer ist das aktive Zentrum lokalisiert, welches die sogenannte katalytische Triade enthält. Diese besteht aus dem namensgebenden Serin-, sowie einen Aspartat- und Histidin-Rest [47]. Diese Anordnung ermöglicht die Einleitung der hydrolytischen Spaltung durch einen nukleophilen Angriff auf die Carbonylgruppe von Peptidbindungen der jeweiligen Substrate. Die für die Substratspezifität maßgeblichen S1-Taschen werden im Allgemeinen durch Salzbrücken am Seitenast der ASP194-Reste gebildet. Die unterschiedlichen Spezifitätsprofile der drei Proteasen kommen durch die unterschiedliche Anordnung der S1-Tasche und von Oberflächenloops zustande.



**Abbildung 2.2: Dreidimensionale Strukturdarstellung der Granula-assoziierten Serinproteasen Neutrophiler Granulozyten nach [48]**

HNE, PR3 und CathG werden zunächst als inaktive Zymogene synthetisiert [49]. Erst nach der Abspaltung eines Signalpeptids durch die Signalpeptidase sowie der Abspaltung einer N-

terminalen Propeptidsequenz durch die Dipeptidylpeptidase I (Cathepsin C) im Golgi-Apparat liegen die Proteasen in ihrer aktiven Form vor [50, 51]. Dieser Mechanismus stellt eine effektive Möglichkeit der posttranslationalen Regulation dar [43]. Die Bildung und Speicherung der Proteasen findet ausschließlich während der Granulopoese statt; verlassen die Neutrophilen Granulozyten das Knochenmark weisen sie keine relevante Syntheseleistung mehr auf.

### **2.3.2 Elastase**

Die Neutrophilen-Elastase (HNE) ist die wohl potenteste und am häufigsten untersuchte Serinprotease Neutrophiler Granulozyten [52]. Sie besteht aus 218 Aminosäuren, hat eine molekulare Masse von etwa 30 kDa und wurde im Jahr 1968 durch Janoff und Scherer erstmals beschrieben [53, 54]. Außer in polymorphkernigen Leukozyten wird sie auch in Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen exprimiert, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß. Durch die Fähigkeit, das unlösliche Strukturprotein Elastin zu spalten unterscheidet sie sich von den meisten anderen Proteasen. Eine Voraussetzung hierfür ist die Substratspezifität der Protease, die Valin-, Cystein-, Alanin- oder Serin-Reste an der P1-Position und Prolin-Reste an der P2-Position präferiert [48, 55]. Ihre katalytische Effizienz ist im leicht basischen Bereich (pH 8-8,5) am größten. Die Regulation der enzymatischen Aktivität erfolgt durch die Plasmainhibitoren  $\alpha_1$ -PI ( $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor) und  $\alpha_2$ -Makroglobulin und Gewebeinhibitoren wie SLPI (Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor) und Elafin [48, 56].

### **2.3.3 Proteinase 3**

Die Proteinase 3 (PR3), auch Myeloblastin genannt, wurde 1989, also 20 Jahre nach der HNE durch Baries *et al.* im Rahmen von Untersuchungen zur Promyelozyten-Leukämie entdeckt [57]. In ihrer Struktur ist die PR3 mit 222 Aminosäuren etwas länger als die HNE, sie zeigt die beste katalytische Effizienz bei neutralen pH-Werten um 7 [58]. Die PR3 wird wie die HNE in Neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert, zudem sind sie auch in Basophilen Granulozyten und Mastzellen nachgewiesen worden [59]. Die Substratspezifitäten von HNE und PR3 sind sehr ähnlich, jedoch bevorzugt die PR3 kleine aliphatische Reste an der P1-Position der Substrate, was durch die im Vergleich kleinere und weniger hemisphärisch geformte S1-Tasche bedingt ist [45]. Bedeutende endogene Inhibitoren der PR3 sind  $\alpha_1$ -PI aus der Gruppe der Serpine und Elafin aus der Familie der Chelone. Im Gegensatz zur HNE wird die PR3 nicht durch SLPI inhibiert [48].

### 2.3.4 Cathepsin G

Cathepsin G ist die dritte der Granula-assoziierten Serinproteasen in Neutrophilen Granulozyten und wurde von Starkey und Barrett im Jahr 1976 identifiziert [60]. Sie besteht aus 235 Aminosäuren und wird von Neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Mastzellen exprimiert. Ihre strukturellen Eigenschaften entsprechen weitgehend denen der HNE und PR3, wobei eine 35%ige Sequenzidentität besteht [61]. Das pH-Optimum liegt wie bei der HNE bei 8 [62]. Unterschiede zu den beiden anderen Proteasen bestehen in der Genlokalisierung und Substratspezifität. CathG liegt dabei getrennt von HNE und PR3 in einem Cluster mit der Mastzell-Chymase und verschiedenen Lymphozyten-Granzymen [63]. CathG unterscheidet sich von den anderen beiden Proteasen durch eine deutlich geringere Selektivität. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die CathG über eine Zweiteilung der S1-Tasche und damit eine duale Substratspezifität verfügt [55]. Präferierte Aminosäuren an der P1-Position sind aromatische und basische Aminosäuren wie Phenylalanin, Tryptophan und Lysin. An der P2 Position bevorzugt die Protease analog der HNE Prolin-Reste [48]. Zu den Hemmstoffen gehören  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin,  $\alpha_1$ -PI, Eglin C und der Limabohnen-Trypsin-Inhibitor [64]. Intrazelluläres PI6 führt zur Inaktivierung von akzidentell aus Granula freigesetztem CathG [65].

### 2.3.5 Aktivierung durch Cathepsin C

Die Dipeptidylpeptidase I, auch als Cathepsin C bezeichnet, ist eine lysosomale Cystein-Exopeptidase und der Papain-Proteasen-Familie zu zuordnen. Ihre Entdeckung erfolgte im Jahr 1948 durch die Wissenschaftler Gutman und Fruton [66]. Als inaktives Zymogen synthetisiert wird sie durch die Abspaltung eines Propeptids aktiviert [67]. Als einzige der Cathepsine zeigt sie einen tetrameren Aufbau aus 4 Monomeren, die jeweils aus einer schweren, einer leichten Kette und einer „Exclusion-Domain“ bestehen [68]. Die schweren Ketten beinhalten jeweils das aktive Zentrum mit der katalytischen Diade (Cys234 und His381). Ihre enzymatische Aktivität besteht in der Abspaltung von N-terminalen Dipeptiden [69]. CathC hat eine breite Substratspezifität, da die S1-Tasche für große und hydrophobe Aminosäurereste geeignet ist [70]. Cath C wird vornehmlich in der Lunge, Milz und Niere exprimiert [71]. Eine wichtige Funktion ist die Aktivierung der Granula-assoziierten Serinproteasen in Neutrophilen Granulozyten, Mastzellen, zytotoxischen T-Zellen und Natürlichen Killerzellen [72].

### 2.3.6 Regulation und Funktionen

Die proteolytische Aktivität der GASPIDs wird primär nicht wie die der meisten anderen Proteasen durch die Zymogen-Aktivierung, sondern durch die Speicherung in Granula und Degranulation reguliert. Innerhalb der Granula verhindern die Bindung an kationische Proteoglykane [73, 74] sowie eine hohe Packungsdichte der Enzyme die enzymatische Aktivität effektiv. Die klassische Inhibition durch endogene intra- und extrazelluläre Hemmstoffe trägt zusätzlich zur Kontrolle der proteolytischen Aktivität bei. Diese entstammen den Inhibitor-Familien der Serpine, Chelone und Makroglobuline und blockieren die aktiven Zentren der Proteasen reversibel oder irreversibel [75-77].

Die Funktionen der GASPIDs sind äußerst vielfältig und schließen insbesondere die Erregerabwehr und Inflammationsregulation ein. Wohl am längsten bekannt ist das ausgeprägte antimikrobielle Potential, welches sie durch direktes Abtöten von Bakterien entfalten [78]. Intrazellulär geschieht dies, indem die Granula mit dem Phagolysosom verschmelzen, wobei alle drei Proteinase freigesetzt werden und sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien abtöten können [79]. Weiterhin sind die Proteasen Teil eines wichtigen extrazellulären Abwehrmechanismus, den sogenannten Neutrophil extracellular Traps (NETs), einem aus DNA-Bruchstücken bestehenden Netzes, in welchem sich Erreger verfangen [27]. Dieses ist reichlich mit Proteasen besetzt, die so direkt verschiedene bakterielle Virulenzfaktoren (z.B. Flagellin durch HNE und CathG) [80, 81] oder Bakterienmembran-assoziierte Proteine (z.B. OmpA durch HNE) [82] spalten und so inaktivieren. Die HNE spaltet insbesondere eine Reihe von Virulenzfaktoren (z.B. SipA, YopB) der Gruppe der Enterobacteriaceae [81]. Darüber hinaus aktiviert PR3 das antibakterielle Transportprotein Cathelicidin (hCAP18 bzw. LL-37), das seinerseits über verschiedene antimikrobielle Eigenschaften wie z.B. der Elimination von Biofilmen verfügt [83, 84].

Eine weitere wichtige Rolle kommt den GASPIDs innerhalb der Regulation und Modulation der angeborenen Immunantwort zu [85, 86]. Entzündungsvorgänge werden durch die Prozessierung verschiedener Chemokine (z.B. CXCL12 durch HNE, CXCL 8 durch PR3), Zytokine (z.B. TNF- $\alpha$  durch PR3) und Interleukine (z.B. IL-2, IL-2-R $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12-p40 durch HNE; IL- $\beta$ , IL8, IL18 und IL 32 durch PR3) moduliert und so die Migration und Kommunikation weiterer Immunzellen induziert [87-89]. Die Spaltung von Transmembranproteinen wie dem Toll-like-Rezeptor 4 durch PR3 hat die Expression und Ausschüttung weiterer inflammatorischer Proteine (z.B. CXCL8) zur Folge [90]. Selbige Wirkung hat die Prozessierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren PAR1 und -2 durch HNE und PR3 [91, 92].

Das Wirkspektrum der GASPIDs reicht allerdings noch deutlich weiter. Beispielsweise wirkt PR3 durch die Spaltung von NF $\kappa$ B und der Procaspase 3 als einzige der drei Proteasen proapoptotisch und kann so durch die Elimination von Entzündungszellen antiinflammatorisch wirken [93, 94]. CathG ist hingegen in der Lage, den Rezeptor PAR-4 auf Thrombozyten zu prozessieren und damit deren Aktivierung und Aggregation zu induzieren [95]. Kontrovers wird diskutiert, ob die Induktion der NET-Bildung durch proteolytische Degradation von Chromatin durch HNE im Zellkern bedingt sein könnte [96, 97]. Darüber hinaus existieren Hinweise auf zahlreiche weitere Funktionen wie z.B. die Inaktivierung von antiinflammatorischen Signalstoffen (z.B. Progranulin) [88] oder die Beeinflussung der Anordnung des Zytoskeletts von Neutrophilen Granulozyten [98], deren vollumfängliche Darstellung jedoch den Rahmen dieser Arbeit übersteigen würde.

### **2.3.7 Pathophysiologie**

Im physiologischen Zustand wird die proteolytische Aktivität der GASPIDs durch die zuvor beschriebenen Mechanismen eng reguliert und so die übermäßige Spaltung von Funktions- und Strukturproteinen (z.B. Beispiel Kollagen) verhindert [99]. Kommt es zu einer Dysbalance dieses Gleichgewichts sind verschiedene akute und chronische Erkrankungen die Folge. In diesem Zusammenhang sind vor allem zwei häufige Erkrankungen des respiratorischen Systems, das Akute Lungenversagen (ARDS) [100, 101] und die Chronische obstruktive Lungenerkrankung (COPD) [102] zu nennen. In beiden Fällen kommt es zu einer überschießenden Immunantwort mit der Ansammlung und Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten. Die in der Erregerabwehr nützlichen und hochwirksamen, aber auch zytotoxischen Effektoren, zu denen die GASPIDs gehören, entfalten ihr destruktives Potential in diesem Fall gegen körpereigene Strukturen.

Im Rahmen des ARDS kommt es nach der Auslösung der Entzündungsreaktion zu einer massiven Neutrophilen-Invasion und Freisetzung von Mengen von GASPIDs, die die der Antiproteasen übersteigen. Durch die deshalb unkontrollierte proteolytische Aktivität der GASPIDs kommt es zur Destruktion des Endothels und zu mikrovaskulären Schäden, so dass sich proteinreiche Ödeme in den Alveolen ausbilden [103, 104]. Zusätzlich entstehende reaktive Sauerstoffspezies führen durch Inaktivierung von Proteaseinhibitoren zu einer Verstärkung der Auswirkungen der GASPIDs [43]. Weiterhin induziert die HNE eine deutlich vermehrte Expression und Ausschüttung von Zytokinen und Muzinen [105]. Im Verlauf kommt es so zu einer zunehmenden Reduktion der alveolokapillären Permeabilität und einer fortschreitenden respiratorischen Insuffizienz. Insgesamt stellt das ARDS ein hochakutes Krankheitsbild mit schlechter Prognose dar [106].

Der Entwicklung einer COPD liegt eine langjährige Exposition gegenüber Noxen wie Tabakrauch oder aber ein funktioneller Mangel des Inhibitors  $\alpha_1$ -PI zu Grunde [107, 108]. Erstere löst eine chronische Entzündungsreaktion aus, in deren Rahmen Neutrophile Granulozyten von residenten Makrophagen chemotaktisch angelockt werden und anschließend Serinproteasen freisetzen [109, 110]. Liegt eine hereditäre verminderte Expression oder eine Strukturvariante von  $\alpha_1$ -PI vor, fällt die schützende Inhibition der GASPIDs, insbesondere der HNE und PR3 weg. In beiden Fällen führt die unkontrollierte proteolytische Aktivität zur Zersetzung der Extrazellulärmatrix des Lungengerüsts, wobei gleichzeitig proinflammatorische Mediatoren freigesetzt werden [111]. Weiterhin werden auch hier Muzine (z.B. MUC5AC) übermäßig exprimiert [112]. Eine Obstruktion der Atemwege sowie eine gestörte Ventilation durch die Abnahme des funktionellen Lungengewebes sind die Folge [113].

Während die Entstehung des ARDS und der COPD auf die durch eine Protease-Antiprotease-Dysbalance bedingte übermäßige Aktivität der GASPIDs zurückgeführt wird, handelt es sich bei der ANCA-assoziierten Vaskulitis - einer weiteren bedeutenden GASPID-assoziierten Pathologie - um eine Autoimmunerkrankung. Hierbei kommt es zur Bildung von zytoplasmatischen Antikörpern gegen Epitope der PR3. Die Folge ist die übermäßige Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten, deren Effektoren eine nekrotisierende Entzündung der kleinen und mittelgroßen Gefäße hervorrufen [114, 115]. Weiterhin sind die GASPIDs maßgeblich an inflammatorischen Prozessen weiterer Krankheiten wie z.B. der Cystischen Fibrose [116] oder der Rheumatoiden Arthritis [88] beteiligt.

Auf die Pathophysiologie von CathC soll hier nicht im Detail eingegangen werden. Jedoch ist nennenswert, dass es durch eine Funktionsstörung von CathC und damit einer verminderten Aktivierung von HNE, PR3 und CathG zu Erkrankungen wie z.B. dem Papillon-Lefèvre oder dem Haim-Munk-Syndrom bzw. der Präpubertalen Peridontitis kommt [117-119]. Auf Grund der Schlüsselfunktion in der Aktivierung der GASPIDs stellt CathC eine interessante therapeutische Zielstruktur dar. Bisher entwickelte Inhibitoren konnten sich auf Grund mangelnder Stabilität und ungenügenden pharmakokinetischen Eigenschaften bisher nicht klinisch durchsetzen [120]. Vielversprechend zeigte sich zuletzt der Inhibitor Brensocatib (INS 1007) [121].

## 2.4 Quantifizierung der GASPIDs und von Cathepsin C

### 2.4.1 Methoden

Eine Reihe von Methoden ist prinzipiell geeignet, Proteasen wie die GASPIDs und CathC nachzuweisen bzw. zu quantifizieren. Grundsätzlich ist dies auf der Ebene der Genexpression/mRNA z.B. mittels PCR, des Proteins z.B. mittels Immunoassay oder der enzymatischen Aktivität z.B. mittels Substraten und Aktivitäts-basierten Sonden möglich. Der Nachweis der mRNA und damit der Genexpression mittels Polymerase-Kettenreaktion stellt einen technisch einfachen Ansatz dar. Das Ergebnis gibt jedoch keine Auskunft darüber, ob das Protein jemals translatiert, in seine aktive Form prozessiert und biologisch relevant wird [122, 123]. Mittels mono- oder polyklonaler Antikörper, die an visualisierbare Elemente gekoppelt sind, kann mit Immunoassays (z.B. ELISA oder Westernblot) der Gehalt eines spezifischen Proteins in Analyten detektiert werden. Dieses Verfahren stellt ebenfalls eine einfach handhabbare Methode dar, da Antikörper und z.T. Kit-Systeme kommerziell verfügbar sind. Eine entscheidende Limitation hierbei ist jedoch in der Regel die fehlende Diskriminierung zwischen der enzymatisch aktiven Protease und inaktiven Formen wie dem Zymogen oder der durch einen Inhibitor gehemmten Protease [124, 125].

Die enzymatische Aktivität wird in der Regel mit chromo- oder fluorogenen Peptidsubstraten oder FRET-Substraten bestimmt [126-129]. Peptidsubstrate sind üblicherweise aus 3-4 Aminosäuren bestehende Peptidketten, die mit einer Schutzgruppe zur Verhinderung unerwünschter Spaltung sowie einer Detektionsgruppe (*p*-Nitroanilin bzw. Amino-Methyl-Coumarin) versehen sind [130]. Die Aminosäuresequenz der Peptidketten wird entsprechend der Spezifität des Enzyms gewählt [48, 131]. Die mittels Photo- bzw. Fluorimeter quantifizierbare pro Zeiteinheit freigesetzte Detektionsgruppe bildet die enzymatische Aktivität ab [132]. Einem etwas anderem Prinzip folgen die sogenannten FRET-Substrate (Förster-ResonanzenergieTransfer) [133-135]. Hier kommt es durch die Spaltung einer Peptidbindung des Substrats zu einer Reduktion des hemmenden Einflusses eines Quenchers und konsekutiv zu einem messbaren Anstieg der Fluoreszenz. Da die Spaltstelle in diesen Substraten zentral und nicht C-terminal liegt, kann durch die Wahl von zwei Protease-spezifischen flankierenden Aminosäuresequenzen eine Zunahme der Spezifität erreicht werden [136]. Alle Substrate eignen sich für den Einsatz in klassischen enzymkinetischen Assays, innerhalb derer enzymatische Spaltung unter definierten Reaktions-Bedingungen (pH, Temperatur, Analyt-Konzentrationen) über die Zeit beobachtet wird [137, 138].

Eine weitere Entwicklung, die derzeit mit großem Interesse verfolgt wird und *in vivo* bzw. *in cellulo* Aktivitätsbestimmung ermöglicht, sind sog. „Aktivitäts-basierte Sonden“. Diese

bestehen typischerweise aus einer reaktiven Gruppe, einer Reporter-Gruppe, sowie einem hydro- oder lipophilen Linker [139-141]. Die reaktive Gruppe entspricht dabei einem selektiven Inhibitor, der eine kovalente irreversible Bindung mit dem aktiven Zentrum des Enzyms eingeht [142]. Die sogenannte „Reporter-Gruppe“ enthält Signalelemente wie z.B. Fluorophoren (Fluorescein, Rhodamin [143], BODIPY [144]) oder Biotin. Nach der Bindung der reaktiven Gruppe an ein Enzym kann dieses visualisiert werden [145]. Der entscheidende Vorteil dieser Methode stellt der modulare Aufbau dar, der die Verwendung einer Vielzahl von Reporter-Gruppen möglich macht. Der Nachweis der Proteasen kann so mit unterschiedlichsten Techniken, wie z.B. dem In vivo Imaging oder der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie erfolgen. Andererseits birgt auch diese Methode Limitationen. Allen voran ist hierbei die im Vergleich zur Quantifizierung mit Peptidsubstraten deutlich verminderte Sensitivität zu nennen. Während ein Enzym jeweils nur mit einer einzigen Sonde interagieren kann, kann dieses im gleichen Beobachtungszeitraum eine Vielzahl an Substratmolekülen spalten. Darüber hinaus ist es problematisch, intrazelluläre Sonden, die nicht an aktive Proteasen binden, abzureichern, sodass es zur Verfälschung des gemessenen Signals kommen kann [146].

#### **2.4.2 Anwendungsbeispiele**

Unter Verwendung der beschriebenen Methoden sind seit den 70-er Jahren einzelne oder auch Kombinationen von mehreren GASPIDs in einer Reihe von Studien quantifiziert worden (s. Tab. 2.1). Die Mehrzahl dieser Arbeiten adressiert dabei die extrazellulären, durch Degranulation bereits sezernierten Proteasen in vielfältigen biologischen Matrices (z.B. Serum, Wundflüssigkeit, uvm.). Einzelne Arbeiten beschäftigen sich zudem mit dem Nachweis auf Zelloberflächen [136]. In diesen Arbeiten wurden überwiegend einzelne oder zwei Proteasen simultan quantifiziert. Unter anderem wurde HNE in Kombination mit PR3, CathG oder CathC, sowie PR3 gemeinsam mit der CathG bestimmt [147-149]. In einer umfassenden, aber naturgemäß limitierten Literaturrecherche fand sich zum Zeitpunkt der experimentellen Durchführung lediglich eine Arbeit, in der alle drei GASPIDs gleichzeitig untersucht wurden. Unter Verwendung von Aktivitäts-basierten Sonden gelang Kasperkiewicz *et al.* die Quantifizierung der intrazellulären Mengen der GASPIDs [125, 150]. In keiner Arbeit wurden jedoch bisher die drei GASPIDs in Kombination mit CathC bestimmt.

Am häufigsten wurden für den Nachweis klassische immunologische Nachweisverfahren genutzt, seltener kamen Substrate oder Sonden zum Einsatz. Eine aktivitätsbasierte Bestimmung der intrazellulären Mengen aller drei GASPIDs und von CathC in zirkulierenden Granulozyten und damit die Untersuchung der enzymatischen Ausstattung der Zellen wurde durch andere Arbeitsgruppen bisher nicht versucht.

<b>Studie</b>	<b>Nachweismethode</b>	<b>Nachweismedium</b>	<b>Protease(n)</b>
Campbell, E.J. et al; 1989 [147]	ELISA	Intrazellulär	HNE, CathG
Witko-Sarsat, V. et al, 1999 [151]	ELISA	Intrazellulär	PR3, CathG
Campbell, E.J. et al; 2000 [152]	ELISA	Intrazellulär	PR3
Attucci S. et al; 2002 [153]	FRET-Substrate	Zelloberfläche	CathG
Hashimoto, S. et al; 2008 [154]	Chromogenes Substrat	Plasma	HNE
Hasmann, A. et al; 2011 [148]	Chromogenes Substrat	Wundflüssigkeit	HNE, CathG
Mantyla, P. et al; 2012 [155]	Chromogenes Substrat	Speichel	HNE
Turkoglu, O. et al; 2014 [149]	ELISA	Gingivale Crevicularflüssigkeit	HNE, CathC
Kasperkiewicz P. et al; 2017 [125]	Aktivitäts-basierte Sonden	Intrazellulär	HNE, PR3, CathG
Liu, H. et al; 2017 [156]	ELISA	Serum	PR3
Choi S.R. et al; 2018 [157]	ELISA	Zervikalsekret	HNE
Cagnone, M. et al; 2019 [158]	Chromogene Substrate	Bronchoalveoläre Lavage	HNE, PR3
Thulborn, S. et al; 2019 [159]	ELISA	Sputum	HNE
Ferdous, M. et al; 2020 [123]	PCR	Vollblut	HNE
Barry, R. et al; 2019 [160]	Fluorogenes Substrat	Stuhl	HNE
Patterson, E. K. et al; 2021 [161]	ELISA	Plasma	HNE, PR3
Liu, Y. et al; 2022 [162]	ELISA, Chromogenes Substrat	Serum	HNE
McElvaney, O.F. et al; 2022 [163]	Western Blot, Chromogenes Substrat	Plasma, Bronchialgew., Trachealsekret	HNE

**Tabelle 2.1: Auswahl von Publikationen, in denen eine oder mehrere GASPIDs quantifiziert wurden.**

## 2.5 Ziele und Vorgehensweise

Die GASPIDs Neutrophiler Granulozyten HNE, PR3 und CathG werden während der Granulopoese gebildet und in aktiver Form in den Granula gespeichert. Da zirkulierende Neutrophile Granulozyten keine weitere relevante Syntheseleistung aufweisen, verfügen sie also über ein begrenztes Repertoire.

Es existieren zahlreiche Arbeiten zur Quantifizierung der immunologisch nachweisbaren Mengen, aber auch der Aktivität der GASPIDs in extrazellulären Medien wie Wundflüssigkeit, Speichel oder Plasma. Dagegen sind die intrazellulären Mengen entweder nur anhand von einzelnen Proteasen oder durch die Anwendung von Aktivitäts-basierten Sonden untersucht worden. Simultan und unter der Verwendung von klassischen enzymkinetischen Assays wurden die intrazellulären Mengen aller drei Proteasen und ihres Aktivators Cathepsin C bisher noch nicht bestimmt.

In dieser Arbeit sollten daher kommerzielle Peptid- und FRET-Substrate anhand von isolierten Proteasen und Lysaten humaner Neutrophiler Granulozyten für den Einsatz zur Mengenbestimmung mittels enzymkinetischer Assays validiert werden. Anschließend sollte die Methodik hinsichtlich der Verwendung geringer Probenvolumina optimiert werden. Mit der entwickelten Methodik sollten alle vier Proteasen in einer Kohorte gesunder Probanden quantifiziert sowie die Messungen in Bezug auf Störfaktoren und den Zusammenhang zu anderen zellulären Markern geprüft werden.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
<i>Mikroskope</i>	
Axioskop	Zeiss, Oberkochen
Olympus IMT-2	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
<i>Zentrifugen</i>	
Centrifuge 5424 R	Eppendorf AG, Hamburg
Varifuge 3.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode
Rotofix 32 mit Zyto-Rotor	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen
Mikrozentrifuge Perfect Spin Mini	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
<i>Kühlschränke und Gefriergeräte</i>	
-80°C HERAfreeze HFU T Series	Thermo Fisher Scientific, Asheville, USA
Kühl-Gefriergerät KGE 3613	Bosch, Stuttgart
Gefriergerät LGex 3410 MediLine	Liebherr, Biberach a. d. Riß
Gefriertruhe GTS 6112	Liebherr, Biberach a. d. Riß
Autoklav LTA 400	Zirbus, Bad Grund
Trockenschrank Kelvitron T	Haeureus, Hanau
Eismaschine AF 10	Scotsman, Vernon Hills, USA
CASY-1-Zellzählgerät	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Sicherheitswerkbank SterilGard	The Baker Company, Sanford, USA
Kreisschüttler KS 250 B	IKA-Werke GmbH und CO. KG, Staufen
Thermomixer Comfort 5355	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer C 5382	Eppendorf AG, Hamburg
MS1 Minishaker	IKA-Werke GmbH und CO. KG, Staufen
RCT Basic-Magnetrührer	IKA-Werke GmbH und CO. KG, Staufen
WTW InoLab pH Level 2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Präzisionswaage Modell 2842	Sartorius, Göttingen
MACSiMAG Separator	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach
Multimode-Mikroplatten-Reader "Saphire"	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Multimode-Mikroplatten-Reader "Spark"	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Heißluftgebläse Typ EKP - 0016	AEG, Berlin
Pipetten (Ein- u. Mehrkanal)	Eppendorf, Hamburg
Laborprobentransportbox	Sarstedt AG & Co. KG, Nürmbrecht

### 3.1.2 Verbrauchsmaterial

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Pipettenspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (1,5 & 5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Schraubröhrchen (25 & 50 ml)	Eppendorf, Hamburg
Original Perfusor Spritze 50 ml (8728810F-06)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritzenvorsatzfilter Whatman FP 30/0.2 CA-S	GE Healthcare, Solingen
CASY Cups	OMNI Life Science GmbH und Co KG, Bremen
SuperFrost Plus Menzel Gläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Zyto-System für RotoFix 32	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen
Monovette EDTA 9 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nürmbrecht
Monovette Lithium-Heparin 9 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nürmbrecht
Multiwellplatte Costar Assay Plate, schwarz, flacher Boden, 96-Well	Corning Inc, Kennebunk, USA
Multiwellplatte BRANDplates, pureGrade, transparent, flacher Boden, 96-Well	Brand GmbH und CO KG, Wertheim
Kimtech Science Präzisionstücher	Kimberly-Clark, Dallas, USA

### 3.1.3 Puffer und Lösungen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (+/- MgCl <sub>2</sub> und CaCl <sub>2</sub> )	137 mM NaCl; 2,89 mM KCl; 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O; 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (+/- 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> und 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) bezogen von Sigma-Aldrich, Steinheim
CASYton	OMNI Life Science GmbH und Co KG, Bremen
Lysepuffer (LP)	100 mM Tris-HCl; 1 M NaCl, 0,1% Tween; 0,01 % Na-Azid; pH 7,4

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Assaypuffer 1 (AP1)	100 mM Tris-HCl; 1 M NaCl; 0,01% Tween; 0,01 Na-Azid; pH 7,5
Assaypuffer 2 (AP2)	25 mM MES; 50 mM NaCl; Brij 35 0,01%; pH 6,0; + 5 mM DTT
Neutrophilen-Resuspensionspuffer	PBS mit MgCl <sub>2</sub> und CaCl <sub>2</sub> + Glucose (1 g/l)

Lysepuffer und Assaypuffer wurden mit destilliertem Wasser hergestellt und vor der Zugabe von Tensiden mittels Spritzenvorsatzfilter filtriert. Im Assaypuffer 2 wurde DTT erst unmittelbar vor der Verwendung hinzugegeben.

### 3.1.4 Enzyme

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Humane Neutrophilen Elastase	Sigma Aldrich by Merck KGaA, Darmstadt
Humane Proteinase 3	Elastin Products Company Inc., Owensville, USA
Bovines Cathepsin C	Sigma Aldrich by Merck KGaA, Darmstadt
Humanes Cathepsin G	Athens Research & Technology Inc., Athens, USA

### 3.1.5 Substrate und Fluoreszenz-Standards

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
7-Amino-4-methylcoumarin (AMC)	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MeoSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Suc-Val-Pro-Phe-pNA	Bachem, Bubendorf, Schweiz
H-Gly-Arg-AMC	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Abz-Val-Ala-Asp-Nva-Arg-Asp-Arg-Gln-EDDnp	Pepta Nova GmbH, Sandhausen

### 3.1.6 Inhibitoren

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
HR-57	Prof. N. Schaschke, Universität Aalen
Sivelestat	Sigma Aldrich by Merck KGaA, Darmstadt
Aprotinin	Sigma Aldrich by Merck KGaA, Darmstadt
Alvelestat (AZD9668)	MedChemExpress, Sollentuna, Schweden

### 3.1.7 Labor-Kits

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
MACSxpress Whole blood Neutrophil Isolation-Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Quant-It Pico Green dsDNA Assay-Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Micro BCA Protein Assay-Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Human S100A8/S100A9 Heterodimer Quantikine ELISA-Kit	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
MPO ELISA-Kit	Abcam, Cambridge, UK
Haema-Schnellfärbung/Diff-Quick	Eberhard Lehmann GmbH, Berlin

### 3.1.8 Software

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Office 365	Microsoft, Redmond, USA
ProFit Version 7	Quantum Soft, Uetikon am See, Schweiz
Prism Version 8	GraphPad Software, San Diego, USA
R Version 4	The R Foundation, Indianapolis, USA

Alle hier nicht separat aufgeführten Standard-Reagenzien wurden von den Herstellern Merck KGaA (Darmstadt), Sigma Aldrich (Steinheim) bzw. Gerbu Biotechnik GmbH (Heidelberg) bezogen.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Grundlagen enzymkinetischer Assays

Die enzymatische Aktivität von Proteasen wurde mittels klassischer kontinuierlicher kinetischer Assays quantifiziert. Dafür wurde die Protease unter optimierten Bedingungen bei 37 °C mit einem jeweils spezifischen fluorogenen, chromogenen oder FRET-Peptidsubstrat inkubiert. Die Abspaltung der fluorogenen (AMC) bzw. chromogenen ( $pNA$ ) Detektionsgruppe und der daraus resultierende Anstieg der Fluoreszenz bzw. Absorption wurde mit einem Multimode-Mikroplatten-Reader (Sapphire bzw. Spark, Tecan) über die Dauer von einigen Minuten verfolgt. Im Falle der FRET-Substrate führt die enzymatische Spaltung des Substrats zu einer Abnahme des intramolekularen Quenchings und in der Folge ebenfalls zu einer Zunahme der Fluoreszenz. Die Substratkonzentration sollte hierbei so gewählt werden, dass sie - sofern es Löslichkeit und Verfügbarkeit erlauben - weitestmöglich über der entsprechenden Michalis-Menten-Konstante ( $k_m$ ) liegen. So kann man näherungsweise von Sättigungsbedingungen ausgehen, und verhindern, dass der Substratverbrauch die Reaktion einschränkt. Unter der Annahme, dass



gilt, entspricht die Änderung der Fluoreszenz bzw. Absorption pro Zeiteinheit (RF/min bzw. OD/min) der Bildung von [P] und ist damit ein Maß für die enzymatische Aktivität der Proteasen.

### 3.2.2 Aktivitäts- und Mengenbestimmung

Zur Vorbereitung der Assays wurden isolierte Proteasen als Enzymstandards in 10 bzw. 20-facher Konzentration verdünnt. Zuvor hergestellte Zelllysate wurden aufgetaut und auf eine Konzentration von 1000 bzw. 100 Zellen/ $\mu l$  (PR3-Assay) eingestellt. Proteasen sowie Zelllysate wurden bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Anschließend wurden Peptidsubstrate (s. Tab. 3.1) im entsprechenden Assaypuffer verdünnt (1,1- bzw. 1,05-fache der Endkonzentration) und lichtgeschützt bei 37 °C gelagert. 10 bzw. 20  $\mu l$  der Proben/Lysate oder Standards wurden in temperierten (37 °C) 96-Well-Mikrotiterplatten mit flachem Boden vorgelegt (s. Tab. 3.2). Im Anschluss wurde mit Hilfe einer Multi-Kanal Pipette die Substrat-Puffer Mischung ad 200  $\mu l$  hinzugegeben, wobei auf zügiges Arbeiten geachtet wurde. Unmittelbar danach wurde die Messung im Multimode-Mikroplatten-Reader "Sapphire" gestartet. Dabei wurden für die jeweiligen Assays spezifische Messeinstellungen verwendet (s. Tab. 3.3). Alle Messungen erfolgten in technischen Triplikaten. Als Kontrolle wurde Assaypuffer mit und ohne zugesetztem Substrat mitgeführt.

Assay	Substrat	Kcat/Km [1/Ms]
HNE	MeoSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC (MeoSuc-AAPV-AMC)	3,24 x 10 <sup>4</sup>
PR3	Abz-Val-Ala-Asp-Nva-Arg-Asp-Arg-Gln-EDDnp (FRET-K)	4.79 x 10 <sup>4</sup>
CathG	Suc-Val-Pro-Phe-pNA (Suc-VPF-pNA)	4,18 x 10 <sup>4</sup>
CathC	H-Gly-Arg-AMC (H-GA-AMC)	1,60 x 10 <sup>6</sup>

**Tabelle 3.1: Verwendete fluorogene, chromogene und FRET- Peptidsubstrate.**

Die Angaben für die jeweilige katalytischen Effizienz (Kcat/Km) wurden den Herstellerangaben entnommen.

Assay	Standard/Probe	Substrat-Puffer Mischung
HNE	10 $\mu$ l HNE (1 nM) bzw. Lysat (10.000 Zellen/200 $\mu$ l)	190 $\mu$ l MeoSuc-AAPV-AMC in AP1 (10 $\mu$ M)
PR3	20 $\mu$ l PR3 (0,5 nM) bzw. Lysat (2000 Zellen/200 $\mu$ l)	180 $\mu$ l FRET-K in AP1 (10 $\mu$ M)
CathG	20 $\mu$ l CathG (2,5 nM) bzw. Lysat (20.000 Zellen/200 $\mu$ l)	180 $\mu$ l Suc-VPA-pNA in AP1 (200 $\mu$ M)
CathC	20 $\mu$ l CathC (1 nM) bzw. Lysat (20.000 Zellen/200 $\mu$ l)	180 $\mu$ l H-GA-AMC in AP2 (10 $\mu$ M)

**Tabelle 3.2: Pipettierschema für die Durchführung der Aktivitätsmessung mit den verschiedenen Assays.**

Es sind jeweils die Endkonzentrationen im Test angegeben.

Assay	Exzitation	Emission	Absorption	Zyklen (Messdauer)
HNE, CathC	360 nm	465 nm	-	30 (12 min)
PR3	320 nm	420 nm	-	50 (14 min)
CathG	-	-	405 nm	50 (10 min)

**Tabelle 3.3: Einstellung des Multimode-Mikroplatten-Readers "Saphire".**

Ausgehend von der Änderung der Fluoreszenz bzw. Absorption über die Zeit (RF/min bzw. OD/min) wurde mithilfe eines simultan auf jeder Mikrotiterplatte bestimmten Fluoreszenz-

standards (0-0,5  $\mu\text{M}$  AMC) bzw. des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Konzentration des Produkts und damit der Prozentsatz des gespaltenen Substrats bestimmt. Die graphische Darstellung und Auswertung erfolgte mit einem laborintern entwickelten Computerprogramm (Profit, C. Sommerhoff V.2.0.).

Für die Mengenbestimmung in den Zelllysaten wurde zunächst die Aktivität pro nM Protease anhand der mitgeführten Enzymstandards ermittelt. Unter Einbezug des jeweils entsprechenden Molekulargewichts, sowie des Testvolumens konnte anschließend die Aktivität pro ng Standard errechnet werden. Der Quotient aus dieser und der gemessenen Aktivität pro Zelle entspricht dem absoluten Gehalt der Proteasen pro Zelle.

### 3.2.3 Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität der Assays wurde mit Hilfe einer Reihe von Hemmstoffen untersucht (s. Tab. 3.4). Reversible und irreversible Inhibitoren wurden in Assaypuffer vorgelegt (100  $\mu\text{l}$ ; 2 x konzentriert) und anschließend die Lysate bzw. isolierten Proteasen (10 bzw. 20  $\mu\text{l}$ ) hinzugegeben. Die Reaktion wurde in der HNE-, PR3- und CathG-Messung sofort durch die Zugabe der Substrat-Puffer Mischung (80 bzw. 90  $\mu\text{l}$ ; 2,2 x bzw. 2,5 x konzentriert) gestartet. Im CathC-Assay wurden die Lysate bzw. das isolierte CathC über einen Zeitraum von 20 min vor Substratzugabe mit dem Inhibitor inkubiert. Die Restaktivität wurde wie vorbeschrieben bestimmt (s. Tab. 3.2; Tab. 3.3). Als Kontrolle wurde auf der jeweils gleichen Mikrotiterplatte die Aktivität von unbehandelten Lysaten und Standardenzymen bestimmt.

<i>Assay</i>	<i>Inhibitor</i>	<i>Eigenschaft</i>	<i>K<sub>i</sub> bzw. k<sub>2</sub>/K<sub>i</sub></i>
HNE & PR3	Sivelestat	reversibel	0,017 $\mu\text{M}$ (HNE); 0,11 $\mu\text{M}$ (PR3)
HNE & PR3	Alvelestat	reversibel	0,012 $\mu\text{M}$ (HNE); 137 $\mu\text{M}$ (PR3)
CathG	Aprotinin	reversibel	$\sim 1 \mu\text{M}$
CathC	HR 57	irreversibel	56.000 $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$

**Tabelle 3.4: Verwendete Proteaseinhibitoren.**

Die Affinität ( $K_i$  bzw.  $k_2/K_i$ ) wurde den Herstellerangaben bzw. persönlichen Daten entnommen.

### **3.2.4 Blutspende zur Isolierung von Neutrophilen Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten wurden aus anonymisierten Spenden von Probanden isoliert (Ethik-Antrag „Irreversibel anonymisierte Blutspenden zur Isolierung von Leukozyten für in vitro-Untersuchungen“ Projekt-Nr.: 018-09). Mittels Safety-Multifly-Kanüle wurde jeweils die V. mediana cubiti punktiert und 6 bis 9 ml Vollblut in einer 9 ml EDTA-Monovette gewonnen. Die Proben wurden anschließend mit einer Kennung versehen, die das Geschlecht des Probanden zeigte, eine persönliche Zuordnung aber nicht mehr zuließ. Ein Anteil der Blutproben wurde zur Anfertigung eines maschinellen Differentialblutbildes verwendet.

### **3.2.5 Isolation Neutrophiler Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten wurden mit Hilfe des MACSxpress Whole blood Neutrophil Isolation Kits (Miltenyi) gemäß den Herstellerangaben isoliert. Hierbei wird durch Sedimentation der Erythrozyten und Inkubation mit immunomagnetischen Beads eine Abreicherung der anderen Leukozyten-Populationen bewirkt. Um anschließend verbliebene Erythrozyten zu entfernen, wurde die isolierte Zellpopulation zweimal einer Hypotonen Lyse unterzogen. Dafür wurde das Zellpellet in 2 ml 0,9 % NaCl-Lösung (4 °C) und 2,5 ml destilliertem Wasser (4 °C) resuspendiert und für 30 Sekunden inkubiert. Der Lysevorgang wurde durch die Zugabe von 1,8 % NaCl-Lösung gestoppt, die Proben zentrifugiert (285 x g, 4 °C, 6 min) und der Überstand entfernt. Abschließend wurden die Zellpellets zweimal in 4 ml PBS + Glucose (4 °C) aufgenommen, zentrifugiert (400 x g, 4 °C, 10 min) und der Überstand durch kräftiges Invertieren verworfen. Danach wurden die Zellpellets in 7 ml PBS + Glucose (4 °C) resuspendiert.

Für die Bestimmung der Anzahl isolierter Neutrophiler Granulozyten in der Zellsuspension wurde das CASY-Zählgerät genutzt. Hierbei wurden zunächst CASY-Cups mit jeweils 6 ml CASYton befüllt, 30 µl des Isolats hinzugegeben und beides durch vorsichtiges Schwenken vermengt. Die Messung erfolgte entsprechend der Herstelleranweisung.

Zur Herstellung von Lysaten wurde die Zellsuspension zunächst in 1,5 ml Reagiergefäße aliquotiert, sodass in jedem 1 x 10<sup>6</sup> Zellen enthalten waren. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (400 x g, RT, 10 min) und der Überstand abgenommen. Das verbliebene Zellpellet wurde mit 1 ml Lysepuffer versetzt, sodass sich eine Zellzahl von 1000 Zellen pro µl ergab. Die Lysate wurden dreimal für jeweils 1 Minute im Vortexmischer gemischt, 5 Minuten bei 4 °C gelagert und abschließend für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Zelldebris wurde durch eine weitere Zentrifugation (2100 x g, RT, 10 min) entfernt. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt und bei - 80 °C gelagert.

Um Zellpellets zu lagern, wurden jeweils Volumina der Zellsuspensionen bestimmt, in denen  $1 \times 10^6$  Zellen vorhanden waren und diese dann in 1,5 ml Reagiergefäße überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt ( $1000 \times g$ , RT, 10 min). Der Überstand wurde entfernt und die verbliebenen Zellpellets unmittelbar auf Trockeneis eingefroren. Die Proben wurden im Anschluss bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### **3.2.6 Herstellung, Färbung und Beurteilung von Zytospins**

Um Objektträger mit einer Monolayerschicht der isolierten Zellpopulation herzustellen, wurde das Hettich Zyto-System verwendet. Die vier Zytokammern wurden mit je  $200 \mu\text{l}$  der Zellsuspension ( $5 \times 10^5$  Zellen/ml) gefüllt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation ( $29 \times g$ , RT, 10 min) auf den Objektträger verbracht. Im Anschluss wurde der Überstand durch Invertieren entfernt, die Objektträger entnommen und luftgetrocknet.

Für die hämatologische Färbung wurde das Haema-Schnellfärbungs/Diff-Quick-Set verwendet. Die mikroskopische Beurteilung wurde an einem Axioskop-Mikroskop (Zeiss) in 1000-facher Vergrößerung durchgeführt. Dabei wurden pro Objektträger zwei Gesichtsfelder mit jeweils etwa 200 Neutrophilen Granulozyten ausgezählt.

### **3.2.7 Quantifizierung von Doppelstrang-DNA**

Die Konzentration von Doppelstrang-DNA (dsDNA) in den Zelllysaten wurde unter Verwendung des PicoGreen Farbstoffs (Hoechst) fluorometrisch quantifiziert. Lysate wurden aus Zellpellets ( $1 \times 10^6$  Zellen) hergestellt, wobei die verbleibenden Zellreste nicht abzentrifugiert wurden. Für die Messungen wurden Reagenzien aus dem Quant-It Pico Green-Kit in Kombination mit einem laborinternen Protokoll verwendet. Jeweils  $5 \mu\text{l}$  der Lysate ( $5 \times 10^5$  Zellen/ml),  $95 \mu\text{l}$  TE-Puffer und  $100 \mu\text{l}$  Working Solution wurden in schwarzen Multiwellplatten vorgelegt und über 4 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Fluoreszenz bei einer Exzitationswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm im Multimode-Mikroplatten-Reader „Spark“ gemessen. Die Bestimmung der absoluten dsDNA-Mengen erfolgte mittels Interpolation der Messwerte mit einer Lambda-DNA-Standardkurve ( $0 - 100 \mu\text{g/ml}$ ) unter Verwendung des Programms GraphPad Prism.

### **3.2.8 Quantifizierung des Gesamtproteins**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben wurde das Micro BCA-Protein-Assay-Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Zelllysate ( $2 \times 10^4$  Zellen/ml) wurden ausgehend von Zellpellets ( $1 \times 10^6$  Zellen) angefertigt, zur Entfernung von Debris zentrifugiert

(15.000 x g, RT, 10 min), 1:20 in PBS verdünnt und anschließend in transparenten Multiwellplatten mit flachem Boden vorgelegt. Alle nachfolgenden Schritte wurden wie im Herstellerhandbuch beschrieben durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch die Interpolation der Messwerte anhand der mitgeführten Standardkurve in GraphPad Prism.

### **3.2.9 Quantifizierung von Calprotectin**

Das Protein Calprotectin wurde in den Zelllysaten mit Hilfe des Immunoassay-Kits Human S100A8/S100A9 Heterodimer Quantikine ELISA quantifiziert. Dazu wurden Lysate aus bei - 80°C gelagerten Pellets hergestellt und anschließend erneut bei - 80°C eingefroren. Am Folgetag wurden die Lysate aufgetaut, zentrifugiert (2100 x g, RT, 10 min) und der Überstand abgenommen. Nach Verdünnung in Assaypuffer (1:3000) wurde Calprotectin entsprechend der Herstellervorschrift quantifiziert. Die Calprotectinkonzentration wurde basierend auf mitgeführten Standards mit Hilfe des Programms GraphPad Prism berechnet.

### **3.2.10 Quantifizierung von Myeloperoxidase**

Myeloperoxidase wurde mittels Immunoassay quantifiziert (MPO ELISA Kit, Abcam). Hierfür wurden Lysate aus Pellets hergestellt (1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml) und nach einem Frier-Auftau-Zyklus in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Alle Inkubations- und Waschschrte wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Als Waschpuffer wurde PBS (0,01 M) gewählt. Die Auswertung der absoluten Mengen erfolgte mittels Interpolation im Vergleich zu mitgeführten Standards mit Hilfe des Programms in GraphPad Prism.

### **3.2.11 Untersuchungen zum Einfluss von Hämoglobin**

Die Mengen residualen Hämoglobins in den Lysaten wurden photometrisch quantifiziert. Hierfür wurden Triplikate (20 µl) der Lysate (Zellen/µl) zusammen mit 180 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Assaypuffer in transparenten 96-Well-Platten vorgelegt. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 415 nm im Multimode-Mikroplatten-Reader "Saphire" gemessen. Die absoluten Hämoglobinwerte in den Lysaten wurden durch Interpolation auf der Basis eines laborinternen Standards unter Verwendung des Programms GraphPad Prism ermittelt.

Für die Herstellung des Standards wurden 3 ml Vollblut in einer Heparin-Lithium-Monovette gewonnen und anschließend in einem Reagiergefäß zentrifugiert (1000 x g, RT, 10 min). Überstand und Buffy-Coat wurden entfernt und das Pellet in PBS resuspendiert. Die Erythrozyten wurden durch eine 10-minütige Inkubation mit H<sub>2</sub>O im Verhältnis 4:1 lysiert. Mittels Zentrifugation (1200 x g, RT, 30 min) wurde anschließend Zelldebris abgetrennt und die verbleibende Hämoglobin-reiche Lösung in Aqua ad injetabilia auf 50 mg/dl eingestellt. Die

Standardreihe im Test entsprach einer geometrischen Verdünnung über 11 Schritte in 200  $\mu$ l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pro Well, beginnend mit einer Konzentration von 5 mg/dl.

### **3.2.12 Statistische Methoden**

Alle Messungen wurden in technischen Triplikaten untersucht. Für statistischen Berechnungen wie Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Variabilität, die Durchführung von Regressionsanalysen sowie die Herstellung der Abbildungen wurde das Programm GraphPad Prism (Version 7) verwendet. Weiterführende statistische Verfahren wie die Korrelationsmatrix oder Two-way ANOVA Analyse wurden mit Hilfe der Programmiersprache R (Version 4) durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

Im Rahmen einer vorrausgegangenen Studie in der Arbeitsgruppe war die Eignung verschiedener Peptidsubstrate zum Nachweis der Granula-assoziierten Serinproteasen Neutrophile Elastase (HNE), Proteinase 3 (PR3) und Cathepsin G (CathG) sowie derer gemeinsamer Aktivatorprotease Cathepsin C (CathC) untersucht worden (J. Leding, AG Sommerhoff, 2022) [164]. In der hier vorgelegten Arbeit wurden jetzt auf diesen Substraten basierende enzymkinetische Assays zunächst anhand von isolierten Proteasen evaluiert. Anschließend wurde die Übertragbarkeit der Assays auf Zellysate humaner Neutrophiler Granulozyten und Proben einer Probanden-Gruppe geprüft.

### 4.1 Assayevaluierung mit Hilfe isolierter Proteasen

Um die Eignung der Peptidsubstrate für die Quantifizierung der Proteasen zu bewerten, wurden darauf aufbauende enzymkinetische Aktivitätsassays mit isolierten Enzymen in Hinblick auf den Verlauf der Progresskurven, die Linearität, die analytische Spezifität, die Interferenz und die Selektivität untersucht.

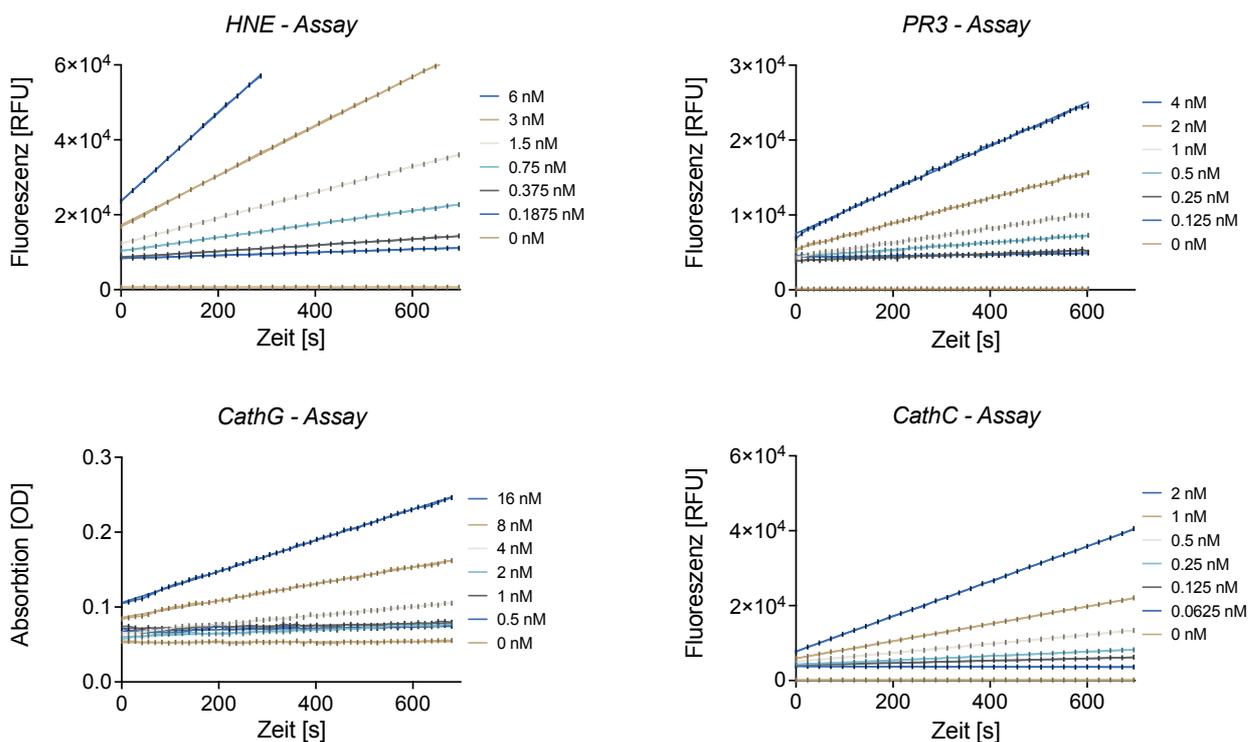
#### 4.1.1 Linearität der Progresskurven

Um die Progresskurven der enzymatischen Reaktionen der Assays hinsichtlich ihrer Linearität zu untersuchen, wurde die Substratspaltung anhand der Zunahme der Fluoreszenz bzw. Absorption über einen Zeitraum von bis zu 700 Sekunden aufgezeichnet.

Dazu wurden die isolierten Proteasen HNE (0 - 6 nM), PR3 (0 - 4 nM), CathG (0 - 16 nM) und CathC (0 - 2 nM) in sechs aufsteigenden Konzentrationen in Assaypuffer (10 bzw. 20  $\mu$ l AP1 für den HNE-, PR3- und CathG-Assay; 20  $\mu$ l AP2 für den CathC-Assay) in einer 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt und anschließend mit 180 bzw. 190  $\mu$ l der entsprechenden Substrat-Lösung im gleichen Puffer versetzt. Für die Messung von HNE und CathC wurden die fluorogenen Substrate MeoSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC (MeoSuc-AAPV-AMC; 10  $\mu$ M) bzw. H-Gly-Arg-AMC (HGA-AMC; 10  $\mu$ M), für den PR3-Assay das FRET-Substrat Abz-Val-Ala-Asp-Nva-Arg-Asp-Arg-Gln-EDDnp (FRET-K; 10  $\mu$ M) und für CathG das chromogene Substrat Suc-Val-Pro-Phe-pNA (Suc-VPF-pNA; 200  $\mu$ M) verwendet (s. Tabelle 3.1). Die Messung im Multimode-Mikroplatten-Reader wurde unmittelbar im Anschluss an die Substratzugabe gestartet. Der zeitliche Abstand der Messpunkte betrug 24 (HNE, CathC), 12 (PR3) bzw. 14 (CathG) Sekunden. Auf Grund der substratspezifischen Exzitations- und Emissionsbereiche

wurden die Messungen des HNE- und CathC-Assays mit einer Exzitationswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 465 nm durchgeführt, während im PR3-Assay 320 nm und 420 nm verwendet wurden. Für das chromogene Substrat im CathG-Assay wurden die Absorptionswellenlänge 405 nm und deshalb durchsichtige anstatt schwarzer Mikrotiterplatten (Polystyrol) ausgewählt (37° C; Messeinstellungen: s. Tab. 3.3).

In allen vier Assays zeigt sich bei allen verwendeten Enzymkonzentrationen ein kontinuierlicher Anstieg der Fluoreszenz bzw. Absorption über die Zeit (s. Abb. 4.1). In keiner der Messungen wurden relevante Sprünge oder Knicke der Progresskurve beobachtet. Je höher die eingesetzte Konzentration der Protease, desto größer die Steigung der Ausgleichsgeraden. Ein streng linearer Zusammenhang über die Zeit ergibt sich bei den eingesetzten Enzymkonzentrationen  $\geq 0,1875$  nM HNE ( $r^2 \geq 0,94$ ),  $\geq 0,5$  nM PR3 ( $r^2 \geq 0,90$ ),  $\geq 4$  nM CathG ( $r^2 \geq 0,98$ ) und  $\geq 0,125$  nM CathC ( $r^2 \geq 0,92$ ).



**Abbildung 4.1: Progresskurven der enzymkinetischen Aktivitätsmessungen.**

Die Spaltung der Substrate durch die Proteasen HNE (0 - 6 nM), PR3 (0 - 4 nM), CathG (0 - 16 nM) und CathC (0 - 2 nM) wurde durch die Änderung der Fluoreszenz bzw. Absorption über einen Zeitraum von 600 bzw. 700 Sekunden bei 37° C quantifiziert. Der Messbereich der Fluoreszenz und Absorption liegt zwischen 0-60.000 RFU bzw. 0-1 OD.

Diese Ergebnisse zeigen, dass in einem Zeitraum von  $\leq 700$  Sekunden in den Messungen mit den oben genannten Enzymkonzentrationen ausschließlich Reaktionen mit weitgehend linearen Progresskurven beobachtet werden. Die Messung wird nicht z.B. durch Luftblasen im

Testansatz, Temperaturschwankungen im Messgerät oder unzureichende Mischung der einzelnen Assaykomponenten beeinflusst. Im Verlauf der Experimente konnten die Einstellungen des Multimode-Mikroplatten-Readers dahingehend optimiert werden, dass der gesamte Messbereich 0 - 60.000 RFU bzw. 0 - 1 OD weitgehend ausgenutzt wurde; im PR3-Assay erreichen die Messungen dieses Limit nicht, Grund hierfür ist die Kombination aus niedriger Quantenausbeute und limitierter Konzentration bzw. Verfügbarkeit des verwendeten FRET-Substrats. Zusammenfassend zeigten diese Versuche, dass die Progresskurven die Entstehung des Reaktionsprodukts über die Zeit und damit deren Steigung die enzymatische Aktivität verlässlich abbilden.

#### 4.1.2 Linearität der Assays

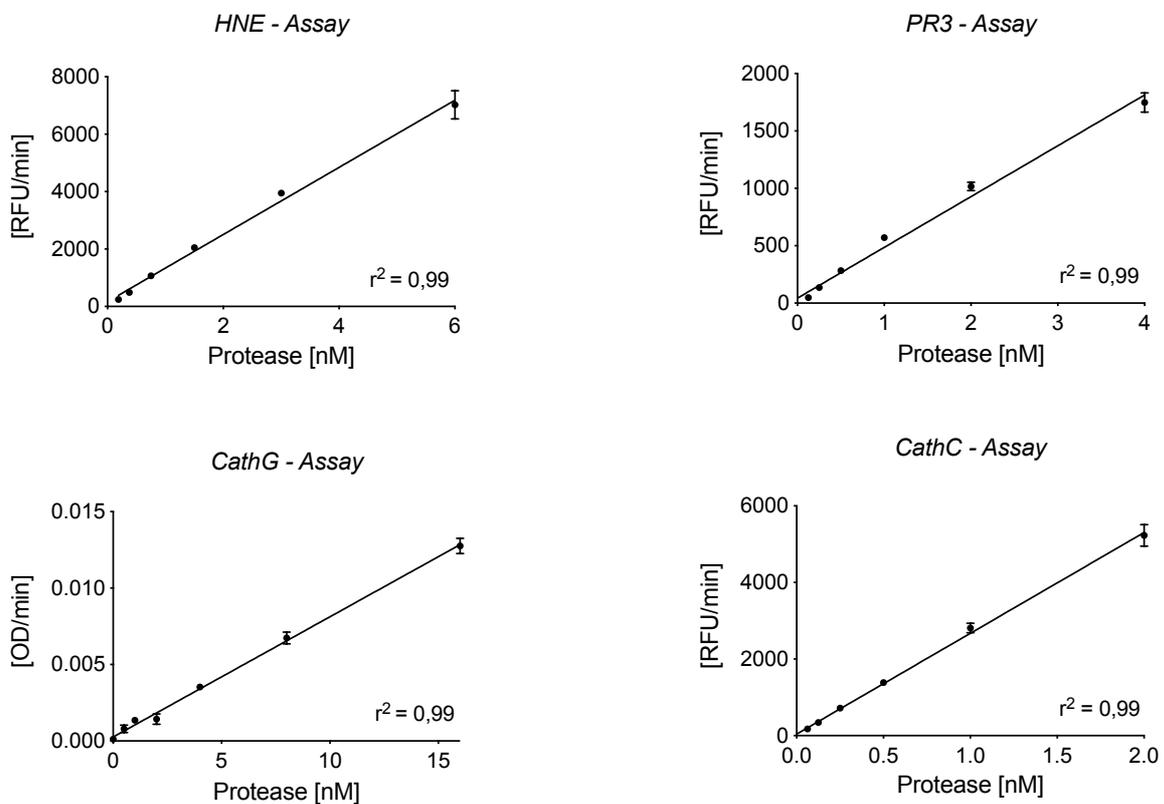
Um die Linearität der Enzymassays zu überprüfen und geeignete Messbereiche festzulegen, wurde der Zusammenhang zwischen nachgewiesener Aktivität ( $\Delta$ RFU/min bzw.  $\Delta$ OD/min) und verschiedenen Enzymkonzentrationen untersucht. Dazu wurden analog der Vorgehensweise im vorherigen Kapitel isolierte Proteasen in aufsteigenden Konzentrationen vorgelegt, Substrate hinzugegeben und anschließend die Zunahme der Fluoreszenz bzw. Absorption gemessen.

Es zeigt sich, dass die nachgewiesene Aktivität ( $\Delta$ RFU/min bzw.  $\Delta$ OD/min) proportional zur eingesetzten Konzentration der Proteasen zunimmt (s. Abb. 4.2). Regressionsanalysen der Messungen ergeben Bestimmtheitsmaße von  $r^2 > 0,99$  in allen vier Assays und bestätigen damit einen weitgehend linearen Verlauf. Insbesondere im PR3-Assay zeigt sich optisch allerdings eine leichte Krümmung im Verlauf der einzelnen Messpunkte, die einen relevanten Substratverbrauch in den Messansätzen mit höheren Enzymkonzentrationen vermuten lässt; wird in einer enzymatischen Reaktion die notwendige (konstante) Substratkonzentration zu stark reduziert, kommt es zu einer verminderten Produktentstehung über die Zeit.

Mittels der Fluoreszenzwerte eines in den Messungen simultan mitgeführten Fluoreszenz-Standards ( $0,5 \mu\text{M}$  AMC) bzw. des Lambert-Beer'schen Gesetzes wurde der Substratverbrauch in den Testansätzen berechnet. Im HNE- und CathC-Assay liegt dieser bei allen Enzymkonzentrationen  $\leq 10 \%$ . Gleiches gilt für die Ansätze mit bis zu  $0,5 \text{ nM}$  Protease im PR3-Assay und  $8 \text{ nM}$  im CathG-Assay. In diesen Fällen beträgt die rechnerische Abweichung der Reaktionsgeschwindigkeit im Verlauf der Messungen weniger als  $5 \%$  und ist damit akzeptabel. Messungen des PR3- und CathG-Assays mit höheren Enzymkonzentrationen zeigen dagegen ein Substratverbrauch von mehr als  $10 \%$  (PR3:  $34 \%$ ,  $20 \%$  und  $11 \%$  bei  $4 \text{ nM}$ ,  $2 \text{ nM}$  und  $1 \text{ nM}$ ; CathG:  $18 \%$  bei  $16 \text{ nM}$ ). Die Bestimmtheitsmaße von  $r^2 \geq 0,99$  der Ausgleichsgeraden legen allerdings nahe, dass die Linearität trotz eines deutlich

höheren Substratverbrauches (max. 34 %) ausreichend ist. Im Hinblick auf die limitierte Verfügbarkeit der Substrate, insbesondere des PR3-Substrats, und die adäquate Linearität sahen wir vom Einsatz höherer Substrat-Konzentrationen in weiteren Experimenten ab.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass in den untersuchten Konzentrationsbereichen weitgehend lineare Messungen durchgeführt werden können, da die Zunahme der Fluoreszenz bzw. Absorption pro Zeiteinheit proportional zur Konzentration der Proteasen im Test ist. Die Ausgleichsgeraden verlaufen annähernd durch den Nullpunkt; dies stellt eine gute Grundlage für die Mengenbestimmung der nachzuweisenden Proteasen dar. Der Messbereich beträgt im HNE-Assay 0,19 - 6 nM, im PR3-Assay 0,13 - 4 nM, im CathG-Assay 0,5 - 16 nM und im CathC-Assay 0,06 - 2 nM.



**Abbildung 4.2: Darstellung der enzymatischen Aktivität in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.**

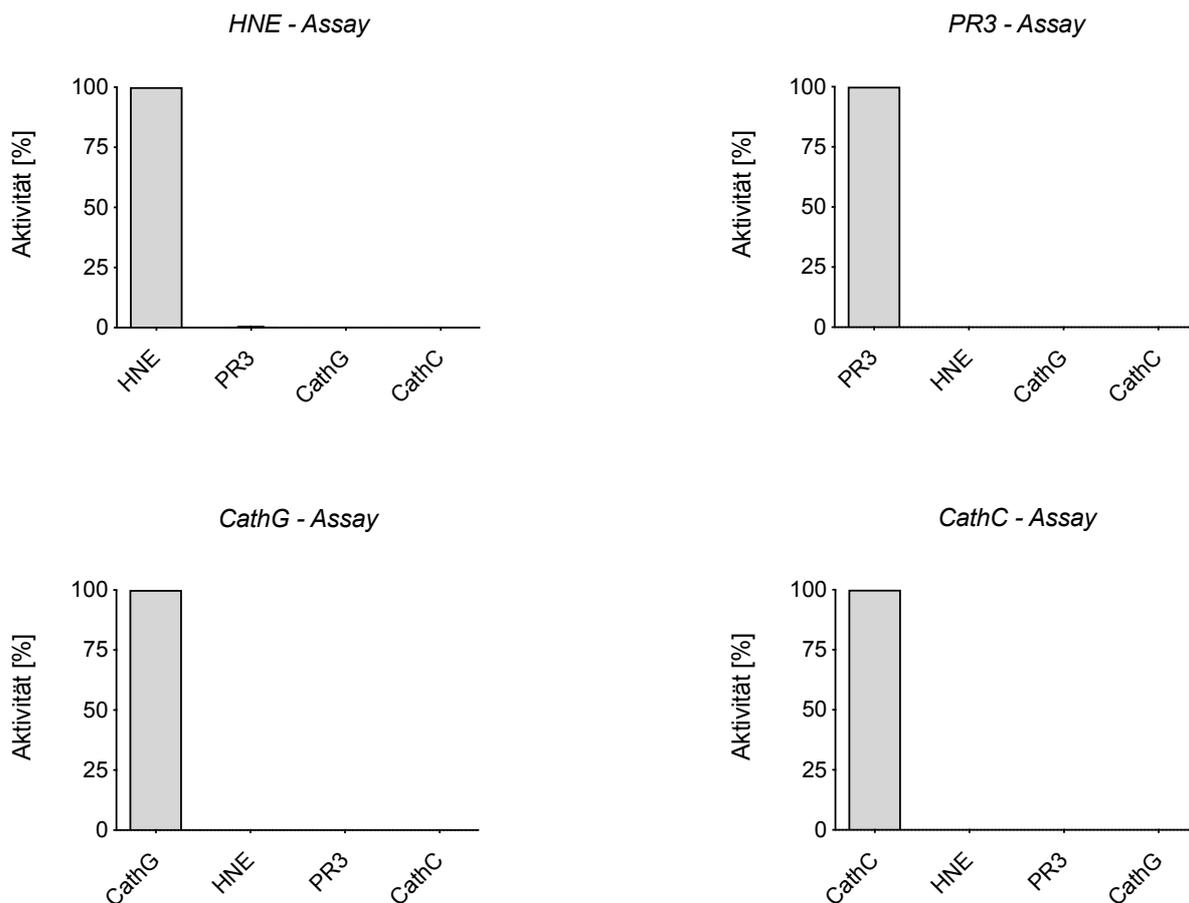
Die Spaltung der jeweiligen Substrate (HNE-, PR3-, CathC-Assay: 10  $\mu$ M, CathG-Assay: 200  $\mu$ M) pro Zeit durch die verschiedenen Konzentrationen der isolierten Proteasen (0 - 16 nM) wurde über die Änderung der Fluoreszenz bzw. Absorption pro Zeiteinheit bestimmt. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SD von Triplikaten sowie der Regressionsgeraden.

### 4.1.3 Analytische Selektivität

Da in den Lysatproben von Neutrophilen Granulozyten zwangsläufig immer alle drei Granula-assoziierten Proteinasen (HNE, PR3 und CathG) und deren Aktivator CathC nebeneinander vorliegen, wurde die Selektivität der Enzymassays untereinander überprüft. Dies erschien insbesondere wichtig, da die Substratspezifitäten von HNE und PR3 sehr ähnlich sind [165]. Dazu wurden in jeden der vier Assays neben der zu quantifizierenden Protease auch die jeweiligen drei anderen Proteasen eingesetzt und somit die enzymatische Aktivität aller vier Proteasen in allen vier Assays bestimmt. In den vier separaten Ansätzen pro Assay wurden dabei einheitliche Konzentrationen aller Proteasen verwandt (HNE-Assay 1 nM, PR3-Assay 0,5 nM, CathG-Assay 2,5 nM, CathC-Assay 1 nM) und die enzymatische Aktivität unter den zuvor beschriebenen Assay-spezifischen Bedingungen (Substrat, Konzentrationen, Puffer, Zeiten; s. Kap. 4.1.1) bestimmt. Die Ergebnisse der Messung wurden in % der Aktivität der nachzuweisenden Protease dargestellt.

Wie zu erwarten, wird in jedem der Assays die jeweils zu quantifizierende Protease nachgewiesen (s. Abb. 4.3). Dagegen wurde in allen Ansätzen mit den jeweiligen anderen Proteasen keine wesentliche Änderung der Fluoreszenz bzw. der Absorption über die Zeit beobachtet; lediglich im PR3-Ansatz des HNE-Assays wurde eine geringe enzymatische Aktivität von 0,26 % beobachtet.

Die Ergebnisse zeigen, dass in allen vier Assays jeweils nur die nachzuweisende Protease detektiert wird. Die Messungen sind damit weitgehend selektiv für die Quantifizierung der einzelnen GASPIDs und CathC. Zusätzlich zeigen diese Ergebnisse, dass die als Standard verwendeten Protease-Präparationen keine relevante Kontamination durch die anderen Enzyme aufweisen.



**Abbildung 4.3: Bestimmung der Selektivität der Assays.**

Alle isolierten Proteasen (HNE, PR3, CathG und CathC) wurden in alle Assays eingesetzt und die Aktivität bestimmt. Die Enzymkonzentrationen entsprechen dabei in allen Ansätzen eines Assays der der nachzuweisenden Protease (HNE-Assay 1 nM, PR3-Assay 0,5 nM, CathG-Assay 2,5 nM, CathC-Assay 1 nM). Alle Messwerte wurden auf die Aktivität der Kontrolle normalisiert. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SD von Triplikaten.

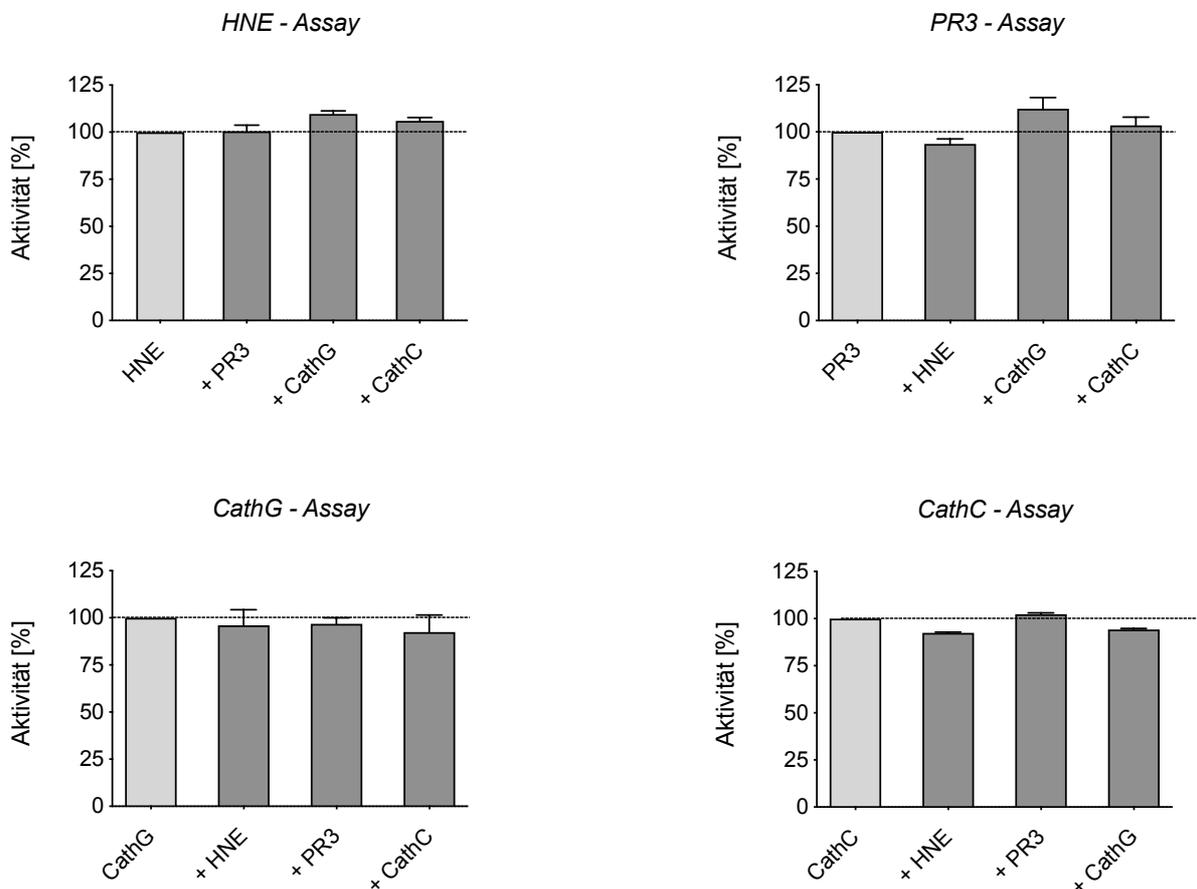
#### 4.1.4 Interferenz

Da die verwendeten Peptidsubstrate zwei bis acht Aminosäuren umfassen und damit mehrere Peptidbindungen bzw. potenzielle Spaltstellen aufweisen, ist es denkbar, dass eine Protease das Substrat einer anderen Protease nicht-produktiv spaltet und damit zerstört. Um zu untersuchen, ob so der Nachweis der zu quantifizierenden Proteasen durch die Anwesenheit der anderen GASPIDs in den Messungen gestört wird, wurden die Proteasen in der Gegenwart von jeweils allen anderen Proteasen mit den beschriebenen Assays quantifiziert.

Für jeden Assay wurden vier separate Ansätze verwendet, in denen jeweils die zu quantifizierende Protease (HNE 1 nM, PR3 0,5 nM, CathG 2,5 nM, CathC 1 nM) (10 bzw. 20  $\mu$ l) vorgelegt wurde. Zu drei der Ansätze wurde schließlich eine der anderen Proteasen in der gleichen Konzentration (10 bzw. 20  $\mu$ l) hinzugegeben. Der vierte Ansatz wurde mit

entsprechendem Volumen Puffer versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe der Substrat-Puffer Lösung (160 bzw. 180  $\mu$ l) und die Messung der enzymatischen Aktivität aller vier Ansätze unter den Bedingungen des jeweiligen Assays. Die Messwerte wurden in % der Aktivität der primär nachzuweisenden Protease dargestellt.

Die Gegenwart der jeweils anderen Proteasen führt in allen vier Assays nur zu geringen Änderungen der gemessenen Aktivität (s. Abb. 4.4). Der im Vergleich zur Aktivität der nachzuweisenden Protease größte Unterschied liegt bei 12 % und wird im PR3-Assay unter Zugabe von CathG beobachtet. Alle weiteren Ansätze des Experiments weisen Abweichungen von unter 10 % (min. 2 %, max. 9 %) auf. Insbesondere interferiert HNE im PR3-Assay bzw. PR3 im HNE-Assay nur wenig (0 bzw. 7 %).



**Abbildung 4.4: Untersuchung der Interferenz.**

Jede Protease (HNE 1 nM; PR3 0,5 nM; CathG 2,5 nM; CathC 1 nM) wurde mit den drei anderen Proteasen in jeweils gleicher Konzentration versetzt und anschließend die Aktivität bestimmt. Messwerte werden in % der Aktivität der jeweils nachzuweisenden Protease dargestellt. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SD von Triplikaten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Gegenwart der jeweils anderen Granula-assoziierten Serinproteasen Neutrophiler Granulozyten zu keiner relevanten destruktiven Spaltung der jeweiligen Substrate führt und damit den Nachweis der zu quantifizierenden Proteasen nicht

wesentlich beeinflusst. Darüber deutet sich hier an, dass eine verlässliche Unterscheidung zwischen HNE und PR3 mit den Assays möglich ist.

#### 4.1.5 Analytische Spezifität - Einsatz von Inhibitoren

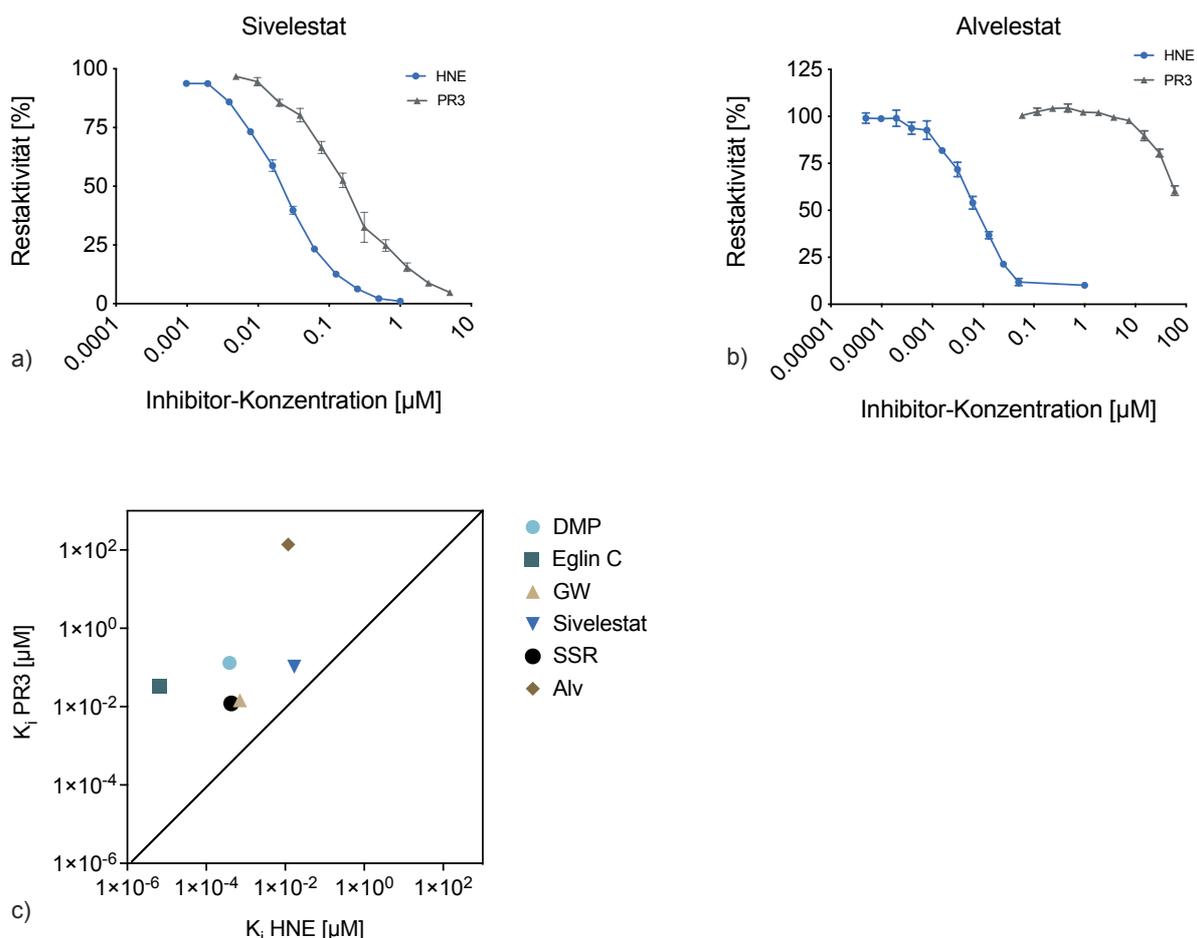
Peptidsubstrate bzw. Proteasen sind nie vollständig spezifisch. Darüber hinaus ist nicht vollständig auszuschließen, dass möglicherweise weitere in biologischen Proben enthaltene Proteasen die Substrate der Assays spalten. Auf Grund der Fülle an physiologisch vorhandenen Proteasen ist es nicht möglich, den Einfluss aller Enzyme auf die Assays zu untersuchen. Daher wurden spezifische Inhibitoren als Werkzeuge etabliert, um die gemessene Substratspaltung auf die nachzuweisenden Proteasen zurückzuführen.

Für den CathG-Assay wurde der Hemmstoff Aprotinin verwandt, der eine verlässliche Abgrenzung von der eng verwandten Granula-assoziierten Protease Chymase ermöglicht [166] und in der Arbeitsgruppe etabliert worden ist. Zur Hemmung von CathC stand der synthetische, irreversible Inhibitor HR 57 zur Verfügung, der zusammen mit Prof. N. Schaschke (Hochschule Aalen) entwickelt worden ist [167]. Inhibitoren, die selektiv PR3 und HNE hemmen, waren zum Zeitpunkt der Versuche dagegen nicht bekannt. Daher wurde zunächst die Inhibition von PR3 und HNE durch eine Reihe in der Literatur beschriebener HNE-Inhibitoren (MeoSuc-AAPV-CMK, alpha1-PI, Pefabloc SC, DMP 777, Eglin C, GW 311616, SSR 69071, Alvelestat und Sivelestat) überprüft. Dazu wurden geometrische Verdünnungen dieser Inhibitoren in Assaypuffer (100  $\mu$ l) vorgelegt und anschließend 50  $\mu$ l isolierte HNE oder PR3 (1 nM bzw. 0,5 nM) hinzugeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten (37 °C) wurde die Substrat-Puffer-Mischung (50 $\mu$ l) hinzugeben und die Messung gestartet.

Beispielhaft sind die hier die Ergebnisse der inhibitorischen Untersuchungen mit den synthetischen Inhibitoren Alvelestat (AZD9668) und Sivelestat (ONO 5046) dargestellt (s. Abb. 4.5 a, b). Sivelestat führt zu einer effektiven Inhibition beider Proteinasen. Eine Konzentration von  $> 2,5 \mu$ M führt zu einer nahezu vollständigen Hemmung der HNE (Restaktivität  $< 1 \%$ ) und der PR3 (Restaktivität  $< 9 \%$ ). Mit dem Einsatz von Alvelestat hingegen wird mit einer Konzentration von  $> 0,1 \mu$ M eine fast vollständige Hemmung der HNE ( $\geq 90 \%$ ) erzielt, während die Aktivität der PR3 erst bei Konzentrationen  $\geq 30 \mu$ M deutlich beeinflusst wird.

Trägt man die ermittelten Inhibitorenkonstanten ( $K_i$ ) für HNE vs. PR3 aller untersuchten Hemmstoffe gegeneinander auf (s. Abb. 4.5 c), liegen die Inhibitoren am nächsten an der Gleichungsgerade, die beide Proteasen in ähnlicher Weise hemmen (z.B. Sivelestat) und

solche entfernter, die eine der beiden effektiver hemmen (z.B. Alvelestat). So wird deutlich, dass sowohl Alvelestat auch als Eglin C HNE deutlich besser hemmen als PR3. Die  $K_i$  von Alvelestat für die Hemmung von PR3 ist dabei zwar um den Faktor 10000 höher als die von Eglin C, da dieser als synthetischer Inhibitor jedoch besser verfügbar ist als das rekombinant hergestellte Eglin C wurde dieser für die weiteren Experimente verwendet.

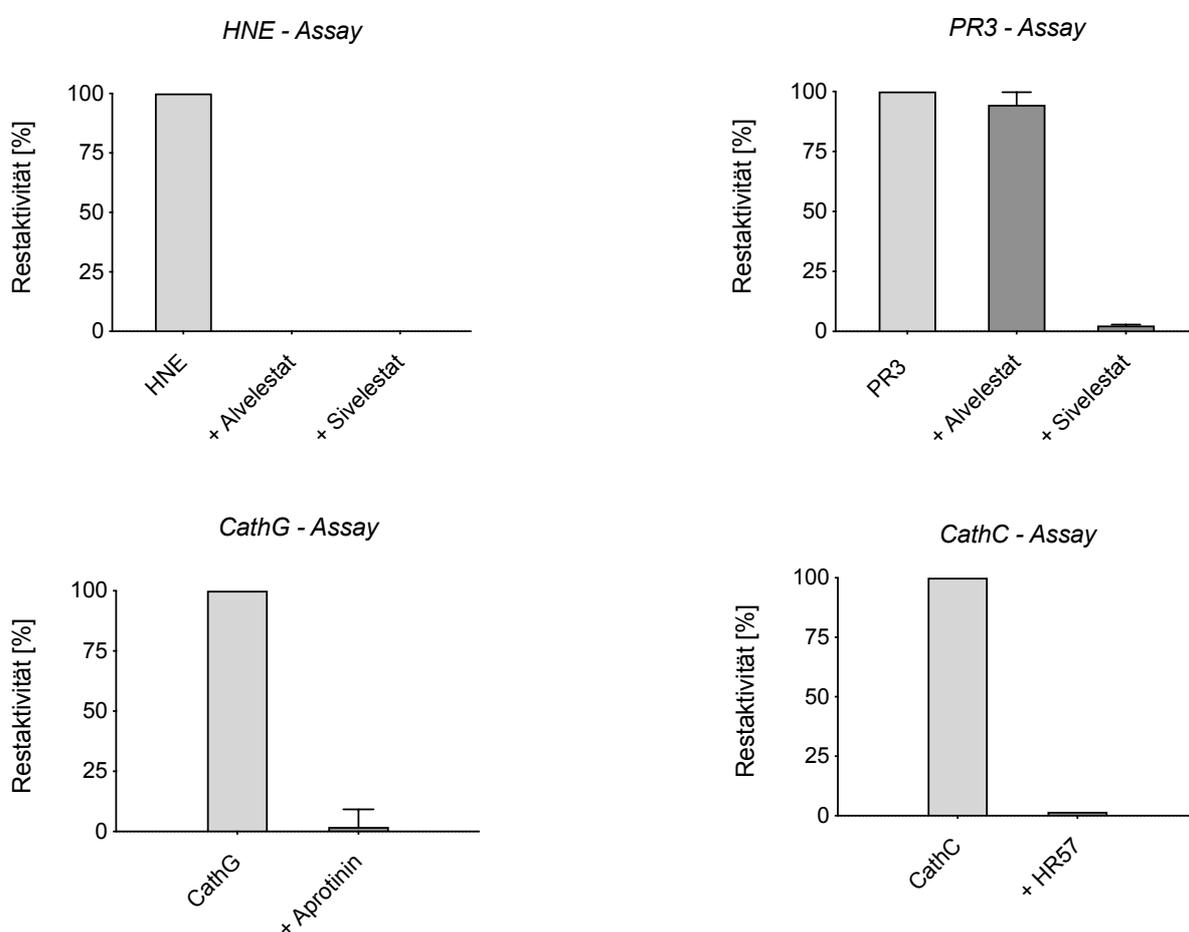


**Abbildung 4.5: Validierung von Inhibitoren für HNE und PR3.**

(a) Isolierte HNE (1nM) wurde mit 12 aufsteigenden Konzentrationen von Sivelestat (0 - 1  $\mu\text{M}$ ) und Alvelestat (0 - 0,05  $\mu\text{M}$ ) inkubiert und anschließend die Aktivität gemessen. (b) Ebenso wurde mit isolierter PR3 (0,5 nM) und 12 aufsteigenden Konzentrationen von Sivelestat (0 - 5  $\mu\text{M}$ ) und Alvelestat (0 - 60  $\mu\text{M}$ ) verfahren. (c) Die errechneten Werte der  $K_i$  ( $\mu\text{M}$ ) der verschiedenen Inhibitoren für HNE und PR3 wurden gegeneinander aufgetragen. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$  bzw. 4 Versuche.

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse werden in allen folgenden Experimenten jeweils zwei Inhibitoren (Sivelestat 30  $\mu\text{M}$  und Alvelestat 10  $\mu\text{M}$ ) zur Verifizierung und Differenzierung von HNE und PR3 in den Assays eingesetzt. Sivelestat wird dabei in einer Konzentration verwendet, die zu einer verlässlichen Inhibition beider Proteasen führt (30  $\mu\text{M}$ ), während die verwendete Konzentration von Alvelestat (10  $\mu\text{M}$ ) lediglich die HNE hemmt.

Im Anschluss an diese Vorversuche wurden Messungen in Gegenwart und Abwesenheit der gewählten Inhibitoren durchgeführt, um in allen vier Assays die Aktivität auf die zu quantifizierenden Proteasen zurückzuführen. Dazu wurde der jeweilige Assaypuffer ohne und mit Inhibitor (Sivelestat 30  $\mu\text{M}$ , Alvelestat 10  $\mu\text{M}$ , Aprotinin 10  $\mu\text{M}$  bzw. HR-57 4  $\mu\text{M}$ ) in einer 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt. Im Anschluss wurden die isolierten Proteasen (HNE 1 nM, PR3 0,5 nM bzw. CathG 2,5 nM bzw. CathC 1 nM) hinzugegeben und die Messung durch die Zugabe der Substrat-Puffer-Mischung gestartet; im CathC-Assay ist eine vorherige Inkubation der Protease mit dem irreversiblen Inhibitor HR57 über 20 Minuten erforderlich. Die Messwerte der Inhibitor enthaltenden Messungen sind als % der Aktivität der Ansätze ohne Hemmstoff dargestellt.



**Abbildung 4.6: Bestimmung der Spezifität der Assays.**

Die isolierten Proteasen (HNE 1 nM, PR3 0,5 nM, CathG 2,5 nM, CathC 1 nM) wurden jeweils mit selektiven Inhibitoren (Alvelestat 10  $\mu\text{M}$ , Sivelestat 30  $\mu\text{M}$ , Aprotinin 10  $\mu\text{M}$ , HR 57 4  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Im Anschluss wurde die enzymatische Aktivität gemessen. Im HNE- und PR3-Assay wurden Sivelestat (30  $\mu\text{M}$ ), das beide Proteasen hemmt, und Alvelestat (10  $\mu\text{M}$ ), das HNE-selektiv ist, eingesetzt. Alle Messwerte sind in % der nachzuweisenden Protease dargestellt. Alle Messungen in Triplikaten, Angaben als Mittelwert  $\pm$  SD.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Puffer-Kontrolle führt die Zugabe der Inhibitoren im CathG- und CathC-Assay zu einer weitgehenden Hemmung (> 97 %) der Aktivität (s. Abb. 4.6). Im HNE-Assay zeigt sich eine vollständige Hemmung durch den Einsatz beider Inhibitoren, während im PR3-Assay die Aktivität lediglich im Ansatz mit Sivelestat effektiv gehemmt wird (Restaktivität  $2,6 \pm 0,3$  %), während die Zugabe von Alvelestat keinen wesentlichen Einfluss (Restaktivität 95 %) auf die enzymatische Aktivität zeigt.

Die Ergebnisse bestätigen, dass die gewählten Inhibitoren geeignet sind, um in weiteren Versuchen mit biologischen Flüssigkeiten die in den Assays quantifizierte Aktivität auf die jeweils nachzuweisende Protease zurückzuführen. Zudem kann angenommen werden, dass die als Standard verwendeten isolierten Proteasen nicht durch weitere Enzyme verunreinigt sind. Darüber hinaus zeigen die Messungen, dass auch eine verlässliche Unterscheidung von HNE und PR3 mit den Assays möglich ist. Die Tatsache, dass es unter Zugabe von dem für PR3 nicht selektiven Inhibitor Alvelestat im PR3-Assay lediglich zu einer geringen Änderung der Aktivität kommt ( $\Delta$  5 %), belegt, dass die Substratspaltung weitgehend auf PR3 und nicht auf kontaminierende HNE zurückzuführen ist. Andererseits kommt es unter dem Einsatz von Alvelestat im HNE-Assay zu einer fast vollständigen Hemmung (> 99 %), sodass hier offensichtlich ebenfalls keine PR3-Aktivität detektiert wird.

## **4.2 Assayevaluierung mit Zelllysaten**

Die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit zeigen, dass die enzymkinetischen Assays prinzipiell zur Quantifizierung der Granula-assoziierten Proteasen HNE, PR3 und CathG, sowie deren Aktivator CathC geeignet sind. Vor diesem Hintergrund wurde im nächsten Schritt die Übertragbarkeit der Assays von isolierten Proteasen auf Zelllysate humaner Neutrophiler Granulozyten untersucht.

### **4.2.1 Detektion der GASPIDs und von Cathepsin C im Lysat Neutrophiler Granulozyten**

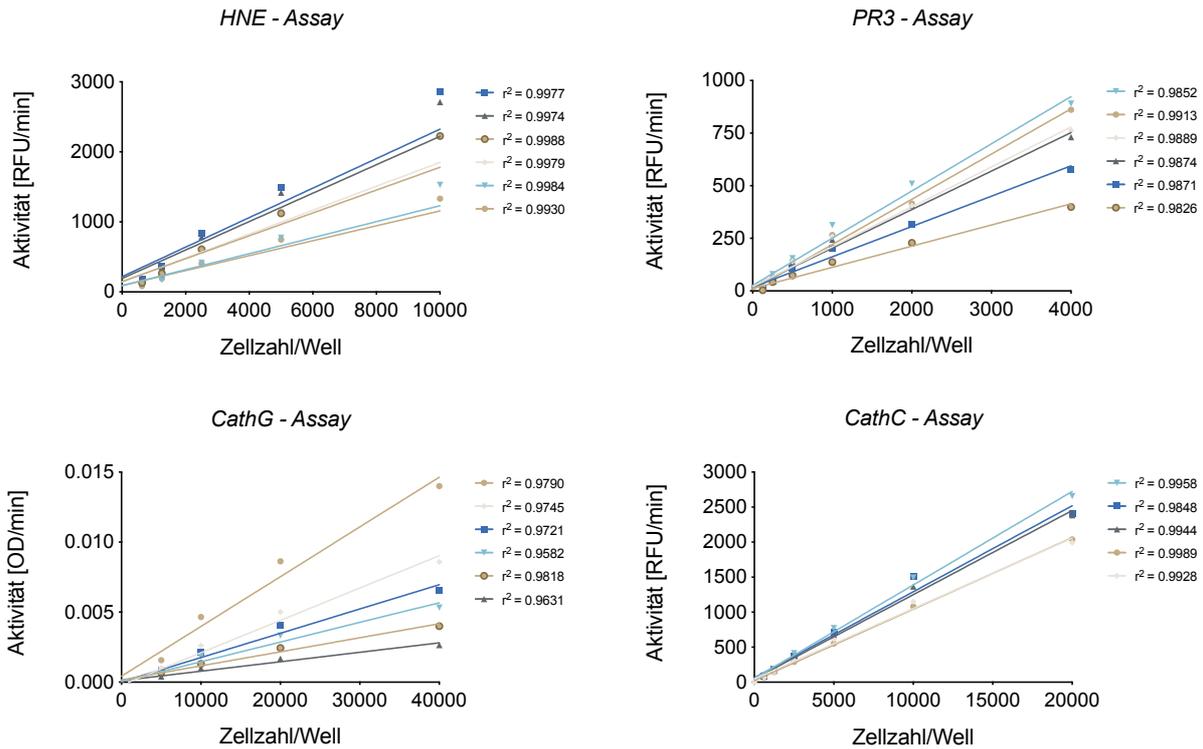
Um zu überprüfen, ob die Assays geeignet sind, die Proteasen auch in Zelllysaten Neutrophiler Granulozyten nachzuweisen und zu ermitteln, welche Zellzahlen für eine Quantifizierung nötig sind, wurden Neutrophile Granulozyten aus Vollblut isoliert, Zelllysate hergestellt und die Aktivität in diesen Lysaten in verschiedenen Verdünnungen gemessen.

Nach Aufklärung und Einwilligung wurde sechs Probanden unter der Verwendung von EDTA-Röhrchen 9 ml Vollblut mittels venöser Punktion entnommen. Aus jeweils 4 ml der Proben

wurden Neutrophile Granulozyten mit dem „MACSpress Whole blood Neutrophil Isolation“-Kit (Miltenyi) isoliert; dieses Verfahren beruht darauf, dass andere Leukozyten-Populationen mittels immunomagentischer Beads abgereichert werden (s. Kap. 3.2.5). Dazu wurden zu den Blut-Proben jeweils 2 ml des Isolations-Cocktails hinzugegeben, diese Suspension über 5 Minuten bei Raumtemperatur gemischt, und anschließend weitere 15 Minuten im Separations-Magneten inkubiert. Danach wurde der Neutrophilen-reiche Überstand vorsichtig mit der Pipette abgenommen und die Neutrophilen durch Zentrifugation (300 x g, RT, 5 min) gewonnen. Im Anschluss daran wurden verbliebene Erythrozyten durch zwei hypotone Lysen eliminiert. Dazu wurden die Zell-Suspensionen mit dem gleichen Volumen eines hypotonen Puffers versetzt, für 30 Sekunden inkubiert und dann die Isotonizität durch Zugabe von hypertoner Lösung wieder hergestellt. Nach einer weiteren Zentrifugation (285 x g, 4 °C, 6 min) erfolgte die Abnahme des Überstands. Das verbliebene Zellpellet wurde im Anschluss an zwei weitere Waschstufen (400 x g, 4 °C, 10 min) in 7 ml einer 0,1 %-igen PBS-Glucose-Lösung aufgenommen. Abschließend wurde die Zell-Konzentration der Isolate mittels Casy-Zählgerät bestimmt. Auf diesen Messungen basierend wurden Zelllysate (1000 Zellen/ $\mu$ l) hergestellt; dies erfolgte durch Zugabe eines Tensid-haltigen Puffers (LPD) und das abwechselnde Schütteln auf dem Vortexmischer und Inkubation bei 4°C (jew. dreimal). Die Lysate wurden dann unmittelbar im Anschluss bei - 80°C eingefroren.

Für die Aktivitätsmessungen wurden in einer 96-Well-Platte geometrische Verdünnungsreihen der Lysate in Assaypuffer (AP1 bzw. AP2) angefertigt. Hierfür wurden in das erste Well 200  $\mu$ l Lysat bzw. Standardenzym (2 x konzentriert) vorgelegt, anschließend 100  $\mu$ l entnommen, in das nächste Well überführt und sorgfältig vermischt. So wurde insgesamt viermal verfahren. Im letzten Well lag ein Puffer-Substrat-Leerwert vor. 100  $\mu$ l der Substrat-Puffer Mischungen wurden in der üblichen Konzentration dazugegeben und die Messung im Multiplatten-Reader gestartet. Da erste Versuche zeigten, dass der Lysepuffer die Aktivitätsmessung im CathC-Assay verfälscht, wurde bei diesem Assay subsequent jeder Verdünnungsschritt separat in Assaypuffer (AP2) hergestellt.

In den Neutrophilen-Lysaten aller Probanden konnte die enzymatische Aktivität aller vier Proteasen nachgewiesen werden. In den Assays wurde beim Einsatz von 625 - 10.000, 125 - 4000, 1250 - 40.000 bzw. 625 - 20.000 Zellen (HNE-, PR3-, CathG- bzw. CathC) ein weitgehend linearer Anstieg der Aktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl beobachtet (s. Abb. 4.7); die Regressionsgeraden haben Bestimmtheitsmaße zwischen 0,96 und 0,99. Der Substratverbrauch lag mit nur einer Ausnahme im gewünschten Bereich von  $\leq$  10 %, lediglich die höchste in den PR3-Assay eingesetzte Zellzahl (4000 Zellen) führte zu einem Verbrauch von 14 %.



**Abbildung 4.7: Detektion der GASPIDs und von CathC in Zelllysaten Neutrophiler Granulozyten.**

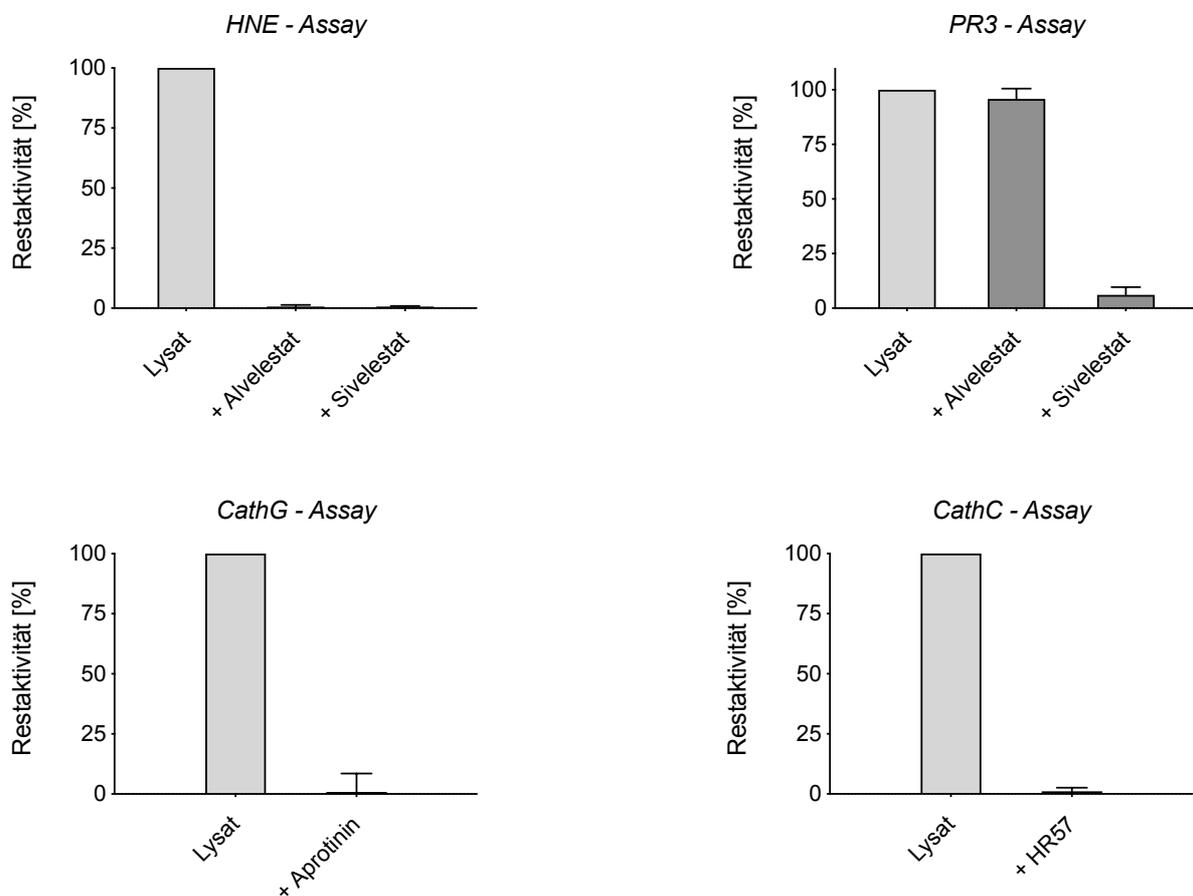
Die enzymatische Aktivität aller vier Proteasen wurde in Abhängigkeit von der Zellzahl (0 - 40.000 Zellen/Well) bestimmt.  $n = 6$  bzw. 5 Probanden, Angabe jeweils als Mittelwert  $\pm$  SD von Triplikaten.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Nachweis der Granula-assoziierten Proteasen HNE, PR3, CathG sowie deren Aktivator CathC auch in Zelllysaten Neutrophiler Granulozyten möglich ist. Um alle vier Assays in Triplikaten durchzuführen, sind insgesamt  $\sim 200.000$  Zellen notwendig. Beim Einsatz der o.g. Zellzahlen wurde ein direkt proportionaler, linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter Zellzahl und der enzymatischen Aktivität nachgewiesen. Eine relevante Störung der Messungen durch Matrix-Effekte oder in Zelllysaten vorhandenen Modulatoren wird so weitgehend ausgeschlossen; allerdings muss darauf geachtet werden, dass Konzentrationen des Lysepuffers, die das Verhältnis von 1:10 im Testansatz überschreiten, die Messungen des CathC-Assays stören. Für den Einsatz der Zelllysate in den folgenden Versuchen wurden anhand der Ergebnisse geeignete Zellzahlen (10.000, 2000, 20.000 bzw. 20.000 Zellen/Well für HNE, PR3, CathG bzw. CathC) innerhalb des linearen Messbereichs ausgewählt.

#### 4.2.2 Analytische Spezifität

Um zu bestätigen, dass die in den vier Assays gemessenen Aktivität vollständig auf die jeweils zu quantifizierende Protease zurückzuführen ist, wurde die Aktivität in den Zelllysaten mit und ohne Zugabe der zuvor etablierten selektiven Inhibitoren bestimmt. Dazu wurden Zelllysate

mit den im Vorversuch festgelegten Zellzahlen (10.000, 2000, 20.000 bzw. 20.000 Zellen für HNE, PR3, CathG bzw CathC) mit den in Kapitel 4.1.5 etablierten Inhibitoren (Alvelestat 30  $\mu$ M, Sivelestat 10  $\mu$ M, Aprotinin 10  $\mu$ M und HR 57 4  $\mu$ M) versetzt. Zusätzlich wurden isolierte Proteasen als Kontrollen mit und ohne Inhibitor mitgeführt. Zur Abgrenzung von HNE und PR3 wurden im HNE- und PR3-Assay jeweils Sivelestat und Alvelestat eingesetzt. Im HNE, PR3 und CathG Assay wurde unmittelbar anschließend die Substrat-Puffer-Mischung hinzugegeben und die Messung gestartet. Im CathC-Assay war zuvor eine Inkubationszeit von 20 Minuten nötig, da der irreversible Inhibitor langsamer mit der Protease reagiert.



**Abbildung 4.8: Bestimmung der Assay-Spezifität mit Zelllysaten.**

Lysatproben (HNE 10.000, PR3 2000, CathG 20.000, CathC 20.000 Zellen) wurden mit den zuvor etablierten Inhibitoren (Alvelestat 10  $\mu$ M, Sivelestat 30  $\mu$ M, Aprotinin 10  $\mu$ M, HR 57 4  $\mu$ M) inkubiert. Im Anschluss wurde die enzymatische Aktivität bestimmt. Die Messwerte sind in % der Aktivität der nicht inhibierten Probe dargestellt. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Angabe als Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 6$  Probanden.

In allen Assays wird die Substratspaltung in Anwesenheit des jeweiligen Inhibitors nahezu vollständig gehemmt (s. Abb. 4.8). Die Restaktivität beträgt im HNE-, CathG- und CathC-Assay < 1 %, lediglich im PR3-Assay war eine höhere residuale Aktivität von 6 % zu verzeichnen.

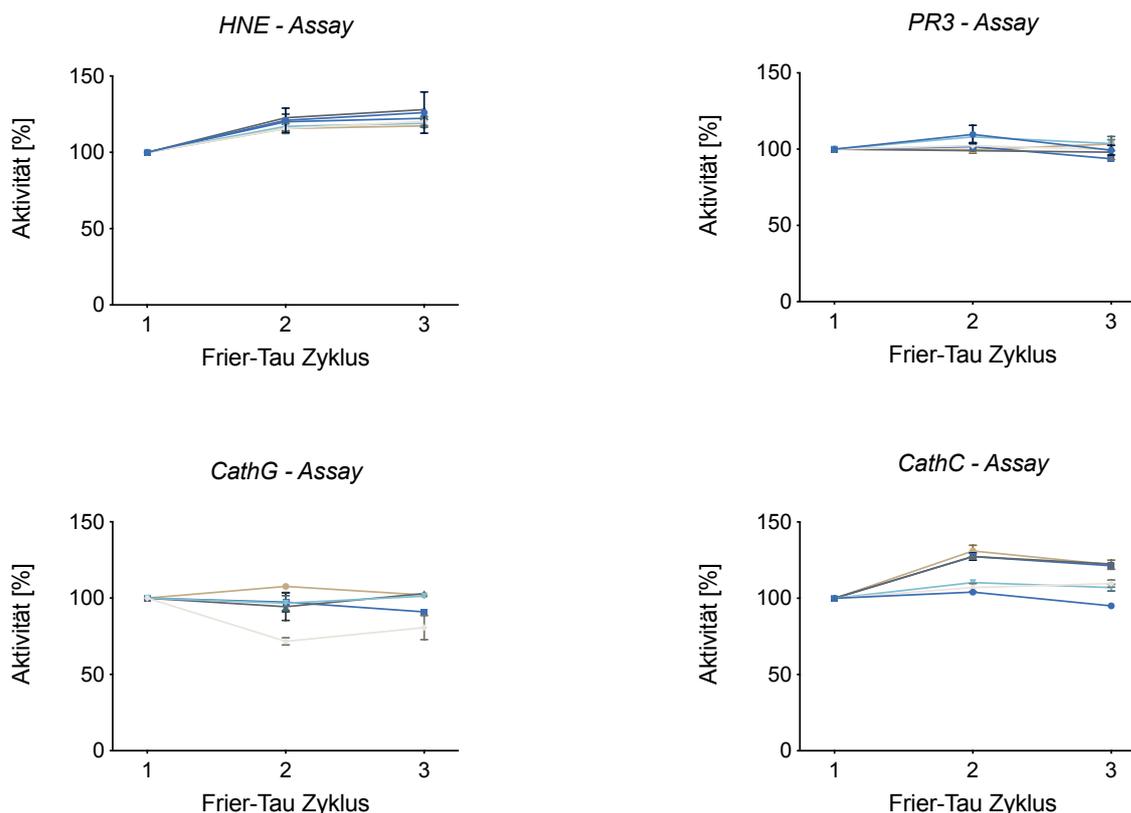
Wie zu erwarten war, führt die Zugabe von Sivelestat und Alvelestat im HNE-Assay zu einer effektiven Hemmung der Aktivität (Restaktivität < 1%); im PR3-Assay bedingt Sivelestat ebenfalls eine nahezu vollständige Inhibition, während Alvelestat kaum Einfluss auf die Aktivität zeigt (Restaktivität 96 %).

Die nahezu vollständige Hemmung der Aktivität im HNE-, CathG- und CathC-Assay bestätigt, dass sie auf die jeweiligen nachzuweisenden Proteasen zurückzuführen ist. Insbesondere scheinen die in Neutrophilen Granulozyten ebenfalls enthaltenen Metalloelastasen sowie Aminopeptidasen, welche ebenfalls das CathC-Substrat (H-GA-AMC) spalten könnten, keinen wesentlichen Einfluss auf die Assays zu haben. Die dagegen im PR3-Assay beobachtete höhere Restaktivität kann dadurch bedingt sein, dass eine andere Protease das FRET-Substrat an einer der vergleichsweise hohen Anzahl potenzieller Spaltstellen spaltet. Angesichts der Tatsache, dass die detektierte Aktivität nach Zugabe der Inhibitoren in allen Assays weniger als 10 % beträgt zeigt, dass mit den Assays ausreichend spezifische Messungen möglich sind. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die HNE- und PR3-Assays auch im Lysat zwischen den beiden Proteasen diskriminieren.

#### **4.2.3 Stabilität der Zelllysate Neutrophiler Granulozyten**

Zur Überprüfung der Stabilität und Lagerungsfähigkeit der Zelllysate wurde die Aktivität aller vier Proteasen in den Proben nach einem, zwei und drei Zyklen des Einfrierens und Auftauens gemessen. Für diesen Versuch wurden jeweils drei Lysat-Aliquots (s. Kap. 4.2.1) von sechs Probanden hergestellt, wovon je zwei Proben ein bzw. zwei weitere Male aufgetaut und wieder eingefroren (- 20°C) wurden. Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurden alle Lysate gemeinsam aufgetaut, in Triplikaten in eine 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt und die Messung durch die Zugabe der Substrat-Puffer-Lösung gestartet.

Im Vergleich zur Messung nach dem ersten Frier-Tau-Zyklus wurde in den Messungen des HNE-, PR3- und CathC-Assays nach zwei und drei Zyklen im Durchschnitt die gleiche oder eine etwas höhere Aktivität beobachtet (119 ± 4 % und 122 ± 4 %, 104 ± 4% und 100 ± 4 %, 118 ± 17 % und 112 ± 10 % nach 2 und 3 Frier-Tau-Zyklen) (s. Abb. 4.9). Nur im CathG-Assay ist die Aktivität nach zwei- bzw. dreimal Frieren und Tauen im Mittel geringer als nach dem ersten Zyklus (87 ± 18 % bzw. 92 ± 11 %). Diese Abnahme ist allerdings insbesondere auf eine Probe zurückzuführen, die im Vergleich zur initialen Messung eine um 30 % geringere Aktivität zeigt.



**Abbildung 4.9: Bestimmung der Lagerungsstabilität von Lysaten Neutrophiler Granulozyten.**

Jeweils drei Zelllysate (1000 Zellen/ $\mu$ l) jedes Probanden wurden 1, 2 bzw. 3 Zyklen des Frierens und Tauens unterzogen und anschließend die enzymatische Aktivität bestimmt. Darstellung als Mittelwert  $\pm$  SD von technischen Triplikaten der 6 (HNE, PR3, CathC) bzw. 5 (CathG) Probanden.

Insgesamt ergeben die Aktivitätsmessungen nach ein bzw. zwei Frier-Tau-Zyklen im Vergleich zur ersten Messung überwiegend ähnliche oder etwas höhere Werte. Da die durchschnittliche Abweichung der Messwerte aller fünf bzw. sechs Proben eine Zu- oder Abnahme der Aktivität von 20 % in keinem der Assays überschritt, wurde die Stabilität als ausreichend bewertet, um die Proben für weitere Untersuchungen zu lagern. Die beobachteten Zunahmen könnten durch eine initial unvollständige Lyse und fortschreitendes Aufbrechen von Zellstrukturen und Granula durch mehrmaliges Einfrieren bedingt sein. Da das Lyse-Vorgehen möglichst zeitsparend und für die gleichzeitige Verarbeitung mehrerer Proben geeignet sein sollte, haben wir derzeit davon abgesehen, zusätzliche Inkubationsschritte bei - 20 °C in unser Lyse-Protokoll zu integrieren.

### 4.3 Weiterführende Evaluation der Assays

In den vorangegangenen Versuchen war die Eignung der Assays für den quantitativen Nachweis der Granula-assoziierten Serinproteasen sowie von Cathepsin C mit isolierten Enzymen und in Lysaten Neutrophiler Granulozyten bestätigt worden. Nachdem außerdem

gezeigt wurde, dass die Lysat-Proben lagerungsstabil sind, wurden jetzt zusätzliche Proben von Probanden zur weiteren Evaluation der Assays herangezogen. Dabei sollte die Anwendbarkeit der Assays für die Charakterisierung der Proteasen untermauert und der Einfluss weiterer potenzieller Störfaktoren untersucht werden

#### **4.3.1 Zellisolation**

Zunächst wurden Blutproben von weiteren 22 Probanden aufgearbeitet. Dazu wurde analog zum Vorgehen in Kapitel 4.2.1 EDTA-Vollblut entnommen, Neutrophile Granulozyten mittels immunomagnetischer Depletion isoliert und verbleibende Erythrozyten durch hypotone Lyse reduziert. Insbesondere auf Grund der limitierten Plätze im Separationsmagneten und dem zeitlichen Ablauf des Isolationsprotokolls wurden dabei maximal 8 Blutproben gleichzeitig prozessiert. Nach der CASY-Zellzählung wurden die Neutrophilen Granulozyten bei einer Dichte von 1000 Zellen/ $\mu$ l in Lysepuffer aufgenommen und anschließend je Proband zwischen einem und vier Aliquots (1 ml) bei - 80 °C zur weiteren Analyse eingefroren. Zusammen mit den 6 initial aufgearbeiteten Proben (s. Kap. 4.2.1) standen damit insgesamt 28 Probanden für alle weiteren Experimente zu Verfügung.

#### **4.3.2 Auswertung des Differentialblutbildes**

Um den Gesundheitszustand der Probanden zu bewerten, wurde parallel zur Zellisolation maschinelle Blutbilder angefertigt und anhand der aktuell am Klinikum verwendeten labordiagnostischen Referenzbereiche ausgewertet (s. Tab. 4.1).

Bei fünf Probanden liegen auffällige Laborparameter vor. Eine weibliche Probandin zeigt eine verminderte Leukozyten- und Neutrophilenzahl (3,25 bzw. 1,63 G/l) sowie eine hypochrome, mikrozytäre Anämie (Hb 10,9 mg/dl; MCH 24,2; MCV 74,7) mit normwertiger Thrombozytenzahl (279 G/l). Eine weitere weibliche Probandin sowie ein männlicher Proband weisen eine reduzierte Erythrozytenzahl (3,89 bzw. 4,39 T/l) bei normwertigem Hämoglobinwert (11,5 bzw. 13,8 mg/dl) auf. Darüber hinaus wird bei einer Studentin eine Thrombozytose (402 G/l) sowie bei einem anderen Studenten eine Thrombozytopenie (138 G/l) nachgewiesen. Die restlichen Resultate sind mit den Referenzwerten (s. Tab. 4.1) zu vereinbaren. Die beobachteten Abweichungen sind im Hinblick auf die Referenzbereiche, die per definitionem 95% der Bevölkerung abbilden, erwartbar. Da sich zudem alle Probanden zum Blutentnahme-Zeitpunkt klinisch gesund präsentierten, wurden alle Proben in die Auswertung eingeschlossen.

– Ergebnisse –

Blutbild	Probandenwerte				Referenzbereiche	
	MW ± SD		Median		w	m
	w	m	w	m		
Leukozyten (G/l)	7,5 ± 1,9	6,8 ± 1,7	7,4	6,8	4,00 – 10,40	3,90 – 9,80
Erythrozyten (T/l)	4,5 ± 0,4	5,1 ± 0,4	4,5	5,1	3,96 – 5,16	4,54 – 5,77
Hämoglobin (g/dl)	13,2 ± 1,0	15,1 ± 0,8	13,4	15,2	11,5 – 15,4	13,5 – 17,5
Hämatokrit (l/l)	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0	0,4	0,4	0,346 – 0,453	0,396 – 0,506
MCV (fl)	84,8 ± 4,4	85,5 ± 2,6	85,6	85,5	80,0 – 95,5	80,0 – 95,5
MCH (pg)	29,4 ± 2,1	29,8 ± 1,0	29,5	29,5	26,1 – 32,6	27,6 – 32,8
MCHC (g/dl)	34,7 ± 1,1	34,8 ± 0,7	34,7	35,0	31,9 – 35,5	32,8 – 36,6
Thrombozyten (G/l)	286,0 ± 52,9	238,8 ± 41,4	287,5	242,0	176 – 391	146 – 328
Normoblasten (/100 Leu)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0	0,0	0,0	≤ 1,0	≤ 1,0
RDW–CV (%)	13,1 ± 1,2	12,8 ± 0,6	13,0	12,7	12,1 – 14,8	12,1 – 14,8
PDW (fl)	12,3 ± 2,3	11,8 ± 1,6	12,0	11,5	10 – 15	10 – 16
MPV (fl)	10,6 ± 1,0	10,3 ± 0,7	10,6	10,1	9,2 – 12,5	9,2 – 12,5
Differential–BB (maschinell)						
Neutrophile Granulozyten (%)	56,5 ± 7,1	56,8 ± 6,7	56,5	58,5	40 – 70	40 – 70
Lymphozyten (%)	34,6 ± 6,1	31,0 ± 4,7	35,5	31,0	18 – 46	19 – 48
Monozyten (%)	6,8 ± 1,8	9,1 ± 2,6	6,5	8,5	4 – 12	5 – 15
Eosinophile Granulozyten (%)	1,6 ± 1,3	2,3 ± 1,9	1,0	1,0	≤ 5	≤ 8
Basophile Granulozyten (%)	0,6 ± 0,5	1,0 ± 0,7	1,0	1,0	≤ 1	≤ 1
Neutrophile Granuloz. (abs.) (G/l)	4,3 ± 1,4	3,8 ± 1,1	4,5	3,6	1,91 – 7,37	1,78 – 6,23
Lymphozyten (abs.) (G/l)	2,5 ± 0,6	2,1 ± 0,8	2,3	1,9	1,22 – 3,56	1,05 – 3,24
Monozyten (abs.) (G/l)	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,5	0,6	0,25 – 0,85	0,26 – 0,87
Eosinophile Granuloz. (abs.) (G/l)	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1	0,1	0,03 – 0,44	0,03 – 0,44
Basophile Granuloz. (abs.) (G/l)	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0	0,0	0,01 – 0,08	0,01 – 0,08

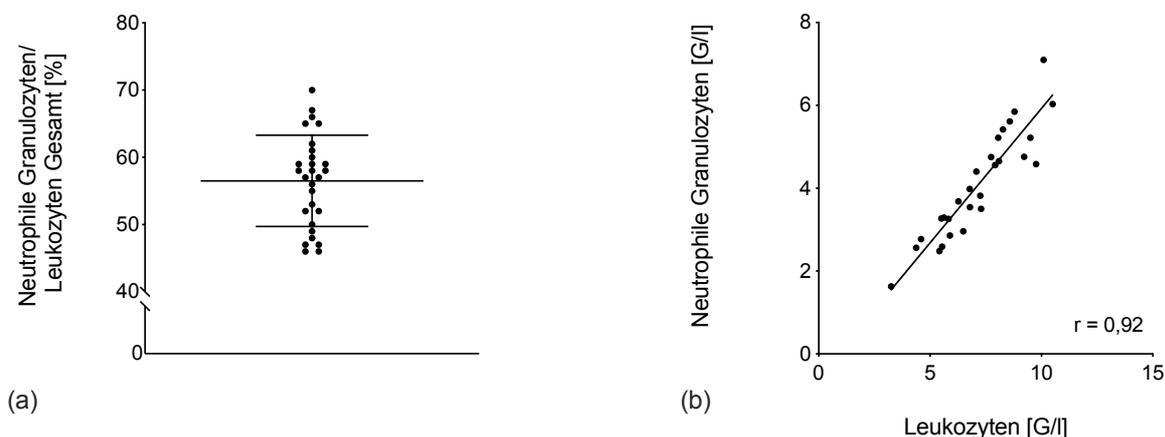
**Tabelle 4.1: Auswertung der maschinellen Blutbilder der 28 Probanden**

### 4.3.3 Berechnung der Isolations-Effizienz

Um Aufschluss über die Anzahl der Neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut bzw. in den akquirierten Blutproben zu erhalten und die Effizienz des Isolationsvorgehens zu bewerten, wurden die mittels des maschinellen Differentialblutbilds ermittelten Leukozytenzahlen mit denen der CASY-Zellzählung nach der Leukozytenisolation verglichen.

Die Auswertung der Blutbilder zeigt eine durchschnittliche Leukozytenzahl von  $7,2 \pm 1,8$  G/l (männlich und weiblich,  $n = 28$ ) (Referenzbereich: 3,9 – 10,4 G/l), wobei die Werte von 3,25 G/l bis 9,50 G/l reichen. Die Gesamtzahl Neutrophiler Granulozyten beläuft sich bei  $4,1 \pm 1,3$  G/l

(Referenzbereich: 1,8 – 7,4 G/l) und der prozentuale Anteil der Neutrophilen Granulozyten an der Gesamtleukozytenzahl beträgt  $60 \pm 7\%$  (s. Abb. 4.10 a). Die Menge der zirkulierenden Neutrophilen Granulozyten verhält sich dabei proportional zur Leukozytenzahl ( $r = 0,92$ ) (s. Abb. 4.10 b).

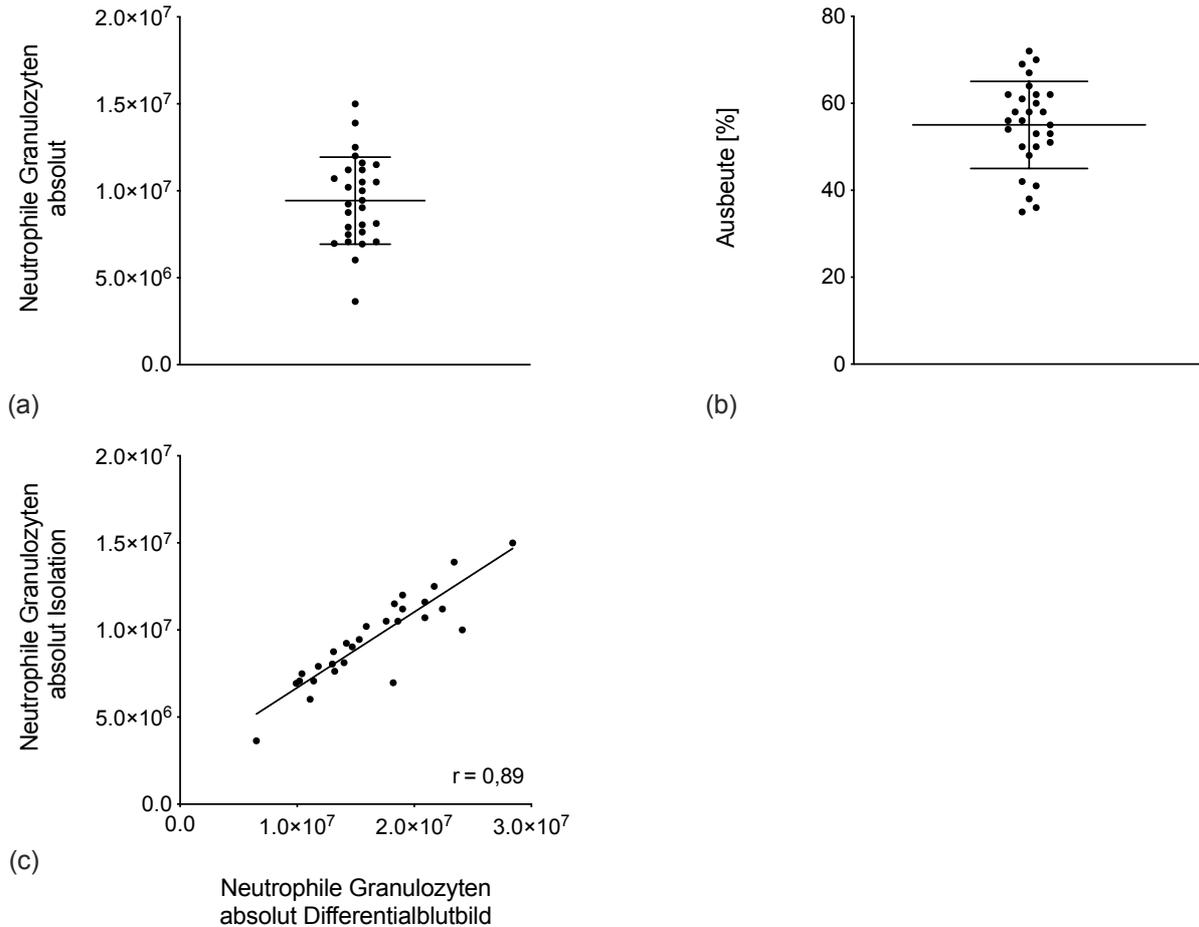


**Abbildung 4.10: Analyse der Ergebnisse des maschinellen Differentialblutbildes.**

(a) Anteil der Neutrophilen Granulozyten an der Gesamtzahl der Leukozyten. Mittelwert  $\pm$  SD. (b) Korrelation der Gesamtzahl Neutrophiler Granulozyten mit der Gesamtzahl der Leukozyten. Darstellung der Regressionsgeraden,  $n = 28$  Probanden.

Aus 4 ml Ausgangsmaterial (EDTA-Vollblut) waren 7 ml Isolat hergestellt worden (s. Kap. 4.2.1). Die CASY-Zellzählung ergab im Durchschnitt eine Gesamtzahl von  $9,4 \pm 2,5 \times 10^6$  ( $3,6 \times 10^6 - 1,5 \times 10^7$ ) Neutrophilen Granulozyten in den Isolaten und damit eine Konzentration von durchschnittlich  $1,4 \pm 0,4 \times 10^6$  Zellen pro ml ( $5,2 \times 10^5 - 2,1 \times 10^6$ ) (s. Abb. 4.11 a). Die Ergebnisse variieren damit um den Faktor 4.

Ausgehend von den Werten des maschinellen Blutbildes errechnet sich eine durchschnittliche Anzahl von  $1,6 \pm 0,5 \times 10^7$  Neutrophilen Granulozyten pro 4 ml Vollblut. Setzt man dieses Ergebnis ins Verhältnis zu den Messwerten der CASY-Messung zeigt sich, dass durchschnittlich  $55 \pm 10\%$  der in den Blutproben enthaltenen Neutrophilen Granulozyten experimentell isoliert wurden (s. Abb. 4.11 b). Die Korrelation der Ergebnisse beider Verfahren zeigt eine signifikante positive Abhängigkeit ( $r = 0,89$ ) (s. Abb. 4.11 c).



**Abbildung 4.11: Bestimmung der Zellzahl und der Effizienz der Neutrophilen-Isolierung.**

(a) Die Gesamtzahl, der aus 4 ml Vollblut isolierten Neutrophilen Granulozyten wurde basierend auf den Werten der CASY-Zellzählung berechnet. (b) Berechnung der Isolations-Effizienz durch Bildung des Quotienten aus der Anzahl der isolierten Neutrophilen Granulozyten und des Absolutwertes der Neutrophilen Granulozyten des Differentialblutbildes. (c) Korrelation der Mengen isolierter Neutrophiler Granulozyten mit den Werten des maschinellen Differentialblutbildes. Alle Angaben als Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 28$ .

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit der verwendeten Isolationsmethode bei allen 28 Probanden ausgehend von 4 ml Vollblut über 3,5 Millionen Neutrophile Granulozyten isoliert wurden. Die Effizienz der Isolationsmethode ist mit 55 % zufriedenstellend. Die Korrelation zeigt, dass eine größere Anzahl Neutrophiler Granulozyten im Ausgangsmaterial mit einer höheren Zahl isolierter Zellen einhergeht. Bei vergleichbarer Isolations-Effizienz lassen sich daher die unterschiedlichen Mengen der isolierten Zellen je Proband durch die individuell variierenden Werte der tatsächlich zirkulierenden Neutrophilen erklären. Da die Durchführung der Assays wesentlich geringere Zellzahlen (200.000) erfordert, wäre in Zukunft zu überprüfen, ob eine deutlich kleinere Blutprobe ausreichend ist.

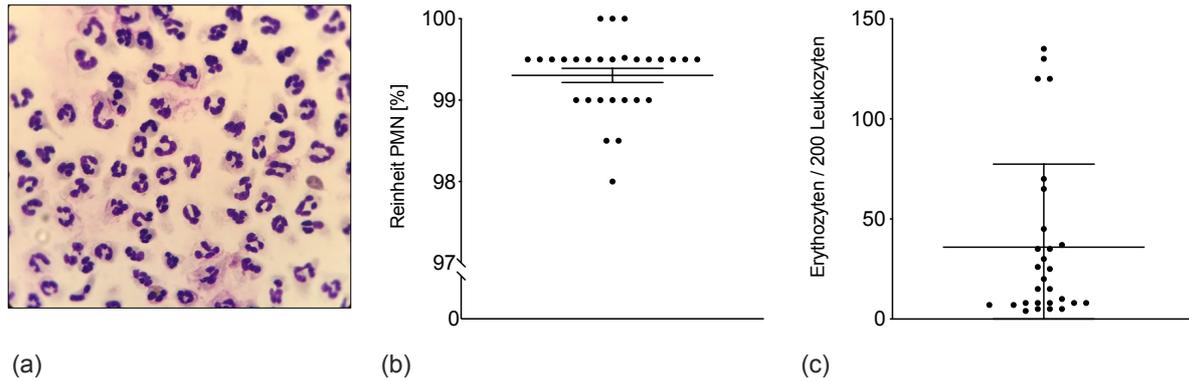
#### 4.3.4 Bestimmung der Reinheit der Proben

Um die Reinheit der isolierten Neutrophilen Granulozyten zu überprüfen, wurden Cytospins aus den Isolaten hergestellt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Dazu wurden unmittelbar im Anschluss an die Zellisolation Aliquots (200  $\mu$ l) der Zellsuspension auf eine Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt und mittels einer Cyto-Zentrifuge (29 x g, RT, 10 min) Cytospins angefertigt (s. Kap. 3.2.6). In Vorversuchen wurde gezeigt, dass der Einsatz von 100.000 Zellen pro Cytokammer zu der gewünschten einschichtigen Verteilung auf den Objektträgern führt. Die Cytospins wurden durch Trocknung fixiert und anschließend mit einer Haema-Schnellfärbung gefärbt. Die angefertigten Cytospins wurden abschließend bei 100-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch beurteilt. Pro Slide wurden dazu 200 Leukozyten sowie die Anzahl von residualen Erythrozyten im gleichen Bereich gezählt.

Die lichtmikroskopische Analyse zeigt, dass die einzelnen Zellen adäquat angefärbt und gut voneinander zu differenzieren sind (s. Abb. 4.12 a). Lediglich wenig Zelldebris ist zu sehen. Die Sichtung von 200 Leukozyten ergibt durchschnittlich  $198,9 \pm 1,7$  Neutrophile Granulozyten sowie  $1,4 \pm 0,9$  mononukleäre Zellen pro Objektträger. Die Reinheit aller Proben beträgt damit im Durchschnitt  $99 \pm 0,5$  % bzw. bei allen Proben  $> 98$  % (s. Abb. 4.12 b). Die Auszählung der Erythrozyten zeigt im Mittel  $35,9 \pm 42$  Zellen pro 200 Leukozyten (s. Abb. 4.12 c). Dabei liegen im Großteil (21 von 28) der Proben  $\leq 35$  Erythrozyten im bewerteten Bereich vor, während vier der Proben eine deutlich höhere Zahl aufweisen (120 - 135 Erythrozyten / 200 Leukozyten).

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die Zellisolation mit hoher Zuverlässigkeit vorwiegend Neutrophile Granulozyten gewonnen wurden. Auch durch mehrere hypotone Lysen war die Elimination von Erythrozyten nicht in allen Fällen ausreichend; die vier Isolate mit mehr als 120 Erythrozyten können am ehesten darauf zurückgeführt werden, dass während der Abnahme des Neutrophilen-haltigen Überstands im Separations-Magneten zu viele Erythrozyten aus dem Bodensatz mit der Pipette erfasst wurden und die Volumina der Reagenzien der hypotonen Lyse für größere Mengen dann nicht ausreichen.

— Ergebnisse —



**Abbildung 4.12: Untersuchung der Reinheit der Isolate.**

(a) Aus den Isolaten wurden mittels Cytospin-Technik Präparate mit einer Monolayer-Schicht Neutrophiler Granulozyten hergestellt, gefärbt (Haema-Schnellfärbung) und anschließend lichtmikroskopisch beurteilt. (b) Bestimmung der Reinheit durch Bewertung des Anteils Neutrophiler Granulozyten an 200 beurteilten Leukozyten. (c) Absolute Anzahl von Erythrozyten im Bereich von 200 gezählten Leukozyten. Jeweils ist auch der Mittelwert  $\pm$  SD angegeben.

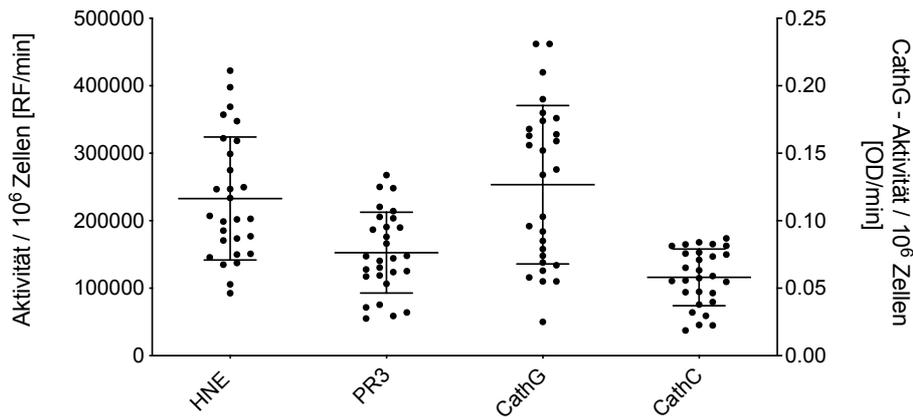
#### 4.3.5 Messung der Aktivität der GASPIDs und von Cathepsin C

Nachdem neben der ausführlichen Überprüfung des Assayverfahrens (s. Kap. 4.1.1 – 4.2.3) auch der Erfolg der Zellisolation hinsichtlich Effizienz und Reinheit (s. Kap. 4.3.3 bzw. 4.3.4), sowie der Gesundheitszustand der Probanden (s. Kap. 4.3.2) geprüft worden war, wurde schließlich die enzymatische Aktivität in den Lysaten aller 28 Probanden mit den vier Assays gemessen.

Hierfür wurden die Proben aufgetaut und entsprechende Verdünnungen hergestellt, um die in den Vorversuchen festgelegten Zellzahlen bzw. Lysatmenge pro Well (10.000, 2000, 20.000 bzw. 20.000 Zellen für den HNE-, PR3-, CathG- bzw. CathC-Assay) vorzulegen (s. Kap. 4.2.1); bei einigen Proben wurden im CathG-Assay abweichend 5000 Zellen verwendet. Die Messung der Aktivität wurde nach üblicher Vorgehensweise durch die Zugabe der jeweiligen Substrat-Puffer-Mischung gestartet. Für jede Probe sind die Messungen in technischen Triplikaten durchgeführt worden.

In allen 28 Proben und in jeweils allen vier Assays wurde enzymatische Aktivität nachgewiesen. Die durchschnittliche Aktivität pro  $10^6$  Zellen im Test betrug dabei im HNE-Assay  $233.000 \pm 90.000$  RFU/min, im PR3-Assay  $153.000 \pm 60.000$  RFU/min, im CathG-Assay  $0,13 \pm 0,06$  OD/min und im CathC-Assay  $116.000 \pm 42.000$  RFU/min (s. Abb. 4.13).

– Ergebnisse –



**Abbildung 4.13: Ergebnisse der Aktivitätsmessung der GASPIDs und von Cathepsin C bei 28 Probanden.** Die Messwerte der CathG Messung sind gegen die sekundäre y-Achse aufgetragen. Jeweils ist auch der Mittelwert  $\pm$  SD angegeben.

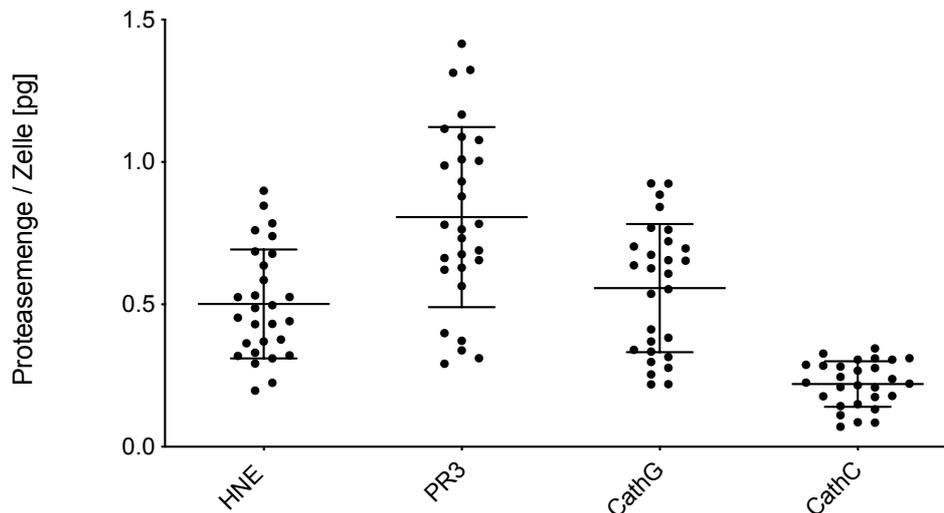
Diese Ergebnisse zeigen, dass in allen Lysaten der Probanden die Aktivität aller vier Proteasen nachgewiesen werden kann. Definiert man einen Messwert als Ausreißer, wenn dieser sich um mehr als zwei Standardabweichungen vom Mittelwert der Triplikate unterscheidet, sind unter diesen etwa 300 Messwerten erfreulicherweise keine aufgetreten. Dennoch ist der Einsatz von technischen Triplikaten sinnvoll, da bei den enzymkinetischen Untersuchungen im Verlauf des Projekts gelegentlich Ausreißer z.B. durch das Auftreten von Temperaturschwankungen oder das Vorhandensein von Luftblasen aufgetreten sind.

#### 4.3.6 Quantifizierung der GASPIDs und von Cathepsin C

Um die in den Neutrophilen Granulozyten der 28 Probanden absolut vorhandenen Mengen der Granula-assoziierten Serinproteasen sowie deren Aktivator CathC zu bestimmen, wurden bei den Messungen der Lysate jeweils isolierte Proteasen (HNE 1 nM, PR3 0,5 nM, CathG 2,5 nM, CathC 1 nM) und Nullwerte (Puffer, Lysepuffer) als Standard mitgeführt.

Basierend auf der enzymatischen Aktivität dieser Standards wurde zunächst die an den jeweiligen Messtagen gültige Aktivität pro nM der einzelnen Proteasen bestimmt. Bei einem Molekulargewicht der Proteasen von  $\sim$  30 kDa (HNE, PR3 und CathG) bzw.  $\sim$  50 kDa (CathC) entspricht 1 nM isolierter Protease 30 bzw. 50 ng/ml und damit 6 ng bzw. 10 ng pro Well (200  $\mu$ l) einer Mikrotiterplatte. Auf dieser Grundlage wurde anschließend die Aktivität pro ng Standard errechnet. Die Bildung des Quotienten aus der Aktivität pro Zelle der einzelnen Probanden und der Aktivität der isolierten Proteasen pro ng ergibt schließlich die absoluten Mengen der Proteasen pro Zelle, die abschließend zur besseren Darstellung in pg/Zelle umgerechnet wurden.

Die auf diese Weise berechnete Gesamtmenge der Proteasen pro Neutrophiler Granulozyt beläuft sich für HNE bei  $0,5 \pm 0,2$  pg, für PR3 bei  $0,8 \pm 0,3$  pg, für CathG bei  $0,6 \pm 0,2$  pg und für CathC bei  $0,2 \pm 0,07$  pg (s. Abb. 4.14). Die Ergebnisse unterscheiden sich um den Faktor 4 bis 5 innerhalb der einzelnen Probanden; im HNE-Assay reichen die Werte pro Zelle von 0,2 - 0,9 pg, im PR3-Assay von 0,3 - 1,4 pg, im CathG-Assay von 0,2 - 0,9 und im CathC-Assay von 0,07 - 0,34 pg. Die größte Spanne zeigte sich bei den Ergebnissen der PR3-Messungen. Zusammenfassend wird deutlich, dass die durchschnittlichen Gesamtmengen der drei GASPIDs und von Cathepsin C in der gleichen Größenordnung liegen und nur um den Faktor 4 variieren. Zudem zeigt sich, dass die Proteasen bei einer Gesamtproteinmenge in Neutrophilen Granulozyten von  $\sim 26$  pg (s. Kap. 4.3.7.2) mit insgesamt  $\sim 2$  pg etwa 10 % des Proteingehalts pro Zelle ausmachen.



**Abbildung 4.14: Quantifizierung der GASPIDs und von Cathepsin C bei 28 Probanden.**  
Berechnung über einen parallel quantifizierten Standard der isolierten Proteasen. Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 28$ .

#### 4.3.7 Validierung der Zellzählung

Grundlage für alle Bestimmungen und Berechnungen ist die Kenntnis der Anzahl der Neutrophilen Granulozyten, die zur Herstellung der Lysate verwendet wurde. Diese wurden initial durch die Zählung mit dem CASY-Zellzählgerät bestimmt (s. Kap. 4.2.1). Da eine fehlerhafte Zellzählung zu fehlerbehafteten Messungen bzw. Berechnungen führen, wurde die Vergleichbarkeit der Proben bezüglich ihrer Konzentration auf drei unabhängigen Wegen überprüft.

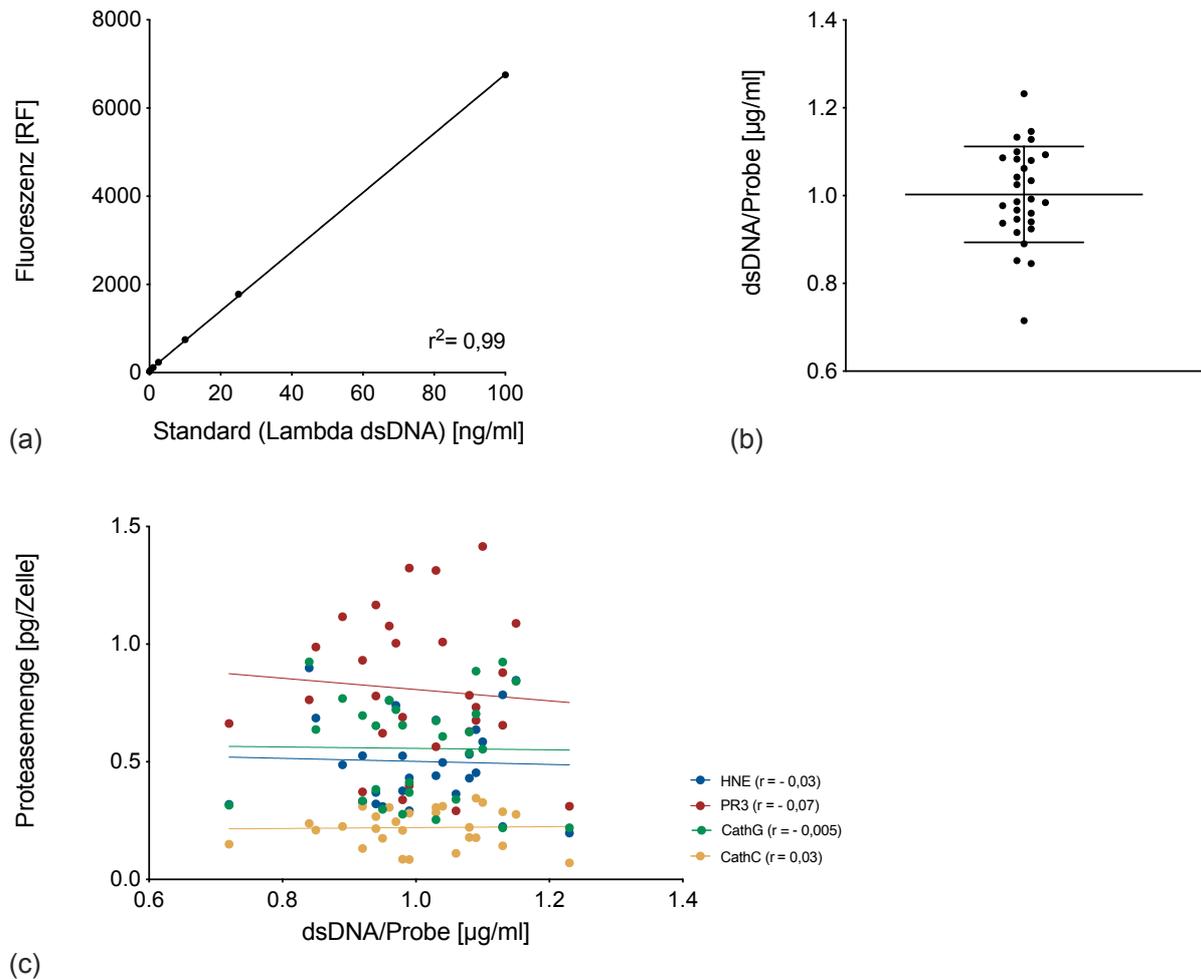
#### 4.3.7.1 Bestimmung des DNA-Gehalts in den Proben

Um die mit dem CASY-Zählgerät bestimmte Zellzahl zu überprüfen, wurde zunächst der dsDNA-Gehalt in den Lysatproben aller 28 Probanden bestimmt. Dazu wurde jeweils 5  $\mu\text{l}$  Zelllysat ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) und 95  $\mu\text{l}$  TE-Puffer pro Well einer Mikrotiterplatte vorgelegt und diese Suspension dann mit 100  $\mu\text{l}$  des PicoGreen Farbstoffs (200x in DMSO, Höchst) inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz der Proben bei einer Exzitationswellenlänge und Emissionswellenlänge von 480 bzw. 520 nm gemessen (s. Kap. 3.2.7). Über eine Lambda-dsDNA-Standardkurve (0,25 - 1000 ng/ml) wurden die absoluten dsDNA-Mengen pro Probe mittels GraphPad Prism interpoliert.

Die Standardkurve (s. Abb. 4.15 a) zeigt eine ausreichende Linearität ( $r^2 = 0,99$ ) für eine valide Interpolation. Die Messung ergab im Durchschnitt  $50 \pm 5,4$  ng/ml dsDNA in den verdünnten Proben, sodass auf das Vorliegen eines dsDNA-Gehalts von  $1 \pm 0,1$   $\mu\text{g/ml}$  bzw.  $1 \pm 0,1$  pg/Zelle in den ursprünglichen Proben zurückgerechnet werden kann (s. Abb. 4.15 b). Der Literatur sind Werte in der gleichen Größenordnung zu entnehmen [168]. Der Variationskoeffizient der dsDNA-Bestimmungen der 28 Proben liegt bei 11 %; da der dsDNA-Gehalt aller Neutrophilen Granulozyten identisch sein sollte, kann man also davon ausgehen, dass auch die Zellzahlen in den Proben ähnlich sind bzw. um ca. 11 % streuen. Da die Durchführung des dsDNA-Assays als zweiter Assay eine zusätzliche Variabilität bedingt, liegt die Variation der tatsächlich in den Proben enthaltenen Zellzahl eher unter 10 %.

In einer weiterführenden Analyse wurde der dsDNA-Gehalt der Proben mit den zuvor bestimmten Mengen der Proteasen verglichen. Die Korrelation zeigt keine Abhängigkeiten; der Korrelationskoeffizient für alle vier Proteasen liegt annäherungsweise bei 0 (s. Abb. 4.15 c). Dieses Ergebnis bestätigt ebenfalls die Validität der Zellzählung; würden niedrigere bzw. höhere dsDNA-Gehalte mit jeweils niedrigeren bzw. höheren Proteasemengen in den Proben einhergehen, wäre zu vermuten, dass unterschiedliche Zellzahlen in den Proben vorliegen und die initiale Präparation der Lysate nicht verlässlich gelungen wäre. Zusammenfassend zeigen die dsDNA-Bestimmungen, dass die Zellzählung mittels CASY-Messung (vermutlich) weniger als 10 % fehlerbehaftet ist und die Berechnungen im Rahmen der Mengenbestimmung dadurch nicht maßgeblich beeinflusst werden.

— Ergebnisse —



**Abbildung 4.15: Bestimmung der dsDNA in den Zelllysaten.**

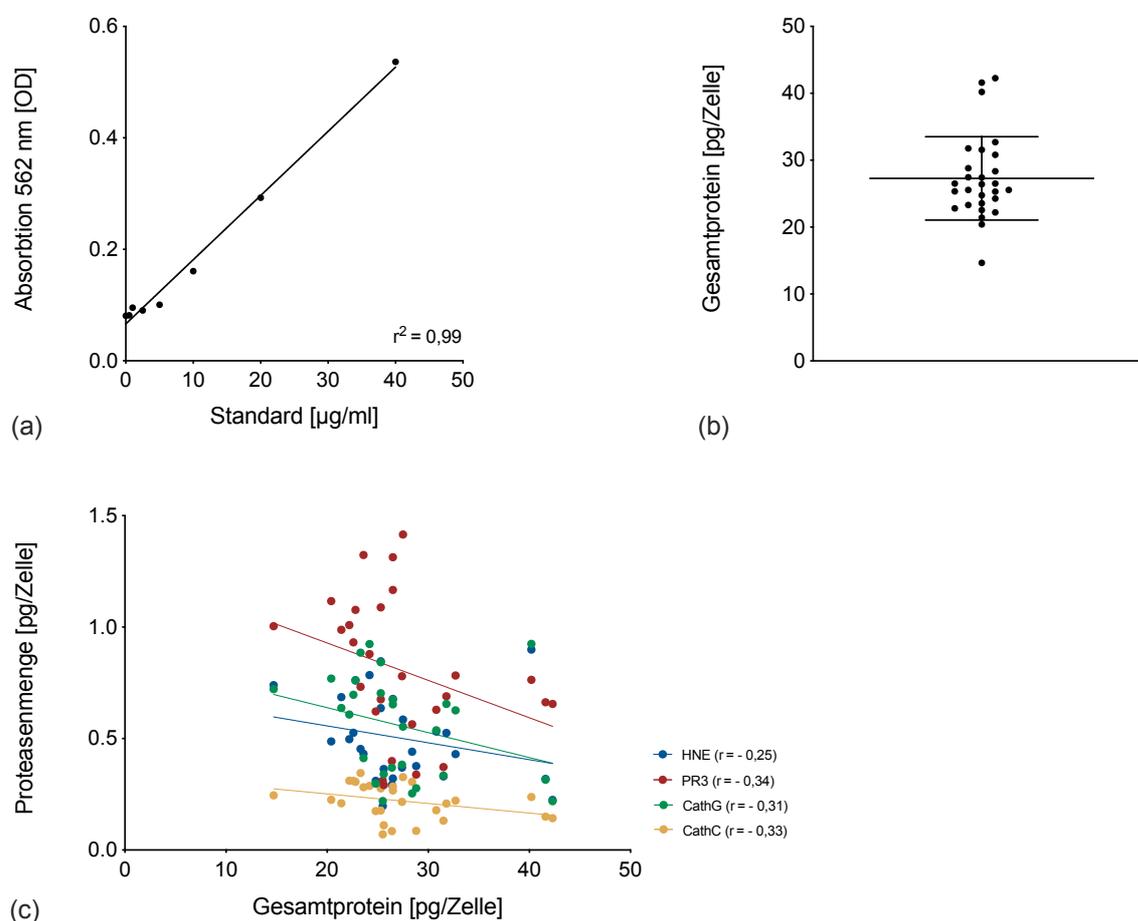
Die Zelllysate aller 28 Probanden wurde mit dem Farbstoff PicoGreen (Hoechst) versetzt und anschließend die Fluoreszenz (Ex 480 nm / Em 520 nm) gemessen. (a) Lambda dsDNA - Standardkurve (b) dsDNA-Gehalte pro Probe. Die Werte wurden anhand der Standardkurve interpoliert. Alle Messungen in Duplikaten; Angabe von Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 28$ . (c) Korrelation der DNA-Gehalte in den Proben mit den jeweils entsprechenden Ergebnissen der Mengenbestimmung der Proteasen. Angabe der Regressionsgeraden und der Korrelationskoeffizienten.

#### 4.3.7.2 Bestimmung des Gesamtproteingehalts

In einem weiteren Ansatz zur Überprüfung der Zellzählung wurde die Proteinkonzentration in den 28 Proben mittels Micro-BCA ermittelt. Hierfür wurden zunächst Lysate hergestellt ( $2 \times 10^4$  Zellen/ml) und 1:20 in Diluent verdünnt. Diese wurden dann zusammen mit Albumin-Standards mit der entsprechend dem Herstellerprotokoll angefertigten Bicinchoninsäurehaltigen Reaktions-Lösung in einer transparenten Mikrotiterplatte versetzt, bei  $37^\circ \text{C}$  für 2 Stunden inkubiert (s. Kap. 3.2.8) und anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 526 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde abschließend durch Interpolation anhand der Standardkurve ermittelt (s. Abb. 4.16 a).

Die Ergebnisse zeigen, dass eine durchschnittliche Protein-Konzentration von  $27 \mu\text{g/ml}$  in den analysierten Proben enthalten ist. Auf dieser Grundlage lässt sich eine durchschnittliche Menge von  $27,3 \pm 6,2 \text{ pg}$  Protein pro Neutrophiler Granulozyt errechnen (s. Abb. 4.16 b). Nimmt man vier Ausreißer aus der Auswertung, sinkt der Durchschnitt geringfügig auf  $26,1 \pm 3,3 \text{ pg/Zelle}$  und der Variationskoeffizient sinkt von 23 auf 13 %. Dies steht in Übereinstimmung mit vorbeschriebenen Werten [169].

Der Vergleich der Bestimmung des Gesamtproteins und der Proteasen zeigt ohne und mit Berücksichtigung der Ausreißer für alle vier Proteasen eine nicht signifikante negative Korrelation (HNE  $r = -0,25$  bzw.  $-0,27$ ; PR3  $r = -0,34$  bzw.  $-0,33$ ; CathG  $r = -0,31$  bzw.  $-0,38$ ; CathC  $r = -0,33$  bzw.  $-0,35$ ) (s. Abb. 4.16 c).



**Abbildung 4.16: Bestimmung des Gesamtproteingehaltes in den Lysaten.**

Zelllysate von allen 28 Probanden wurden mittels Micro-BCA Assay analysiert. (a) Standardkurve mit bovinem Serum Albumin (b) Gesamtproteingehalt pro Zelle. (c) Korrelation des Proteingehalts mit der Proteasemenge in den Proben.  $n = 28$ . Alle Messungen in Duplikaten. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SD.

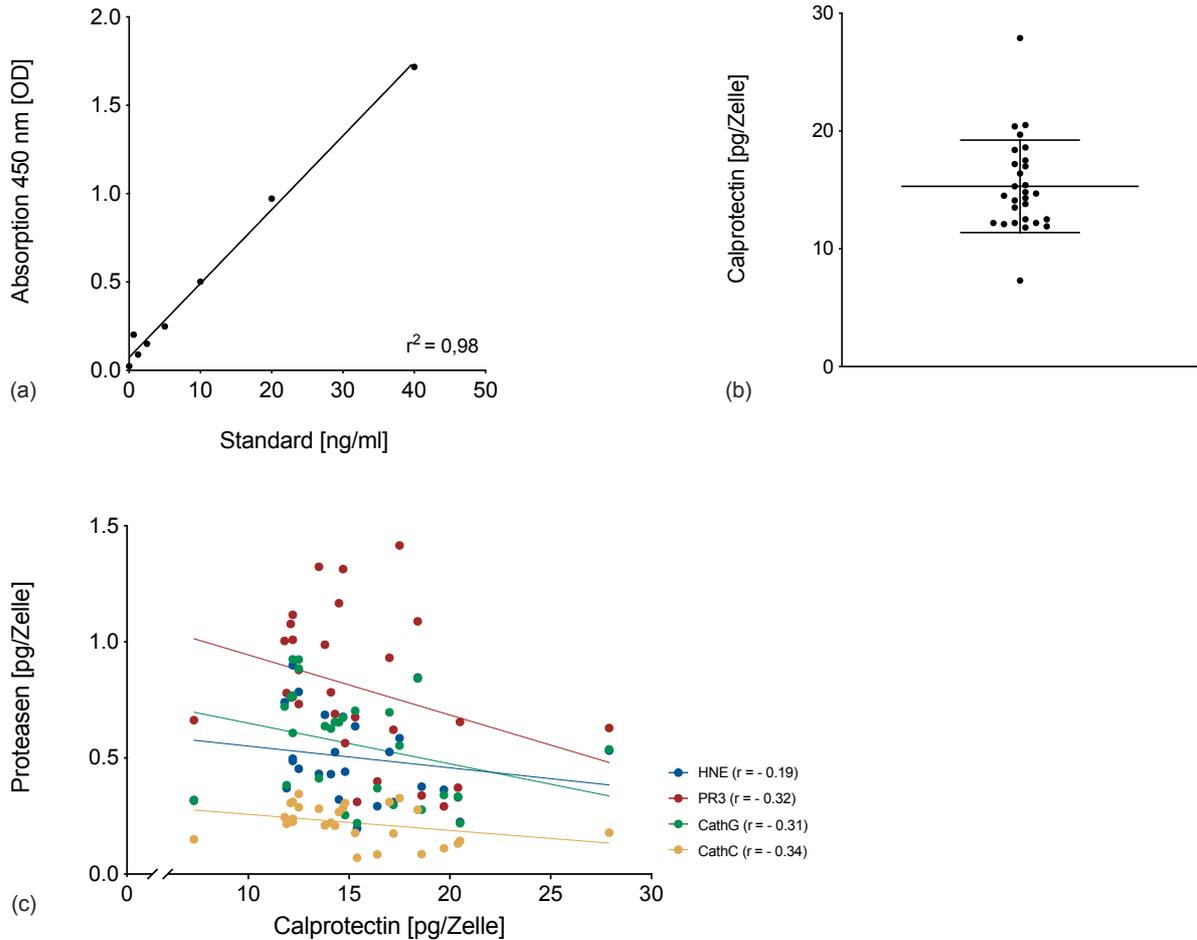
Analog zur Bestimmung des dsDNA-Gehalts zeigen diese Ergebnisse, dass die CASY-Messung vermutlich mit einem Fehler von  $\leq 13\%$  behaftet ist. Die geringe negative Korrelation bedeutet, dass höhere Proteingehalte in den Lysaten mit geringeren Mengen der Proteasen respektive einer geringeren enzymatischen Aktivität einhergehen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass letztlich alle enthaltenen Proteine konkurrierende Substrate im Aktivitätsassay darstellen und damit die Messung negativ beeinflussen.

#### 4.3.7.3 Bestimmung von Calprotectin

Calprotectin ist ein zytosolisches antimikrobielles Protein und soll in Neutrophilen Granulozyten etwa 30 - 40 % des zytosolischen Proteins ausmachen [170]. Soweit bekannt ist die Expression nicht reguliert, sodass der Calprotectin-Gehalt in Neutrophilen vergleichbar sein sollte. Da zudem ein Immunoassay zur Bestimmung verfügbar ist, wurde die Quantifizierung von Calprotectin eingesetzt, um die Zellzählung weiter zu verifizieren.

Dazu wurden zunächst Zelllysate aller 28 Probanden (1000 Zellen/ $\mu\text{l}$ ) 1:3000 in Assaypuffer vorbereitet und Verdünnungen des Calprotectin-Standards (0,625 - 20 ng/ml) hergestellt. Es folgte die Inkubation von je 50  $\mu\text{l}$  Probe bzw. Standardlösung in Blockierungs-Puffer über die Dauer von 2 Stunden bei Raumtemperatur. Abschließend wurde die Calprotectin-Konjugat-Lösung hinzugegeben und nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit der Farbumschlag der HRP-Reaktion mit dem Multi-Mode-Mikroplatten-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm quantifiziert (s. Kap. 3.2.9).

Die Messungen ergeben eine durchschnittliche Konzentration von 5 ng/ml bzw. von 15  $\mu\text{g/ml}$  in der verdünnten bzw. ursprünglichen Probe. Die Ergebnisse zeigen daher im Durchschnitt eine Calprotectin-Menge von  $15,3 \pm 3,9$  pg pro Neutrophiler Granulozyt. Dieser Wert ist mit den Ergebnissen anderer Arbeiten vergleichbar [171]; der Anteil an der hier erbrachten Gesamtproteinmenge (s. Kap. 4.3.7.2) ist mit 56 % jedoch höher als vorbeschrieben. Innerhalb der Proben zeigt sich eine interindividuelle Variation von 25 % (s. Abb. 4.17 b). Eine Auswertung unter Ausschluss von zwei Ausreißern ergibt im Mittel 15,1 pg Calprotectin pro Zelle; der Variationskoeffizient beträgt dann nur 18 %. Die Korrelationsanalyse zeigt bei allen vier Proteasen eine nicht signifikante negative Abhängigkeit (HNE:  $r = -0,19$ ,  $p = 0,33$ ; PR3  $r = -0,32$ ,  $p = 0,09$ ; CathG  $r = -0,31$ ,  $p = 0,11$ ; CathC  $r = -0,34$ ,  $p = 0,07$ ) (s. Abb. 4.17c).



**Abbildung 4.17: Bestimmung des Calprotectingehalts mittels ELISA.**

(a) Standardkurve mit isoliertem humanem Calprotectin. (b) Calprotectingehalt in den Lysaten aller Probanden ( $n = 28$ ). Die Absolutwerte wurden anhand der Standardkurve interpoliert. (c) Korrelation der Proteasemengen mit den Calprotectingehalten in den Proben. Alle Messungen in Triplikaten. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SD.

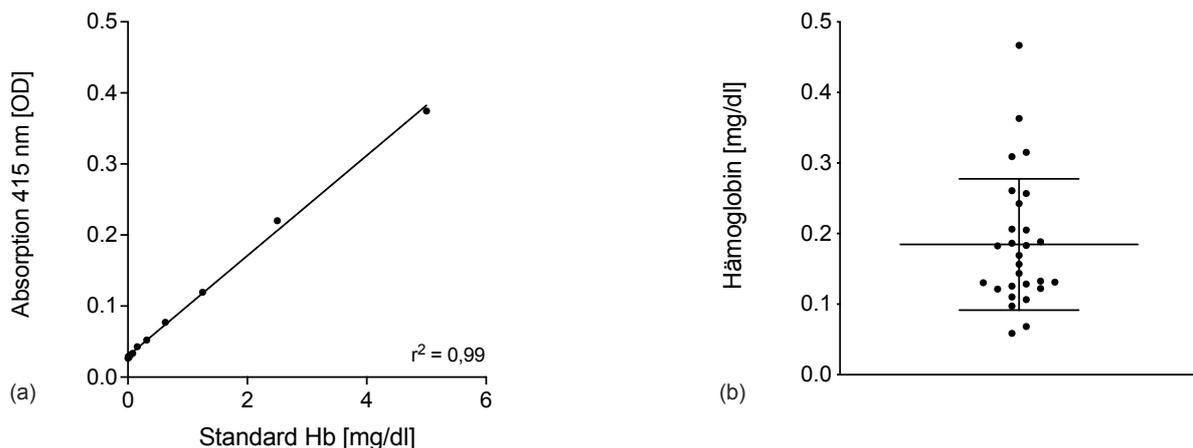
Im Vergleich zu den vorgehenden Experimenten mit ähnlicher Zielsetzung (s. Kap. 4.3.7.1 - 2) ist der Variationskoeffizient hier mit 18 % etwas höher und die Aussagekraft dieser Ergebnisse dadurch eher limitiert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der dsDNA- und Proteinbestimmung steht jedoch das Fehlen einer positiven Korrelation mit den Proteasemengen, und die geringe negative Tendenz, die auf konkurrierende Substrate hinweisen könnte.

#### 4.3.8 Quantifizierung von Hämoglobin in Zelllysaten

Die lichtmikroskopische Auswertung hat gezeigt, dass nach der Neutrophilen-Isolation in einigen Isolaten nicht zu vernachlässigende Mengen von Erythrozyten verbleiben (s. Kap. 4.3.4). Zudem wurde in den vorgehenden Untersuchungen deutlich, dass das Vorhandensein von Proteinen in den Assays einen negativen Einfluss auf die Aktivitäts- bzw. Mengenbestimmung haben könnte (s. Kap. 4.3.7.2 - 3).

Um die Auswirkungen des residualen Hämoglobins auf die Assays zu untersuchen, wurden zunächst die Hämoglobin-Gehalte in den Proben photometrisch quantifiziert. Dazu wurde ein Hämoglobin-Standard aus humanem Vollblut hergestellt, indem Erythrozyten durch Zentrifugation (1000 x g, RT, 10 min) sedimentiert, der Leukozytenfilm abgenommen und die Erythrozyten durch die Zugabe hypotonen Puffers lysiert wurden. Die Hämoglobin-Konzentration in den Neutrophilen Lysaten (n = 28) wurden im Vergleich zu diesem Standard (s. Abb. 4.18 a) über die Absorption bei 415 nm im Multimode-Mikroplatten-Reader quantifiziert.

Die photometrische Messung der Verdünnungsreihe des Standards zeigt einen streng linearen Verlauf ( $r^2 = 0,99$ ). Die Interpolation der Messwerte der Neutrophilen-Lysate zeigt, dass im Durchschnitt  $0,2 \pm 0,1$  mg/dl Hämoglobin in den Zelllysaten enthalten ist, wobei die Werte zwischen 0,06 und 0,5 mg/dl schwanken (s. Abb. 4.18 b).



**Abbildung 4.18: Quantifizierung von residualem Hämoglobin in Zelllysaten.**

Die Konzentration von Hämoglobin wurde photometrisch bei 415 nm bestimmt. (a) Standardkurve mittels isolierten Hämoglobins (b) Bestimmung der verbliebenen Hämoglobinmengen in den Zelllysaten. Alle Messungen in Triplikaten. Darstellung als Mittelwert  $\pm$  SD, n = 28.

Die Ergebnisse zeigen, dass die hergestellte Hämoglobin-Präparation für die Bestimmung der Absolutwerte geeignet ist. In vier Proben wurde eine überdurchschnittliche Hämoglobin-konzentration (0,3 - 0,46 mg/dl) nachgewiesen. Überraschenderweise sind nur zwei dieser Proben identisch mit Proben, in denen auch morphologisch eine hohe Erythrozytenzahl bestimmt worden ist (s. Kap. 4.3.4). Diese nur partielle Übereinstimmung führen wir darauf zurück, dass in den anderen beiden Proben freies, der hypotonen Lyse entstammendes Hämoglobin nachgewiesen wird. Zudem war, wie man es erwarten würde, in zwei der Ausreißer-Proben ein vergleichsweise hoher Gesamtproteingehalt aufgefallen ( $> 40$  pg/Zelle)

(s. Kap. 4.3.7.2). Angesichts einer Gesamtproteinkonzentration von 1,2 – 3,9 mg/dl in den Lysaten stellt residuales Hämoglobin daran letztlich nur einen geringen Anteil (~ 15 %) dar.

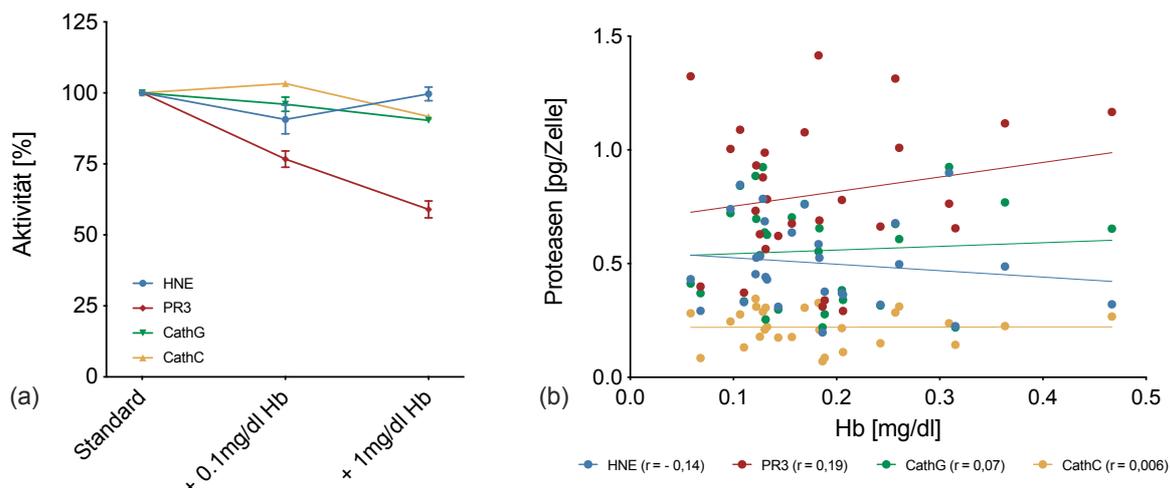
#### **4.3.9 Einfluss von Hämoglobin auf die Aktivitätsassays**

Um den Einfluss von Hämoglobin auf die Bestimmung der Proteasen weiter zu untersuchen, wurden Aktivitätsmessungen unter Zugabe der zuvor hergestellten Hämoglobin-Präparation durchgeführt. Dazu wurden die vier isolierten Proteasen in jeweils drei Ansätzen vorgelegt und mit Puffer bzw. 0,1 oder 1 mg/dl Hämoglobin versetzt (s. Kap. 3.2.11). Die Messung im Mikroplatten-Reader wurde anschließend durch die Zugabe der Substrat-Puffer-Lösung gestartet und unter den üblichen Bedingungen durchgeführt.

Die Messungen zeigen, dass die Zugabe von isoliertem Hämoglobin in der Konzentration 0,1 und 1 mg/dl keinen Einfluss auf den Nachweis der enzymatischen Aktivität im HNE-, CathG- und CathC-Assay hat (Aktivität > 90% der Kontrolle) (s. Abb. 4.19 a). Dagegen zeigt sich im PR3-Assay eine Reduktion der gemessenen Aktivität auf  $77 \pm 3,8$  bzw.  $59 \pm 4$  %.

Dieses Phänomen könnte darauf zurückzuführen sein, dass Hämoglobin ein bekanntes Substrat der PR3 ist, und daher in den Assays möglicherweise als kompetitierendes Substrat wirkt [172]. Außerdem liegt die Emissionswellenlänge des PR3-Substrats im Gegensatz zu den HNE- und CathC-Substraten ( $\lambda_{Em}$  465) mit 420 nm nah am Absorptionsmaximum von Hämoglobin (415 nm). Dadurch könnte es zum Quenching des Fluoreszenzsignals und damit einer Abnahme der im PR3-Assay nachgewiesenen Aktivität kommen.

Abschließend wurden die in den Lysaten bestimmten Proteasemengen (s. Kap. 4.3.6) mit den zugehörigen Hämoglobinkonzentrationen verglichen. In keiner der Korrelationen konnte eine signifikante Abhängigkeit beobachtet werden ( $r \leq 0,19$ ) (s. Abb. 4.19 b). Lediglich die Auswertungen für den PR3-Assay weisen einen schwach positiven Zusammenhang auf. Es ist daher davon auszugehen, dass das in den Proben vorhandene Hämoglobin die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen und damit die Mengenbestimmung der Proteasen nicht wesentlich beeinflusst. Insgesamt ist zu folgern, dass isoliertes Hämoglobin insbesondere die PR3-Aktivitätsmessungen modulieren kann, signifikante Auswirkungen wurden in dieser Studie allerdings nicht nachgewiesen.



**Abbildung 4.19: Einfluss von Hämoglobin auf die enzymkinetischen Messungen.**

(a) Isolierte Proteasen wurden mit zwei Konzentrationen des Hämoglobin-Standards (0,1 bzw. 1 mg/dl) bzw. Puffer versetzt und anschließend die Aktivität gemessen. Alle Messungen in Triplikaten. Darstellung als Mittelwert  $\pm$  SD. (b) Korrelation der Proteasemengen mit den Hämoglobinwerten in den Proben (n = 28).

#### 4.3.10 Bestimmung von Myeloperoxidase

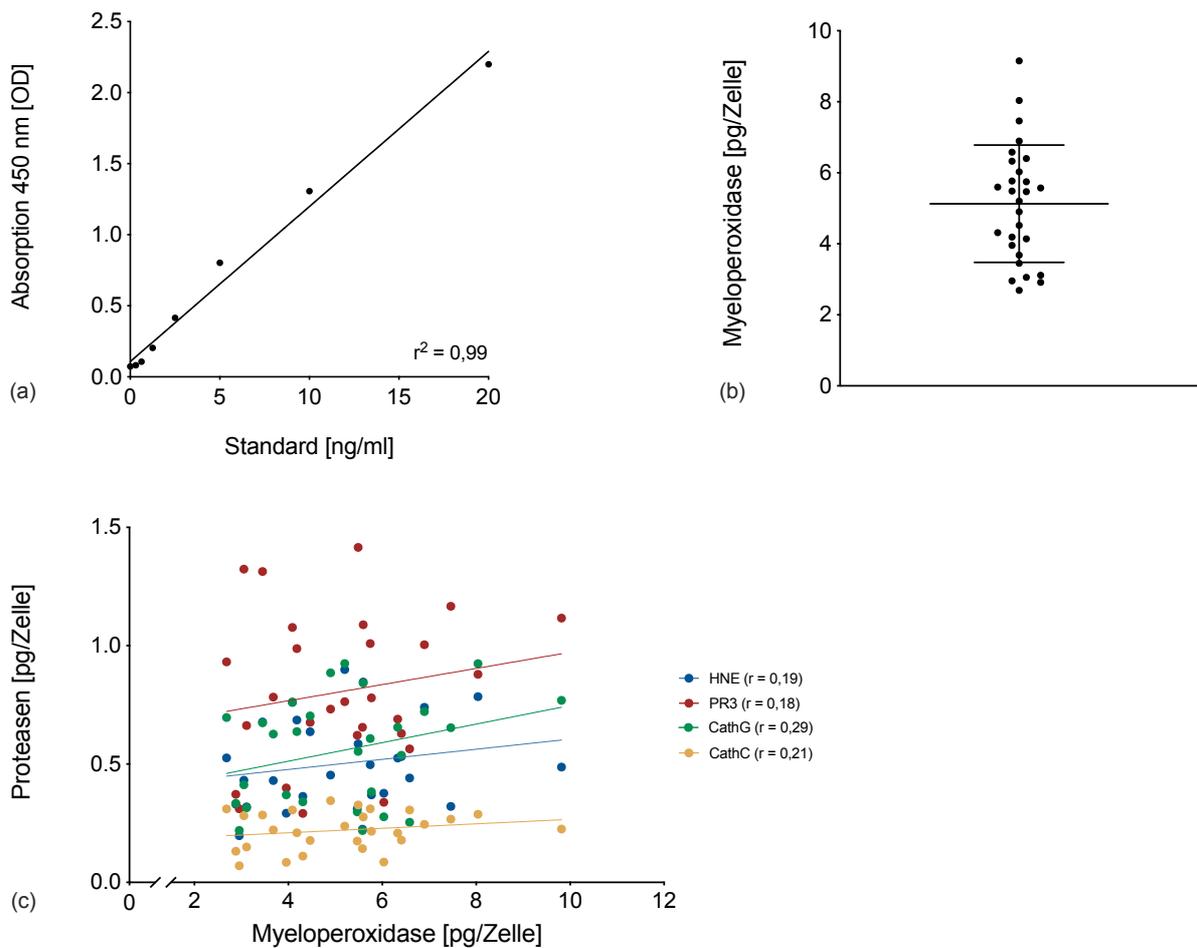
Um in einem letzten Schritt zu prüfen, ob die Bestimmung der Granula-assoziierten Serinproteasen HNE, PR3, CathG bzw. von CathC mit der eines anderen Granula-assoziierten Enzyms korreliert, wurde Myeloperoxidase in den Zelllysaten mittels ELISA bestimmt.

Hierfür wurden zunächst die Zelllysate (1000 Zellen/ $\mu$ l) aller 28 Probanden 1:500 in Assaypuffer verdünnt. Weiterhin wurden Lösungen mit aufsteigenden Konzentrationen eines rekombinanten Myeloperoxidase-Standards (0,312 - 20 ng/ml) hergestellt. Je 100  $\mu$ l der Proben bzw. der Standardverdünnungen wurden in die Wells der Mikrotiterplatte gegeben, für 90 Minuten bei 37°C inkubiert und der Überstand entfernt. Es folgte die Zugabe der Antikörper-Mischung, eine erneute Inkubation (60 min, 37°C) und dreimaliges Waschen mit PBS. Im nächsten Schritt wurden die Proben bzw. der Standard mit einer Avidin-Biotin-Peroxidase-Lösung über 30 Minuten inkubiert und anschließend ungebundene Komplexe durch weitere Waschschrte entfernt. Schließlich wurde die Tetramethylbenzidin-Lösung hinzugeben und der Farbumschlag der HRP-Reaktion bei 540 nm im Multimode-Mikroplattenreader bestimmt.

Die Ergebnisse des Myeloperoxidase-ELISAs zeigen im Durchschnitt  $10,2 \pm 3,2$  ng/ml in den eingesetzten Proben. Folglich sind  $5,1 \pm 1,7$  pg Myeloperoxidase pro Neutrophiler Granulozyt enthalten (s. Abb. 4.20 b). Ähnliche Werte sind in der Literatur zu finden [173]. In der Korrelation mit den Proteasemengen pro Zelle konnte kein signifikanter Zusammenhang

nachgewiesen werden (HNE ( $r = 0,19$ ,  $p = 0,32$ ); PR3 ( $r = 0,18$ ,  $p = 0,34$ ); CathG ( $r = 0,29$ ,  $p=0,12$ ); CathC ( $r = 0,21$ ,  $p = 0,29$ )) (s. Abb. 4.20 c).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Gehalt von Myeloperoxidase und den GASPIDs in den Granula bzw. CathC im Zytosol nicht korreliert sind. Die Expression der Proteasen erscheint unabhängig reguliert zu sein; die Messung der Myeloperoxidase kann die Bestimmung der GASPIDs und von CathC nicht ersetzen.



**Abbildung 4.20: Bestimmung von Myeloperoxidase in den Zelllysaten mittels ELISA.**

(a) Standardkurve. (b) Myeloperoxidasegehalt in den Zelllysaten ( $n = 28$ ). (c) Korrelation der Proteasen-Mengen mit den Myeloperoxidasegehalten in den Proben. Alle Messungen in Triplikaten. Darstellung als Mittelwert  $\pm$  SD.

## 5 Diskussion

Die in Neutrophilen Granulozyten exprimierten GASPIDs Elastase (HNE), Proteinase 3 (PR3), Cathepsin G (CathG) und Neutrophilen Proteinase 4 (NSP4) sowie ihre Aktivatorprotease Cathepsin C (CathC) sind unabdingbar für die intra- und extrazelluläre Erregerabwehr und die Regulation verschiedener Signalwege des Immunsystems. Die Speicherung der GASPIDs als enzymatisch aktive Proteasen und ihr breites proteolytisches Wirkspektrum erfordern zur Aufrechterhaltung der Homöostase die enge Kontrolle der Aktivität durch Kompartimentierung sowie durch zytosolische und extrazelluläre Hemmstoffe. Geraten Proteasemengen und Kontrollmechanismen aus dem Gleichgewicht, kommt es zur Destruktion von Struktur- und Funktionsproteinen, was wiederum entzündliche Erkrankungen bis hin zu irreversiblen funktionellen Schäden zur Folge haben kann. Prominente Beispiele der auf einer Protease-Antiprotease-Dysbalance beruhenden Störungen sind folgeschwere Lungenerkrankungen wie das Akute Lungenversagen (ARDS) oder die chronische obstruktive Lungenerkrankung (COPD). Im Zusammenhang mit diesen und weiteren GASPID-assoziierten Erkrankungen wurden insbesondere die HNE und PR3 in verschiedenen extrazellulären Medien quantifiziert, wobei meist immunologische Verfahren verwendet wurden [174-176]. Insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung diagnostischer Verfahren und Prognostik erscheint es allerdings auch von Interesse, die intrazellulären Mengen der Proteasen und damit die „Transportkapazität“ Neutrophiler Granulozyten zu betrachten. Da die Proteinsynthese nur während der Granulopoese erfolgt, verlassen reife Neutrophile das Knochenmark mit präformierten Mengen vollständig prozessierter enzymatisch aktiver GASPIDs [177]. Bis auf die Arbeiten von Kasperkiewicz *et al.* [125], in denen aktivitätsbasierte Sonden verwendet wurden, gibt es bisher keine Ansätze zur Bestimmung der GASPIDs im Zellinneren. Ziel dieser Arbeit war daher die simultane Aktivitäts-basierte Quantifizierung der intrazellulären Mengen der vier GASPIDs sowie von Cathepsin C in Lysaten Neutrophiler Granulozyten.

Für die Mengenbestimmung der GASPIDs stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Hierzu gehört die Untersuchung der Genexpression, der immunologische Nachweis der Proteine, sowie die Bestimmung der enzymatischen Aktivität. Der Einsatz der beiden erstgenannten Methoden erscheint weniger geeignet, da zum einen keine Expression bzw. Transkription in zirkulierenden Neutrophilen erfolgt und zum anderen aktive Proteasen mittels immunologischer Untersuchungen nicht von ihrer inaktiven Vorstufe und der inhibierten Form unterschieden werden können. Dies wäre prinzipiell mit speziellen gegen das aktive Zentrum von Proteasen gerichteten Antikörpern möglich; herkömmliche Antikörper sind für die Bindung und die Erkennung der aktiven Zentrum von Proteasen jedoch zu groß [178]. Von Interesse

sind deswegen seit einigen Jahren aus Kamelblut isolierte sogenannte „Nanobodies“, eine kompaktere Antikörpervariante, die für den Nachweis aktiver Enzyme bisher aber nur sporadisch eingesetzt wurden.

Die Untersuchung der enzymatischen Aktivität bietet den entscheidenden Vorteil, ausschließlich den Nachweis aktiver und damit biologisch relevanter Formen der GASPIDs zu erbringen. Hierfür stehen Substrate oder auch „Aktivitäts-basierte Sonden“, wie sie durch Kasperkiewicz *et al.* eingesetzt wurden, zur Verfügung. Wir entschieden uns aus verschiedenen Gründen für den Einsatz von klassischen enzymkinetischen Assays und die Verwendung von Peptidsubstraten. Dabei wird die Spaltung meist synthetischer, mit einer Reportergruppe versehener Substrate über einen definierten Zeitraum beobachtet und über die gleichzeitige Verwendung eines Standards auf die Menge des aktiven Analyten in der Probe zurückgeschlossen [179]. Wichtige, die Aktivität der Enzyme beeinflussende Parameter wie pH, Ionenstärke, Temperatur und die Konzentration der Substrate können genau festgelegt und so optimale Voraussetzungen für die Messungen in Zelllysaten geschaffen werden [180]. Im Vergleich erscheint die valide Quantifizierung der GASPIDs mit „Aktivitäts-basierten Sonden“ deutlich problematischer. Fraglich ist, ob das saure Milieu in Neutrophilen Granulozyten die Bindung der Sonden an die Proteasen beeinflusst oder die in den Granula vorherrschende hohe Packungsdichte eine Veränderung der Quantenausbeute durch gegenseitiges Quenching der Sonden bewirkt. Auch die begrenzte Membran-Permeabilität der Sonden könnte einen limitierenden Faktor darstellen.

Für die Verwendung von Peptidsubstraten sprach auch, dass uns vorausgehende Arbeiten der Arbeitsgruppe zu deren Eignung für den Nachweis der GASPIDs zur Verfügung standen. Leding *et al.* haben eine Reihe von chromo- und fluorogenen Substraten untersucht und für die Detektion der drei GASPIDs HNE, PR3, CathG sowie des Aktivators CathC geeignete Substrate (MeoSuc-AAPV-AMC, Abz-Val-Ala-Asp-Nva-Arg-Asp-Arg-Gln-EDDnp, Suc-Val-Pro-Phe-pNA und H-Gly-Arg-AMC) identifiziert [164]. Letztlich ist nicht zu vernachlässigen, dass Peptidsubstrate unkompliziert kommerziell verfügbar und die Kosten für die Durchführung enzymkinetischer Assays deutlich geringer als die der meisten immunologischen Assays sind.

## 5.1 Eignung von Peptidsubstraten zur Quantifizierung der GASPIDs und von Cathepsin C

Um zu überprüfen, inwieweit kontinuierliche Assays mit den gewählten Peptidsubstraten eine verlässliche Quantifizierung von HNE, PR3, CathG und CathC ermöglichen, wurden im Rahmen einer orientierenden Assay- bzw. Methodvalidierung die Parameter Linearität, Selektivität, Interferenz und Assay-Spezifität untersucht. Dies erfolgte mit isolierten Proteasen, die in den weiterführenden Versuchen dann als Standards dienten. Die initial geplante Quantifizierung von NSP4 wurde aufgegeben, da ihre tryptische Substratspezifität der verschiedener ubiquitärer Gerinnungs- und Komplementproteasen äußerst ähnlich ist und es auf Grund dessen bis heute keine Substrate zur sicheren Diskriminierung gibt.

Zunächst wurden die Progresskurven der kontinuierlichen Assays hinsichtlich ihrer Linearität geprüft. Hierfür wurde der Substratumsatz über die Zeit bei verschiedenen Konzentrationen der vier Proteasen beobachtet (s. Abb. 4.1). In den Messungen aller Ansätze zeigt sich eine kontinuierliche Zunahme der Absorption bzw. Fluoreszenz ohne wesentliche Sprünge oder Brüche der Kurven ( $r^2 \geq 0,90$ ). Der Einfluss technischer Störfaktoren, wie z.B. Luftblasen oder Trübungen in den Testansätzen wäre hierbei unmittelbar ersichtlich und ist somit sehr gut beherrschbar [138]. Ebenfalls zeigen diese Ergebnisse, dass der Messbereich des Multimode-Mikroplatten-Readers (0 - 60.000 RFU bzw. 0 - 1 OD) im HNE-, CathG- und CathC-Assay weitestgehend ausgeschöpft werden kann. Im PR3-Assay werden auf Grund einer limitierten Quantenausbeute sowie der begrenzenden Verfügbarkeit des Substrats diese Grenzen nicht erreicht; das Messsignal ist für reproduzierbare Messungen jedoch völlig ausreichend.

Im Anschluss wurde die Assay-Linearität untersucht, indem der Zusammenhang zwischen gemessener Aktivität und zunehmenden Enzymkonzentrationen dargestellt wurde (s. Abb. 4.2). Die Ergebnisse zeigten, dass die Aktivität in allen vier Assays proportional zur Konzentration der Proteasen ansteigt; lediglich innerhalb der Messungen im PR3 Assay war ein Abflachen der Kurve bei höheren Enzymkonzentrationen zu beobachten. Als Ursache hierfür wurde ein zu hoher Substratverbrauch (bis 34 %), der im Optimalfall 10 % nicht überschreiten sollte, identifiziert. Angesichts der begrenzten Löslichkeit und der limitierten Verfügbarkeit war der Einsatz höherer Konzentrationen des Substrats jedoch nicht möglich. Obgleich auch bei hohen Konzentrationen im CathG-Assay der Substratverbrauch deutlich über 10 % lag, ergibt die graphische Auswertung aller Kurven Bestimmtheitsmaße  $r^2 \geq 0,99$  und belegt damit eine ausreichende Linearität. Löslichkeit und Verbrauch der Substrate sowie der Messbereich des Mikroplatten-Readers bestimmen die sich über einen Faktor von ~ 30 erstreckenden Nachweisbereiche der Assays (HNE 0,19 - 6 nM, PR3 0,13 - 4 nM,

CathG 0,5 - 16 nM und CathC 0,06 - 2 nM) und Nachweisgrenzen im subnanomolaren Bereich. Derartig niedrige Nachweisgrenzen sind insbesondere unter Anwendung kontinuierlicher Messungen bzw. der Beobachtung von Progresskurven von enzymatischen Reaktionen unter näherungsweise Steady-State Bedingungen erreichbar. Anders als bei den zwar technisch deutlich weniger aufwändigen Endpunktmessungen (Stopped Assay) kommt es durch den fortlaufenden Substratumsatz zu einer Amplifikation des Messsignals und damit zu einer Erhöhung der Assay-Sensitivität.

Da die Proteasen in biologische Proben zwangsläufig nebeneinander vorliegen und die Synthese von vollständig selektiven Substraten für strukturell weitgehend homologe Proteasen wie die HNE, PR3 und CathG nahezu unmöglich ist, wurde im nächsten Schritt die Selektivität der Assays überprüft. Dazu wurde in jedem der Assays neben der Aktivität der zu quantifizierenden Protease jeweils auch die der drei anderen bestimmt und die Messergebnisse anschließend ins Verhältnis gesetzt (s. Abb. 4.3). Hierbei wird nur bei PR3 im HNE-Assay ein minimaler Substratumsatz (0,26 %) beobachtet. Da PR3 und HNE eine nahezu identische Substratspezifität haben, ist dies nicht überraschend, kann aber auf Grund des geringen Ausmaßes vernachlässigt werden. Im Rahmen dieses Versuchs wurden die Konzentrationen für die Bestimmung der drei anderen Proteasen jeweils entsprechend der der nachzuweisenden Protease gewählt. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen, sollten in weiterführenden Versuchen die drei anderen Proteasen in den Konzentrationen eingesetzt werden, in denen sie auch in Neutrophilenlysaten vorkommen.

Es ist nicht auszuschließen, dass eine der GASPIDs bzw. CathC eins der verwendeten Substrate destruktiv spaltet und damit zu einer Interferenz innerhalb der Messungen führt. Um dies auszuschließen, wurde jede Protease auch in Gegenwart der jeweils drei anderen quantifiziert. Dabei zeigt sich unter Zugabe einer weiteren Protease in keinem der Ansätze eine Zu- oder Abnahme der Aktivität von mehr als 10 % im Vergleich zum Kontrollansatz (s. Abb. 4.4). Obwohl die verwendeten Substrate aus bis zu 8 Aminosäuren bestehen, spielt diese Art der Interferenz also keine wesentliche Rolle.

In Neutrophilen-Lysaten liegen nicht nur die GASPIDs und CathC nebeneinander vor, sondern bedingt durch zelluläre oder plasmatische Kontamination während des Isolationsvorganges auch eine Reihe weiterer ubiquitärer Proteasen wie Carboxypeptidasen (z.B. TAFI), Metalloelastasen (z.B. MMP-12), Chymasen oder Trypsasen, die die verwendeten Peptidsubstrate falsch positiv spalten könnten. Um derartige Einflüsse auf die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung auszuschließen, etablierten wir den Einsatz von Inhibitoren als Werkzeuge zur Abgrenzung von „kontaminierenden“ Enzymen. Gleichzeitig erwiesen sich diese als geeignetes Mittel, um zu prüfen, ob die bekanntermaßen schwierige Differenzierung

der HNE und PR3 mit den Assays möglich ist [61, 181]. Da zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch keine selektiven synthetischen Inhibitoren für HNE und PR3 beschrieben worden waren, führten wir zunächst hemmkinetische Untersuchungen mit einer Reihe von bekannten HNE-Inhibitoren an beiden Proteasen durch. Hierbei wurde Alvelestat als Inhibitor mit deutlich unterschiedlicher Affinität zu HNE und PR3 identifiziert (s. Abb. 4.5). Die Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) ist dabei für HNE ca. 10.000-fach niedriger als für PR3 (0,01 bzw. 137  $\mu$ M), was bedeutet, dass die gleiche Konzentration des Inhibitors eine vielfach effektivere Hemmung der HNE im Vergleich zur PR3 bewirkt. Durch die simultane Anwendung eines weiteren Inhibitors (Sivelestat), der beide Proteasen mit gleicher Affinität hemmt, ist die Abgrenzung und Rückführung der gemessenen Aktivität auf die jeweilige Protease möglich.

Zur Bestätigung der Assay-Spezifität wurden schließlich CathG und CathC mit ihren selektiven Inhibitoren Aprotinin bzw. HR57 sowie HNE und PR3 jeweils mit Sivelestat und Alvelestat inkubiert, die enzymatische Aktivität bestimmt und als Restaktivität dargestellt (s. Abb. 4.6). Im CathG- und CathC-Assay wird in den mit Inhibitor versetzten Ansätzen nahezu keine Aktivität ( $\leq 3$  %) nachgewiesen und auch im HNE-Assay zeigt sich eine weitestgehende Hemmung der Aktivität unter Zugabe beider Inhibitoren. Im PR3-Assay führt die Zugabe von Alvelestat zu keiner relevanten Abnahme der Aktivität, während der Einsatz von Sivelestat eine nahezu vollständige Hemmung zur Folge hat (Restaktivität 95 bzw. 2,6 %). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch den Einsatz der gewählten Inhibitoren bzw. deren Kombination die gemessene Aktivität verlässlich auf die einzelnen Proteasen zurückgeführt werden kann und somit belegt wurde, dass die Assays spezifische Messungen ermöglichen. Ebenso zeigen die Ergebnisse, dass eine sichere Unterscheidung von HNE und PR3 gelingt. Auch Kasperkiewicz *et al.* ist es nicht gelungen, vollständig selektive Sonden herzustellen; letztlich erreichten sie die Abgrenzung von HNE und PR3 nur durch einen zeitlichen Versatz der Zugabe sowie unterschiedliche Konzentrationen von zwei Sonden [125].

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Quantifizierung der GASPIDs und von CathC mit Peptidsubstraten in unseren Händen möglich und reproduzierbar ist. Ebenso hält sich der technische Aufwand für die Messungen in Grenzen, könnte jedoch noch optimiert werden; auf Grund des Einsatzes von drei verschiedenen Reportergruppen sind bisher drei separate Messansätze mit entsprechenden Messbedingungen notwendig. Durch die Identifikation ausreichend sensitiver Substrate mit identischen Reportergruppe könnte die Quantifizierung in zukünftigen Arbeiten weiter vereinfacht werden.

## 5.2 Anwendung der Assays auf Zelllysate

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die vier etablierten Assays für die Quantifizierung der isolierten Proteasen HNE, PR3, CathG und CathC geeignet sind. Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob dies auch in Zelllysaten humaner Neutrophiler Granulozyten möglich ist.

Hierfür wurden Zelllysate isolierter Neutrophiler in aufsteigenden Konzentrationen in allen vier Assays eingesetzt und anschließend der Substratumsatz auf die übliche Art und Weise bestimmt. Überraschend problemlos lässt sich die Aktivität aller vier Proteasen nachweisen. Die graphische Auswertung der Versuche ergibt untere Nachweisgrenzen für HNE und CathC beim Einsatz von 625, für PR3 bei 125 und für CathG bei 1250 Neutrophilen sowie einen weitgehend linearen Bereich bis hin zum Einsatz von 10.000, 4000, 40.000 bzw. 20.000 Neutrophilen (HNE, PR3, CathG bzw. CathC). Innerhalb der beschriebenen Messbereiche nimmt die Aktivität stets proportional zur eingesetzten Zellzahl zu; die Regressionsanalyse ergibt für alle vier Assays Bestimmtheitsmaße von  $r^2 \geq 0,96$  (s. Abb. 4.7). Die Messungen werden also nicht wesentlich durch Matrixeffekte, d.h. durch weitere Bestandteile der Zelllysate oder Assaykomponenten beeinflusst.

Während der Herstellung wurden die Proben mit 2100 x g zentrifugiert, um unvollständig lysierte Zellen und korpuskuläre Zellbestandteile wie DNA-Fragmente und Organellen abzutrennen. Die Bindung der Proteasen bzw. Proteinen an Zelltrümmer sollte durch die Verwendung eines detergenten- sowie salzhaltigen Lysepuffers (Tween 0,1 % bzw. NaCl 1 M) weitgehend verhindert werden. Daher ist ein relevanter Verlust von Proteasen durch Sedimentation nicht zu erwarten; ein expliziter Nachweis diesbezüglich wurde in dieser Arbeit jedoch nicht erbracht. Nicht vollständig geklärt bleibt zudem, welchen Einfluss verbleibende zelluläre Bestandteile im Lysat auf die Mengenbestimmung haben. Einerseits lässt die Proportionalität der Messergebnisse bei verschiedenen Lysatkonzentrationen Interferenzen innerhalb der Messungen unwahrscheinlich erscheinen. Andererseits ist es jedoch denkbar, dass ein Teil der Proteasen durch zytoplasmatische Hemmstoffe (z.B. Serpin B1 [182]) der Aktivitätsmessung entzogen werden oder es im Sinne einer positiven Interaktion zur Aktivierung von im Lysat vorhandener Zymogene durch CathC kommt. Um das Verhältnis zwischen den gemessenen und tatsächlich enthaltenen Proteasen und damit die Wiederfindung (Recovery) zu untersuchen, sollten in Zukunft sogenannte „Spike-Experimente“ durchgeführt werden. Hierbei wird eine festgelegte Menge einer isolierten Protease zum Lysat hinzugegeben („Spiking“) und die Aktivität bestimmt. Über den Vergleich mit dem Messergebnis einer in Puffer gemessenen Enzymkonzentration kann dann ermittelt werden, ob die Protease in Gegenwart des Lysats vollständig nachgewiesen wird.

Nachdem eine ausreichende Assay-Linearität bestätigt worden war, wurde unter Zuhilfenahme der zuvor etablierten Inhibitoren geprüft, inwieweit mit den Assays der spezifische Nachweis der Proteasen in den Neutrophilenlysaten möglich ist. Analog den Experimenten mit isolierten Proteasen wurde HNE und PR3 jeweils in Gegenwart von Alvelestat und Sivelestat, CathG mit Aprotinin sowie CathC mit HR57 bestimmt und die Aktivität mit einem Kontrollansatz ohne Inhibitor verglichen (s. Abb. 4.8). Die Restaktivität beträgt in allen Ansätzen maximal 10 %; die in den jeweiligen Assays nachgewiesene Aktivität ist also weitgehend auf die jeweils nachzuweisende Protease zurückzuführen. Auch die Unterscheidung von HNE und PR3 ist möglich – die Zugabe von Alvelestat im PR3-Assay führt zu keiner relevanten Verminderung der Aktivität, die von Sivelestat dagegen zu einer nahezu vollständigen Inhibition (Restaktivität 96 bzw. 6 %). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Assays spezifisch sind und kein relevanter „Background“ auf Grund von Substratspaltung durch „störende“ Proteasen oder andere biologische Komponenten entsteht.

Zur Herstellung der Neutrophilenlysate wurde Vollblut mit EDTA-Röhrchen entnommen, Neutrophile Granulozyten unter Verwendung eines kommerziellen Kits (MACSxpress Whole blood Neutrophil Isolation-Kit, Miltenyi) mittels immunomagnetischer Depletion isoliert und anschließend durch Zugabe von Tensid-Puffern lysiert. Die Quantifizierung der isolierten Neutrophilen mit Hilfe des CASY-Zellzählgeräts zeigte, dass im Mittel  $1,4 \pm 0,4 \times 10^6$  Neutrophile je ml Vollblut gewonnen wurden. Anhand eines aus den gleichen Proben erstellten maschinellen Blutbildes errechnet sich eine Ausbeute von ~ 55 %, die mit dem in anderen Publikationen und Protokollen beschriebenen Isolationserfolg von  $1 - 4 \times 10^6$  Zellen pro ml Vollblut vergleichbar ist [183-185]. Die verwendete Methode (Immunodepletion vs. Dichtgradientenzentrifugation) scheint hierbei keinen relevanten Einfluss auf die Effizienz der Isolation zu haben.

Die Zusammensetzung der Neutrophilenisolate wurde durch lichtmikroskopische Untersuchung von Zytospin-Präparaten geprüft. Hierbei zeigte sich eine hohe Reinheit (> 98 %) der Neutrophilen innerhalb der isolierten Leukozyten; es bestätigte sich jedoch die teilweise bereits makroskopisch in einigen Proben sichtbare hohe Zahl verbliebener Erythrozyten. Im Durchschnitt wurden in den Isolaten bis zu 17 Erythrozyten pro 100 Leukozyten gezählt, einige wenige Proben wiesen bis zu 70 Erythrozyten pro 100 Leukozyten auf (s. Abb. 4.12). Die während der Zellisolation durchgeführte hypotone Lyse ist folglich zur vollständigen Depletion der Erythrozyten nicht ausreichend und sollte durch zusätzliche Wiederholungen oder die Anwendung von Ammoniumchlorid-haltigen Puffern verbessert werden [186].

Hat Hämoglobin einen Einfluss auf die Quantifizierung der GASPIDs und von CathC? Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde zunächst die Aktivität aller vier Proteasen unter Zugabe isolierten Hämoglobins bestimmt. Im PR3-Assay kommt es dabei zu einer deutlichen Reduktion der Aktivität um bis zu 40 % (s. Abb. 4.19 a). Hämoglobin wird als bekanntes Substrat für viele Proteasen einschließlich der PR3 beschrieben [172], sodass dieses Ergebnis plausibel erscheint. Um zu untersuchen, ob auch die Messungen in Neutrophilenlysaten durch Hämoglobin beeinflusst werden, wurden zunächst die darin enthaltene Hb-Konzentration bestimmt (s. Abb. 4.18). Obwohl dabei durchaus Konzentrationen nachgewiesen wurden, die einen Einfluss haben könnten, ergibt die Korrelation der Hämoglobinkonzentration im Lysat mit den jeweils entsprechenden Ergebnissen der Aktivitätsmessungen keinen signifikanten Zusammenhang ( $r \leq 0,19$ ) (s. Abb. 4.19 b). Dies steht offensichtlich im Widerspruch zu den vorangegangenen Untersuchungen. Erklärt werden könnte dies dadurch, dass in Lysaten verbliebenes Hämoglobin bereits während der Präparation oder Lagerung durch die PR3 prozessiert wird. Die Protease wäre dann zum Zeitpunkt der Aktivitätsbestimmung wieder vollständig verfügbar und die Messungen damit ungestört. Ob Hämoglobin intakt oder gespalten in den Lysaten vorliegt, kann anhand der photometrischen Bestimmung nicht geklärt werden, es müssten weitere Untersuchungen wie z.B. Gelelektrophorese oder HPLC durchgeführt werden.

Zur Isolation Neutrophiler aus Vollblut wurde ein immunomagnetisches Separationsverfahren verwendet. Diese Methode ermöglicht durch Abreicherung anderer Leukozytenpopulationen eine negative Selektion, deren entscheidender Vorteil die Verhinderung einer Aktivierung von Neutrophilen während der Isolation ist. Allerdings verfügt der für die Auftrennung verwendete Magnet lediglich über vier Plätze, sodass nur diese Anzahl von Proben simultan prozessiert werden kann. Bei einer größeren Probenanzahl wird eine gestaffelte Arbeitsweise notwendig, die unweigerlich zu Stehzeiten führt. Eine einfache Möglichkeit dies zu umgehen wäre die Verwendung eines Magneten mit mehr Plätzen. Neben dieser Limitation und dem damit verbundenem hohen zeitlichen Aufwand konnte die Aktivitätsbestimmung bisher nicht unmittelbar im Anschluss an die Isolation durchgeführt werden und die Proben wurden bei -20 °C gelagert. Messungen der Proben nach ein bis drei Frier-Tau-Zyklen zeigen vergleichbare bzw. teilweise höhere Aktivität in allen vier Assays (s. Abb. 4.9). Die beobachtete Zunahme könnte durch weiteren Zellaufschluss im Rahmen des Frierens und Tauens oder die weitere Aktivierung von Zymogenen bedingt sein. Insgesamt handelt es sich jedoch um Änderungen von maximal 20 %, sodass die Probenstabilität als ausreichend zu bezeichnen ist.

Eine Tendenz zur lagerungsbedingten Instabilität wurde auch bei isolierten Proteasen festgestellt. Aus hochkonzentrierten Stammlösungen wurden die für die Experimente notwendigen deutlich niedrigeren Verdünnungen hergestellt, die bei 5 - 7 °C gelagert und über mehrere Tage in Experimenten eingesetzt wurden, um möglichst sparsam vorzugehen. Rückblickend zeigte eine Analyse der Messergebnisse Schwankungen der Aktivität, sodass es sich empfiehlt, in Zukunft für jedes Experiment frische Standardverdünnungen aus der bei - 20 °C gelagerten Stammlösung herzustellen.

Da alle Ergebnisse der Quantifizierung der GASPIDs auf die initial mit dem CASY-Messgerät bestimmte Zellzahl bezogen sind, ist die Genauigkeit der Zellzählung von hoher Bedeutung. Unter der Annahme, dass sich zirkulierende Neutrophile gesunder Individuen in der G<sub>0</sub>-Phase befinden und somit über einen einfachen Chromosomensatz verfügen, sollten in allen Zellen identische Mengen dsDNA vorliegen. Weiterhin kann man davon ausgehen, dass Neutrophile über etwa gleiche Mengen Protein sowie des Markerproteins Calprotectin verfügen, sodass mittels Bestimmung dieser drei Parameter die Vergleichbarkeit der auf eine identische Konzentration (10<sup>6</sup> Zellen/ $\mu$ l) eingestellten Lysate geprüft werden kann. Die Ergebnisse zeigen, dass die Mittelwerte der Bestimmung von dsDNA und Protein um ~ 10 % schwanken (s. Abb. 4.15 bzw. 4.16). Eine etwas höhere Schwankung von 18 % im Rahmen der Calprotectinmessung ist am ehesten auf die Komplexität des verwendeten ELISA zurückzuführen (s. Abb. 4.17). Bedenkt man, dass auch bei der Bestimmung von dsDNA und Protein naturgemäß eine gewisse Variabilität durch die Durchführung des jeweiligen Assays bedingt ist, sind die Werte sehr gut mit der Herstellerangabe zur Genauigkeit der CASY-Zellzählung von  $\pm$  2 % vereinbar. Es ist also anzunehmen, dass die gemessenen Zellzahlen in der beschriebenen Größenordnung variieren und die Zählung somit geeignet ist, um die Zahl der Neutrophilen als Bezugsgröße zu quantifizieren. Als Nebeneffekt dieser Versuche wäre es denkbar, die Zellzählung in zukünftigen Experimenten durch die Bestimmung der dsDNA oder des Proteingehalts zu ersetzen und so das experimentelle Vorgehen zu vereinfachen.

### **5.3 Quantifizierung der GASPIDs und von Cathepsin C in Neutrophilen von Probanden**

Nachdem nachgewiesen worden war, dass mit den Assays die Quantifizierung der GASPIDs und von CathC auch in Neutrophilenlysat verlässlich gelingt, wurden zur weiteren Evaluation die Proben einer Gruppe von Probanden untersucht.

### 5.3.1 Mengenbestimmung

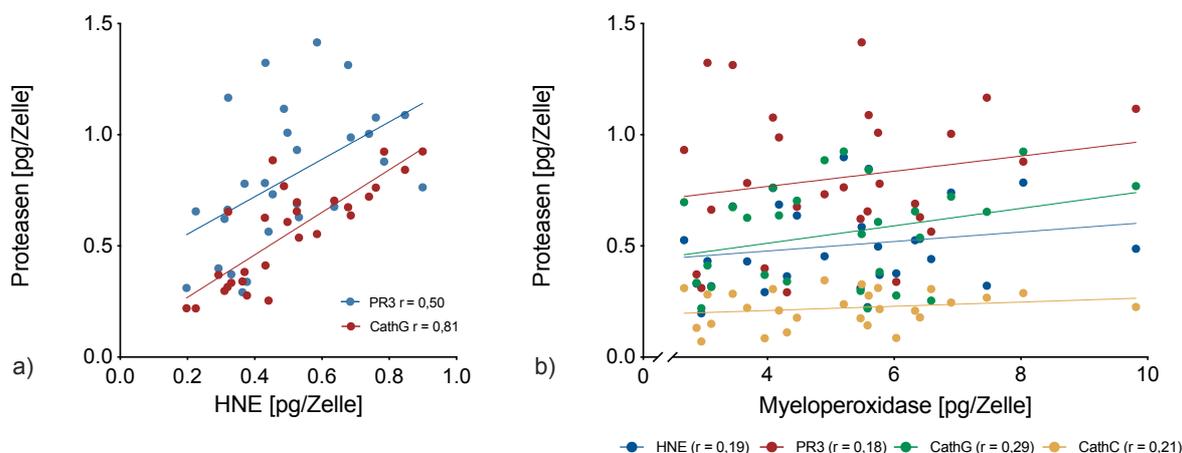
Zur Quantifizierung der Proteasen wurden Neutrophile von 28 Probanden (Alter  $24 \pm 4,4$  Jahre) isoliert, Lysate angefertigt, bei  $-20\text{ °C}$  gelagert und anschließend die Aktivität wie beschrieben bestimmt (s. Abb. 4.13). Der Nachweis gelang problemlos in allen Proben, womit die Anwendbarkeit der Assays auch für eine größere Zahl von Proben bestätigt wird. Die Berechnung der Proteasemengen erfolgte anhand der mitgeführten Standards und ergibt  $0,5 \pm 0,2$  pg HNE,  $0,8 \pm 0,3$  pg PR3,  $0,6 \pm 0,2$  pg CathG und  $0,2 \pm 0,07$  pg CathC pro Zelle ( $n = 28$ ) (s. Abb. 4.14). Die Messwerte für HNE, PR3 und CathG stehen in sehr guter Übereinstimmung mit denen von Kasperkiewicz *et al.*, die unter Verwendung von Aktivitätsbasierten Sonden  $0,70 - 1,02$ ,  $0,23 - 0,80$  bzw.  $0,56 - 1,41$  pg bestimmt haben [125]. Unsere initialen Bedenken, inwieweit diese Methode insbesondere auf Grund der hohen Packungsdichte in Neutrophilen-Granula verlässliche Messungen zulässt (s.o.), scheinen sich nicht zu bestätigen. Vorteilhaft erscheint hierbei vor allem die Untersuchung der Proteasen auf Einzelzellebene, die allerdings technisch komplex ist und bisher nicht von anderen Autoren aufgegriffen wurde, obwohl das Vorgehen bereits vor über 10 Jahren erstmals beschrieben worden war (2014) [150]. Neben dieser Arbeit existieren nur wenige, überwiegend ältere Studien, in denen der intrazelluläre Gehalt der GASPIDs bestimmt wurde. Darin werden Mengen zwischen  $1 - 9$  pg HNE,  $2 - 4$  pg PR3 und  $0,2 - 0,85$  pg CathG beschrieben [147, 151-153]. Diese Werte sind tendenziell höher als die hier und bei Kasperkiewicz *et al.* erbrachten Ergebnisse, bewegen sich aber in einer ähnlichen Größenordnung. Diese Diskrepanz erscheint plausibel, da in diesen Arbeiten überwiegend immunologische Assays, die naturgemäß zusätzlich Zymogene und inhibierte Formen erfassen, verwendet wurden. Möglich ist auch, dass die GASPIDs im Falle einer Plasmakontamination bereits während der Isolation inhibiert werden und unsere Messwerte daher niedriger sind. Die sehr gute Vergleichbarkeit mit den Resultaten von Kasperkiewicz *et al.* lässt dies jedoch unwahrscheinlich erscheinen. Weiterhin sind Resultate unterschiedlicher analytischer Methoden ohne gemeinsamen Standard grundsätzlich nur orientierend ins Verhältnis zu setzen.

Interessanterweise zeigt sich eine bis zum Faktor 10 reichende Streubreite der Mengen aller vier Proteasen. Für HNE, PR3 und CathG hatten dies auch Kasperkiewicz *et al.* beschrieben. Eine durch den Bezug aller Ergebnisse auf die initiale Zellzählung bedingte Varianz ist als Ursache denkbar, wird aber durch unsere Validierung weitgehend ausgeschlossen (s. Kap. 4.3.7). Es handelt sich daher am ehesten um eine biologische Variabilität, die potenziell klinisch und diagnostisch relevant sein kann. Für den Einsatz von GASPIDs als Biomarker existieren Bestrebungen, wie zum Beispiel die Entwicklung der ProteaseTag™

Technologie zur standardisierten Messung von Proteaseaktivität im Sputum von Patienten mit entzündlichen respiratorischen Erkrankungen im klinischen Umfeld [187]. Aktuell ist auch das multizentrisch angelegte Projekt „FixNet“, im Rahmen dessen krankheitsspezifische Lokalisationsmuster intrazellulärer GASPIDs als prädiktive Marker für die Ausprägung der kongenitalen Neutropenie etabliert werden sollen [188].

### 5.3.2 Korrelation der GASPIDs untereinander und mit Myeloperoxidase

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Mengen der einzelnen GASPIDs in Neutrophilen zu untersuchen, wurden die Ergebnisse der Bestimmung von HNE gegen die von PR3 und CathG aufgetragen (s. Abb. 5.1 a). Es zeigt sich, dass sowohl der PR3- als auch der CathG-Gehalt signifikant zur HNE-Menge korreliert ist. Die Korrelation mit CathG fällt hierbei deutlich stärker aus als die mit PR3 ( $r = 0,50$ ,  $p = 0,006$  bzw.  $r = 0,81$ ,  $p < 0,0001$ ). Offensichtlich kommt es also zu einer gleichsinnigen Expression bzw. Aktivierung oder Lagerung der Proteasen, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß.



**Abbildung 5.1: Korrelation der GASPIDs untereinander und mit Myeloperoxidase.**

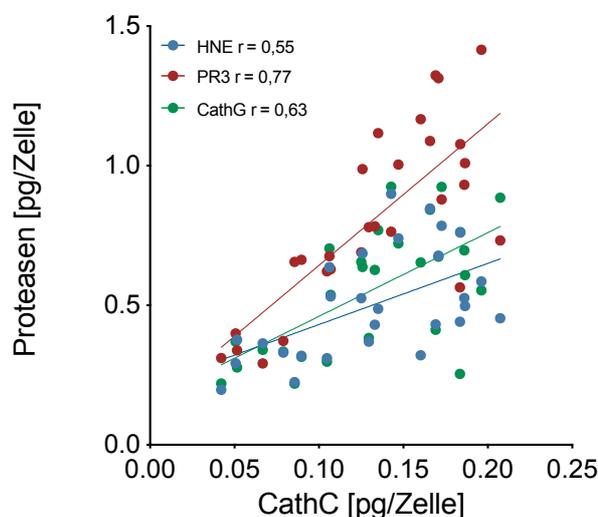
(a) Korrelation von HNE mit PR3 bzw. CathG bei Probanden. (b) Korrelation der GASPIDs und CathC mit Myeloperoxidase ( $n = 28$ ).

Weiterhin erschien die Frage interessant, ob ein Zusammenhang zum intrazellulären Gehalt anderer granulärer Markerproteine besteht. Exemplarisch hierfür wurde die Myeloperoxidase, die den größten Anteil aller Enzyme in azurophilen Granula ausmacht [15], in allen Proben quantifiziert und mit HNE, PR3, CathG und CathC korreliert (s. Abb. 5.1 b) [189]. Dabei ist keine relevante positive oder negative Abhängigkeit zu beobachten ( $r < 0,29$ ). Nimmt man an, dass Myeloperoxidase näherungsweise die granuläre Beladung von Neutrophilen abbildet,

bedeuten diese Ergebnisse, dass die GASPID-Mengen nicht lediglich ein Maß für die Granularität darstellen.

### 5.3.3 Korrelation der GASPIDs mit Cathepsin C

Die enzymatisch aktive Form von HNE, PR3 und CathG entsteht während der Granulopoese durch Abspaltung des N-terminalen Dipeptids des Zymogens durch die Cysteinprotease CathC [69]. Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen den Mengen der GASPIDs und ihrer Aktivatorprotease zu beobachten ist, wurden sie gegeneinander aufgetragen (s. Abb. 5.2). Es besteht jeweils eine signifikante positive, aber unterschiedliche starke Korrelation ( $r = 0,55$ ,  $0,77$  bzw.  $0,63$  und  $p = 0,0024$ ,  $< 0,0001$  bzw.  $< 0,0002$  für HNE, PR3 bzw. CathG), Probanden mit höheren CathC-Mengen weisen tendenziell höhere HNE-, PR3- und CathG-Mengen auf. Dies deutet darauf hin, dass CathC ein limitierender Faktor bei der Aktivierung der GASPIDs ist. In diesem Zusammenhang wäre es von Interesse zu untersuchen, ob bei Probanden mit geringen Mengen CathC noch nicht prozessierte Zymogene der GASPIDs in den Neutrophilen nachweisbar sind.



**Abbildung 5.2: Korrelation CathC mit HNE, PR3 und CathG.**

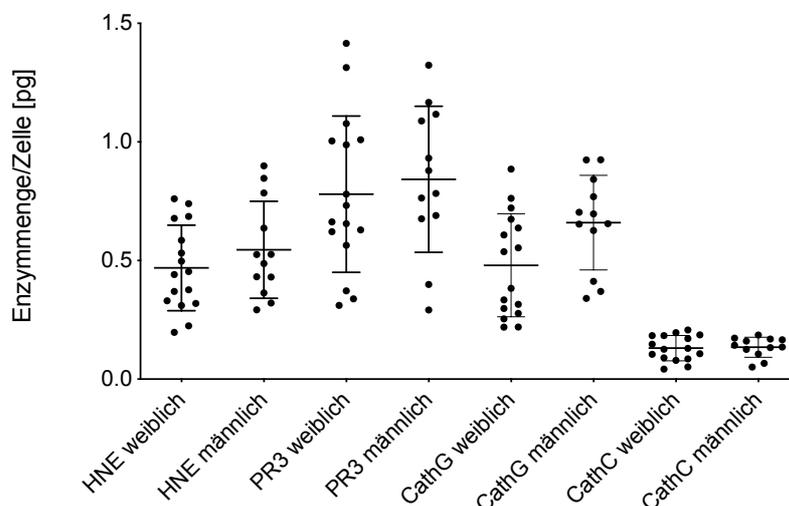
Korrelation der Proteasemengen der CathC mit denen der HNE, PR3 und CathG in den Proben ( $n = 28$ ).

Der Zusammenhang zwischen CathC und den GASPIDs bei gesunden Erwachsenen ist unserem Wissen nach bisher nicht untersucht worden. Andererseits zeigt beispielsweise das Papillon-Lefèvre-Syndrom, im Rahmen dessen CathC auf Grund einer Mutation nicht exprimiert wird, dass die Abwesenheit mit einer nahezu vollständigen Reduktion der Aktivität der HNE, PR3 und CathG einhergeht [117, 190]. Unter Anwendung synthetischer Inhibitoren

konnte dieses Phänomen am Mausmodell experimentell bestätigt werden [50, 191], sodass angenommen werden kann, dass die Hemmung der CathC eine elegante Möglichkeit zur „Upstream“-Kontrolle überschießender GASPID-Aktivität darstellt [121, 192]. Seit mehr als 25 Jahren werden zahlreiche Hemmstoffe entwickelt, wobei sich die Molekülstabilität als maßgeblicher limitierender Faktor für die „in-vivo“-Anwendung erwies. Erst im Jahr 2016 gelang mit der Herstellung von Brensocatib, einem reversiblen Nitril-basierten Inhibitor ein entscheidender Durchbruch [193]. Nachdem in ersten klinischen Studien ein signifikanter Rückgang der Elastase-Aktivität im Sputum von Patienten mit Bronchiektasie nachgewiesen wurde, wird der Hemmstoff nun seit März 2023 im Rahmen einer Phase-III-Studie für die klinische Anwendung erprobt [194, 195].

### 5.3.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Neben der interindividuellen Varianz weisen die Ergebnisse der Mengenbestimmung interessanterweise deutliche Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Probanden auf; der intrazelluläre Gehalt aller vier Proteasen war bei Probanden signifikant höher als bei Probandinnen ( $p = 0,05$ ) (s. Abb. 5.3).



**Abbildung 5.3: Mengenbestimmung der GASPIDs und CathC in Neutrophilenlysaten bei Probandinnen bzw. Probanden.**

Am meisten divergieren dabei die Mittelwerte der CathG-Messung (+ 38 %); die von HNE und PR3 liegen um 17 bzw. 9 % auseinander. Interessanterweise besteht bei CathC lediglich ein minimaler Unterschied (+ 3 %).

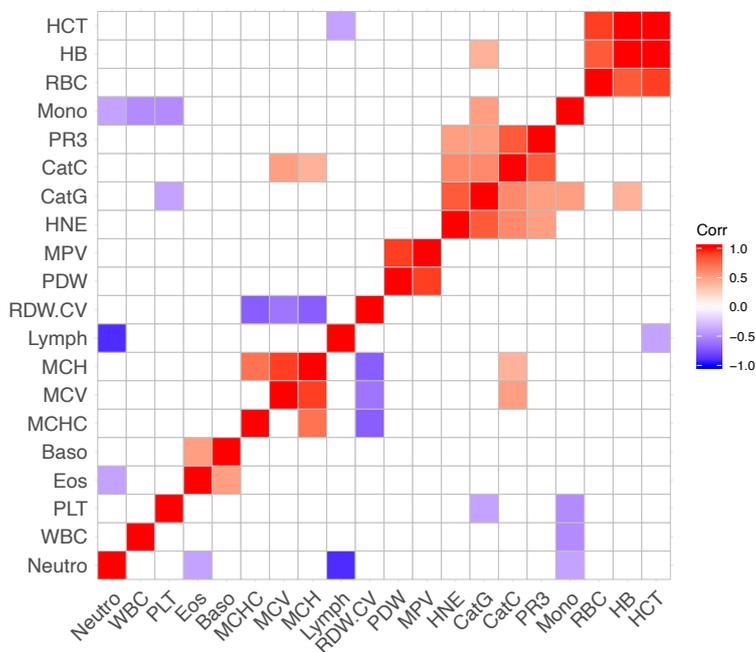
Es gibt zahlreiche Hinweise für die immunmodulatorische Wirkung von Sexualhormonen [196] - insbesondere von Östrogen [197] - und deren Einfluss auf Anzahl, Funktion und Verteilung von Neutrophilen Granulozyten [198, 199]. Genomanalysen erbrachten zudem geschlechts-spezifische Unterschiede der Gen-Expression in Neutrophilen Granulozyten [200]. Auch eine östrogenabhängige Regulierung der Expression und Bildung von HNE, PR3 und CathG wurde detailliert am Mausmodell gezeigt, sodass es denkbar wäre, dass auch die intrazellulären Proteasengehalte zyklusabhängigen Schwankungen unterliegen [201]. Es ist möglich, dass die hier gezeigten zwischengeschlechtlichen Unterschiede unter anderem durch die jeweils individuellen Hormonspiegel der Probandinnen beeinflusst wurden, sodass in Zukunft der Zykluszeitpunkt sowie die Einnahme hormonaler Kontrazeptiva erfasst werden sollte.

### **5.3.5 Korrelation mit den Parametern des Differentialblutbildes**

Um festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen den intrazellulären Mengen der GASPIDs und CathC mit anderen routinemäßig bestimmten Parametern besteht, wurden die Ergebnisse mit den jeweils entsprechenden Werten eines maschinellen Differentialblutbildes korreliert und anschließend die Korrelationskoeffizienten in einer Korrelationsmatrix dargestellt (s. Abb. 5.4). Farblich hervorgehoben sind dabei nur signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ . Hier zeigt sich erneut, dass die Mengen von HNE, PR3 und CathG nicht nur mit ihrem Aktivator CathC korrelieren, sondern auch untereinander. Wie auch in den vorherigen Auswertungen beobachtet, besteht der stärkste Zusammenhang dabei zwischen CathG und HNE bzw. PR3 und CathC (vgl. Abb. 5.1 a und 5.2). Während für HNE und PR3 keine weiteren Beziehungen nachgewiesen werden, korreliert CathG zusätzlich negativ mit der Thrombozytenzahl, sowie positiv mit der Monozytenzahl und dem Hämoglobinwert. CathC korreliert zudem positiv mit dem mittleren korpuskulären Volumen und Hämoglobin der Erythrozyten. Zur negativen Abhängigkeit von CathG und der Thrombozytenzahl könnte es dadurch kommen, dass CathG den Rezeptor PAR-4 auf Thrombozyten hydrolytisch prozessiert und es in der Folge zu einer vermehrten Aggregation der Thrombozytenzahl kommt [95]. Für alle weiteren Zusammenhänge finden sich keine eindeutigen Hinweise in der Literatur.

Insgesamt lassen diese Ergebnisse annehmen, dass die Mengenbestimmung der GASPIDs unabhängig, nicht durch andere zelluläre Blutbestandteile abgebildete Erkenntnisse liefert. Da die GASPIDs maßgeblich an der Pathogenese vieler entzündlicher Erkrankungen beteiligt sind, eröffnet sich so relevantes diagnostisches Potential. Um die Auftretenswahrscheinlichkeit oder Schwere einer Erkrankung vorherzusagen, wurden in der Vergangenheit bereits Proteasen in extrazellulären Biomaterialien wie Wundflüssigkeit oder Sputum quantifiziert [159, 175, 176]. Die Bestimmung der präformierten intrazellulären Mengen und damit der

Transportkapazität hingegen könnte insbesondere im Rahmen der Früherkennung kritischer inflammatorischer Zustände als neuer Biomarker von Bedeutung sein.



**Abbildung 5.4: Korrelationsmatrix der Enzymmengen mit den Ergebnissen eines Differentialblutbildes.**  
Nur signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) sind farblich dargestellt.

## 5.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die etablierten enzymkinetischen Assays gut geeignet sind, um die Granula-assoziierten Serinproteasen HNE, PR3 und CathG sowie CathC sowohl in isolierter Form als auch in Neutrophilenlysate zu quantifizieren. Die teilweise noch aufwendige Durchführung könnte jedoch in Zukunft optimiert werden. Einen möglichen Ansatzpunkt hierfür bietet unter anderem die Auswahl der Peptidsubstrate. Bei den uns aktuell bekannten kommerziell erhältlichen Substraten mit der höchsten Sensitivität handelt es sich um zwei fluorogene (HNE, CathC), ein chromogenes (CathG) sowie ein FRET-Substrat (PR3). Die verschiedenen Reportergruppen führen dazu, dass die Messungen auf Grund spezifischer Messeinstellungen separat durchgeführt werden müssen. Durch die Verwendung von Substraten mit einheitlichen Reportergruppen würde die Verarbeitung erheblich vereinfacht und die Messzeit im Fluorimeter bzw. Photometer von über 30 auf 10 Minuten verkürzt werden.

Für die Messung aller vier Proteasen sind etwa 50.000 Zellen ausreichend, die in nur 20  $\mu$ l Vollblut enthalten sind. Dies entspricht beispielsweise der mit einer Kapillarpipette entnehmbaren Blutmenge, was eine mögliche, spätere klinische Anwendung begünstigen

würde. Derzeit ist für die Neutrophilenisolation jedoch noch die 100-fache Probenmenge von mindestens 2 ml erforderlich. Eine Volumenreduktion könnte durch die Verwendung eines Separationsmagneten mit kleineren Plätzen oder die Sortierung der Zellen z.B. mittels Durchflusszytometrie erreicht werden. Im Hinblick auf die Aktivitätsmessung in Mikrotiterplatten wäre die Entwicklung einer Neutrophilen-Isolationsmethode direkt in der 96-Well Platte von besonderem Interesse.

Alle Assays wurden einer ausführlichen Validierung unterzogen, die eine verlässliche Anwendung der Methode bestätigte. Jedoch kann auch hier die Durchführung, die bei der Etablierung neuen Probenmaterials nötig ist, weiter optimiert werden. Beispielsweise würde die Identifikation eines spezifischen PR3-Inhibitors die Verwendung von jeweils zwei Hemmstoffen zur Bestätigung der Spezifität im HNE- und PR3-Assays ersetzen. Eine zusätzliche Inkubationszeit des CathC-Inhibitors HR-57 würde durch die Verwendung eines reversiblen Hemmstoffes entfallen. Versuche zur Bestätigung der Assay-Linearität in Zelllysaten zeigten weiterhin, dass zu hohe Konzentrationen des Lyse-Puffers (> 1:10) die Aktivitätsmessung von CathC beeinträchtigen. Ursächlich hierfür könnte ein pH-Anstieg durch den alkalischen Lyse-Puffer (pH 7,5) oder das verminderte Vorliegen von freien Sulfhydrylgruppe sein. Die Etablierung einer in allen vier Assays einsetzbaren Pufferlösung für die Aktivitätsmessungen würde das Vorgehen deutlich vereinfachen.

Im Rahmen einer weiterführenden Validierung sollte insbesondere die Wiederfindung (Recovery) der Proteasen an verschiedenen Stellen der Probenverarbeitung geprüft werden. Um zu bestimmen, ob etwa die Zentrifugation während der Lyse einen Verlust von mit Zelltrümmern komplexierten Proteasen zur Folge hat, sollten die Sedimente z.B. mittels Immunoblot weiter untersucht werden. Dass Lysatbestandteile, wie zum Beispiel zytosolische Inhibitoren die Quantifizierung beeinflussen, sollte in Zukunft mit Hilfe von Spike-Experimenten ausgeschlossen werden.

Nach der Validierung wurden die Assays zur Untersuchung der Neutrophilenlysate einer größeren Gruppe von Probanden verwendet. Dabei können die intrazellulären Mengen der HNE, PR3, CathG und CathC problemlos in allen Proben bestimmt werden. Die Werte stehen in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer vorherigen aktivitätsbasierten Quantifizierung, sind jedoch geringer als die mit immunologischen Assays erbrachten. Dieser Unterschied könnte dadurch erklärt werden, dass letztere Methode zusätzlich Zymogene erfasst. Der aktuell vorherrschenden Meinung nach werden die Proteasen jedoch ausschließlich während der Granulopoese synthetisiert und unmittelbar aktiviert, sodass in zirkulierenden Neutrophilen keine inaktiven Vorstufen enthalten sein sollten [202, 203]. Andererseits gibt es Hinweise, dass es nach Freisetzung der Neutrophilen aus dem

Knochenmark durchaus zu Änderungen des Transkriptoms kommen kann [204]. Inwiefern dies auch auf die GASPIDs zutrifft, ist bisher allerdings unklar.

Im Rahmen der Probenentnahme wurde dabei lediglich das Alter und Geschlecht der Probanden erfasst. Um die in der Analyse der Ergebnisse gezeigten interindividuellen Unterschiede der Proteasemengen besser einordnen zu können, sollten in Zukunft weitere Charakteristika wie das Rauchverhalten oder Vorerkrankungen erhoben werden. In dieser Arbeit wurde zudem erstmalig ein geschlechtsspezifischer Unterschied der intrazellulären Proteasemengen gezeigt. Zur Bestätigung dieser Beobachtung sollten jedoch einerseits Messungen an einer größeren Kohorte von Probanden und Probandinnen erfolgen, und andererseits bleibt es zu klären, inwiefern dieses Phänomen im Zusammenhang mit dem weiblichen Zyklus steht.

Im Hinblick auf die Bedeutung der GASPIDs in der Pathogenese einer Vielzahl inflammatorischer Prozesse erscheint es von besonderem Interesse, auch die intrazellulären Proteasemengen erkrankter Individuen zu quantifizieren. Es ist denkbar, dass diese mit dem Vorliegen oder der Ausprägung von GASPID-assoziierten Erkrankungen wie beispielsweise der COPD korrelieren und somit zur Früherkennung oder Diagnostik verwendet werden können.

## 6 Quellenverzeichnis

1. Mayadas, T.N., X. Cullere, and C.A. Lowell, *The multifaceted functions of neutrophils*. *Annu Rev Pathol*, 2014. 9: p. 181-218.
2. Kaufmann, S.H., *Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff*. *Nat Immunol*, 2008. 9(7): p. 705-12.
3. Kay, A.B., *Paul Ehrlich and the Early History of Granulocytes*. *Microbiol Spectr*, 2016. 4(4).
4. Hager, M., J.B. Cowland, and N. Borregaard, *Neutrophil granules in health and disease*. *J Intern Med*, 2010. 268(1): p. 25-34.
5. von Vietinghoff, S. and K. Ley, *Homeostatic regulation of blood neutrophil counts*. *J Immunol*, 2008. 181(8): p. 5183-8.
6. Boll, I. and A. Kuhn, *Granulocytopoiesis in human bone marrow cultures studied by means of kinematography*. *Blood*, 1965. 26(4): p. 449-70.
7. Lawrence, S.M., R. Corriden, and V. Nizet, *The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2018. 82(1).
8. Iwasaki, H., et al., *Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation*. *Blood*, 2005. 106(5): p. 1590-600.
9. Dancey, J.T., et al., *Neutrophil kinetics in man*. *J Clin Invest*, 1976. 58(3): p. 705-15.
10. Pillay, J., et al., *In vivo labeling with  $2\text{H}_2\text{O}$  reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days*. *Blood*, 2010. 116(4): p. 625-7.
11. Summers, C., et al., *Neutrophil kinetics in health and disease*. *Trends Immunol*, 2010. 31(8): p. 318-24.
12. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(9): p. 678-89.
13. Petri, B. and M.J. Sanz, *Neutrophil chemotaxis*. *Cell Tissue Res*, 2018. 371(3): p. 425-436.
14. Nathan, C., *Neutrophils and immunity: challenges and opportunities*. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(3): p. 173-82.
15. Segal, A.W., *How superoxide production by neutrophil leukocytes kills microbes*. *Novartis Found Symp*, 2006. 279: p. 92-8; discussion 98-100, 216-9.
16. Zeidler, C., et al., *Clinical implications of ELA2-, HAX1-, and G-CSF-receptor (CSF3R) mutations in severe congenital neutropenia*. *Br J Haematol*, 2009. 144(4): p. 459-67.
17. Li, Y., et al., *The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity*. *Cell Commun Signal*, 2019. 17(1): p. 147.
18. Liew, P.X. and P. Kubes, *The Neutrophil's Role During Health and Disease*. *Physiol Rev*, 2019. 99(2): p. 1223-1248.
19. Mantovani, A., et al., *Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2011. 11(8): p. 519-31.
20. Tecchio, C. and M.A. Cassatella, *Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity*. *Semin Immunol*, 2016. 28(2): p. 119-28.
21. Fournier, B.M. and C.A. Parkos, *The role of neutrophils during intestinal inflammation*. *Mucosal Immunol*, 2012. 5(4): p. 354-66.

22. Canturk, N.Z., et al., *The role of L-arginine and neutrophils on incisional wound healing*. Eur J Emerg Med, 2001. 8(4): p. 311-5.
23. Huang, H., et al., *Neutrophil Elastase and Neutrophil Extracellular Traps in the Tumor Microenvironment*. Adv Exp Med Biol, 2020. 1263: p. 13-23.
24. Masucci, M.T., M. Minopoli, and M.V. Carriero, *Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy*. Front Oncol, 2019. 9: p. 1146.
25. Scapini, P. and M.A. Cassatella, *Social networking of human neutrophils within the immune system*. Blood, 2014. 124(5): p. 710-9.
26. Levin, R., S. Grinstein, and J. Canton, *The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution*. Immunol Rev, 2016. 273(1): p. 156-79.
27. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. 303(5663): p. 1532-5.
28. Papayannopoulos, V. and A. Zychlinsky, *NETs: a new strategy for using old weapons*. Trends Immunol, 2009. 30(11): p. 513-21.
29. Amulic, B., et al., *Neutrophil function: from mechanisms to disease*. Annu Rev Immunol, 2012. 30: p. 459-89.
30. Rosales, C., *Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types?* Front Physiol, 2018. 9: p. 113.
31. Rorvig, S., et al., *Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors*. J Leukoc Biol, 2013. 94(4): p. 711-21.
32. Sahoo, M., et al., *Neutrophil elastase causes tissue damage that decreases host tolerance to lung infection with burkholderia species*. PLoS Pathog, 2014. 10(8): p. e1004327.
33. Borregaard, N. and J.B. Cowland, *Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte*. Blood, 1997. 89(10): p. 3503-21.
34. Borregaard, N., et al., *Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation*. Blood, 1995. 85(3): p. 812-7.
35. Nordenfelt, P., et al., *Different requirements for early and late phases of azurophilic granule-phagosome fusion*. Traffic, 2009. 10(12): p. 1881-93.
36. Brochetta, C., et al., *Involvement of Munc18 isoforms in the regulation of granule exocytosis in neutrophils*. Biochim Biophys Acta, 2008. 1783(10): p. 1781-91.
37. Caughey, G.H., *A Pulmonary Perspective on GASPs: Granule-Associated Serine Peptidases of Immune Defense*. Curr Respir Med Rev, 2006. 2(39): p. 263-277.
38. Caughey, G.H., *Serine proteinases of mast cell and leukocyte granules. A league of their own*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. 150(6 Pt 2): p. S138-42.
39. Weiss, S.A.I., et al., *Origin and Expansion of the Serine Protease Repertoire in the Myelomonocyte Lineage*. Int J Mol Sci, 2021. 22(4).
40. Zimmer, M., et al., *Three human elastase-like genes coordinately expressed in the myelomonocyte lineage are organized as a single genetic locus on 19pter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(17): p. 8215-9.
41. Hohn, P.A., et al., *Genomic organization and chromosomal localization of the human cathepsin G gene*. J Biol Chem, 1989. 264(23): p. 13412-9.

42. Ahmad, J., P.I. Bird, and D. Kaiserman, *Analysis of the evolution of granule associated serine proteases of immune defence (GASPIDs) suggests a revised nomenclature*. Biol Chem, 2014. 395(10): p. 1253-62.
43. Korkmaz, B., et al., *Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases*. Pharmacol Rev, 2010. 62(4): p. 726-59.
44. Bode, W., et al., *X-ray crystal structure of the complex of human leukocyte elastase (PMN elastase) and the third domain of the turkey ovomucoid inhibitor*. EMBO J, 1986. 5(10): p. 2453-8.
45. Fujinaga, M., et al., *The crystal structure of PR3, a neutrophil serine proteinase antigen of Wegener's granulomatosis antibodies*. J Mol Biol, 1996. 261(2): p. 267-78.
46. Hof, P., et al., *The 1.8 Å crystal structure of human cathepsin G in complex with Suc-Val-Pro-PheP-(OPh)<sub>2</sub>: a Janus-faced proteinase with two opposite specificities*. EMBO J, 1996. 15(20): p. 5481-91.
47. Polgar, L., *The catalytic triad of serine peptidases*. Cell Mol Life Sci, 2005. 62(19-20): p. 2161-72.
48. Korkmaz, B., T. Moreau, and F. Gauthier, *Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions*. Biochimie, 2008. 90(2): p. 227-42.
49. Salvesen, G. and J.J. Enghild, *An unusual specificity in the activation of neutrophil serine proteinase zymogens*. Biochemistry, 1990. 29(22): p. 5304-8.
50. Methot, N., et al., *Inhibition of the activation of multiple serine proteases with a cathepsin C inhibitor requires sustained exposure to prevent pro-enzyme processing*. J Biol Chem, 2007. 282(29): p. 20836-46.
51. Adkison, A.M., et al., *Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis*. J Clin Invest, 2002. 109(3): p. 363-71.
52. Fu, Z., et al., *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: p. 2387.
53. Janoff, A. and J. Scherer, *Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes*. J Exp Med, 1968. 128(5): p. 1137-55.
54. Sinha, S., et al., *Primary structure of human neutrophil elastase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(8): p. 2228-32.
55. Nakajima, K., et al., *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): p. 4027-32.
56. Fitch, P.M., et al., *Human neutrophil elastase inhibitors in innate and adaptive immunity*. Biochem Soc Trans, 2006. 34(Pt 2): p. 279-82.
57. Bories, D., et al., *Down-regulation of a serine protease, myeloblastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocytic leukemia cells*. Cell, 1989. 59(6): p. 959-68.
58. Narayanam V. Rao, J.R.H., *Myeloblastin in Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2012. p. 2666-2675.

59. Braun, M.G., et al., *Proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies circulating in Wegener's granulomatosis. Immunolocalization in normal and pathologic tissues.* Am J Pathol, 1991. 139(4): p. 831-8.
60. Starkey, P.M. and A.J. Barrett, *Human cathepsin G. Catalytic and immunological properties.* Biochem J, 1976. 155(2): p. 273-8.
61. Hajjar, E., et al., *Structures of human proteinase 3 and neutrophil elastase--so similar yet so different.* FEBS J, 2010. 277(10): p. 2238-54.
62. Salvesen, G., *Cathepsin G*, in *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2012. p. 2661-2666.
63. Caughey, G.H., et al., *The human mast cell chymase gene (CMA1): mapping to the cathepsin G/granzyme gene cluster and lineage-restricted expression.* Genomics, 1993. 15(3): p. 614-20.
64. B. Korkmaz, F.G., *Elastase-2/Leukocyte Elastase*, in *Handbook of Proteolytic Enzymes* 2012. p. 2653-2661.
65. Scott, F.L., et al., *The intracellular serpin proteinase inhibitor 6 is expressed in monocytes and granulocytes and is a potent inhibitor of the azurophilic granule protease, cathepsin G.* Blood, 1999. 93(6): p. 2089-97.
66. Gutmann, H.R. and J.S. Fruton, *On the proteolytic enzymes of animal tissues; an intracellular enzyme related to chymotrypsin.* J Biol Chem, 1948. 174(3): p. 851-8.
67. Lamort, A.S., et al., *Processing and Maturation of Cathepsin C Zymogen: A Biochemical and Molecular Modeling Analysis.* Int J Mol Sci, 2019. 20(19).
68. Turk, D., et al., *Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): exclusion domain added to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine proteases.* EMBO J, 2001. 20(23): p. 6570-82.
69. Molgaard, A., et al., *The crystal structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) in complex with the inhibitor Gly-Phe-CHN2.* Biochem J, 2007. 401(3): p. 645-50.
70. Poreba, M., et al., *Unnatural amino acids increase activity and specificity of synthetic substrates for human and malarial cathepsin C.* Amino Acids, 2014. 46(4): p. 931-43.
71. Pham, C.T., et al., *Molecular cloning, chromosomal localization, and expression of murine dipeptidyl peptidase I.* J Biol Chem, 1997. 272(16): p. 10695-703.
72. McGuire, M.J., P.E. Lipsky, and D.L. Thiele, *Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I.* J Biol Chem, 1993. 268(4): p. 2458-67.
73. Kolset, S.O. and J.T. Gallagher, *Proteoglycans in haemopoietic cells.* Biochim Biophys Acta, 1990. 1032(2-3): p. 191-211.
74. Reeves, E.P., et al., *Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux.* Nature, 2002. 416(6878): p. 291-7.
75. Benarafa, C., *Regulation of Neutrophil Serine Proteases by Intracellular Serpins.* The Serpin Family: Proteins with Multiple Functions in Health and Disease, 2015: p. 59-76.
76. Moreau, T., et al., *Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family.* Biochimie, 2008. 90(2): p. 284-95.
77. Doan, N. and P.G. Gettins, *Human alpha2-macroglobulin is composed of multiple domains, as predicted by homology with complement component C3.* Biochem J, 2007. 407(1): p. 23-30.

78. Stapels, D.A., B.V. Geisbrecht, and S.H. Rooijackers, *Neutrophil serine proteases in antibacterial defense*. *Curr Opin Microbiol*, 2015. 23: p. 42-8.
79. Faurischou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. *Microbes Infect*, 2003. 5(14): p. 1317-27.
80. Lopez-Boado, Y.S., et al., *Neutrophil serine proteinases cleave bacterial flagellin, abrogating its host response-inducing activity*. *J Immunol*, 2004. 172(1): p. 509-15.
81. Weinrauch, Y., et al., *Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria*. *Nature*, 2002. 417(6884): p. 91-4.
82. Belaaouaj, A., K.S. Kim, and S.D. Shapiro, *Degradation of outer membrane protein A in Escherichia coli killing by neutrophil elastase*. *Science*, 2000. 289(5482): p. 1185-8.
83. Sorensen, O.E., et al., *Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3*. *Blood*, 2001. 97(12): p. 3951-9.
84. Overhage, J., et al., *Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation*. *Infect Immun*, 2008. 76(9): p. 4176-82.
85. Meyer-Hoffert, U. and O. Wiedow, *Neutrophil serine proteases: mediators of innate immune responses*. *Curr Opin Hematol*, 2011. 18(1): p. 19-24.
86. Pham, C.T., *Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. 40(6-7): p. 1317-33.
87. Heutinck, K.M., et al., *Serine proteases of the human immune system in health and disease*. *Mol Immunol*, 2010. 47(11-12): p. 1943-55.
88. Kessenbrock, K., T. Dau, and D.E. Jenne, *Tailor-made inflammation: how neutrophil serine proteases modulate the inflammatory response*. *J Mol Med (Berl)*, 2011. 89(1): p. 23-8.
89. Pham, C.T., *Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(7): p. 541-50.
90. Devaney, J.M., et al., *Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4*. *FEBS Lett*, 2003. 544(1-3): p. 129-32.
91. Zhao, P., M. Metcalf, and N.W. Bunnett, *Biased signaling of protease-activated receptors*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014. 5: p. 67.
92. Chin, A.C., et al., *Neutrophil-mediated activation of epithelial protease-activated receptors-1 and -2 regulates barrier function and transepithelial migration*. *J Immunol*, 2008. 181(8): p. 5702-10.
93. Loison, F., et al., *Proteinase 3-dependent caspase-3 cleavage modulates neutrophil death and inflammation*. *J Clin Invest*, 2014. 124(10): p. 4445-58.
94. Preston, G.A., et al., *Novel effects of neutrophil-derived proteinase 3 and elastase on the vascular endothelium involve in vivo cleavage of NF-kappaB and proapoptotic changes in JNK, ERK, and p38 MAPK signaling pathways*. *J Am Soc Nephrol*, 2002. 13(12): p. 2840-9.
95. Sambrano, G.R., et al., *Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets*. *J Biol Chem*, 2000. 275(10): p. 6819-23.
96. Papayannopoulos, V., et al., *Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps*. *J Cell Biol*, 2010. 191(3): p. 677-91.
97. Kasperkiewicz, P., et al., *NETosis occurs independently of neutrophil serine proteases*. *J Biol Chem*, 2020. 295(51): p. 17624-17631.

98. DeMali, K.A., K. Wennerberg, and K. Burridge, *Integrin signaling to the actin cytoskeleton*. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. 15(5): p. 572-82.
99. Janoff, A., *Elastase in tissue injury*. *Annu Rev Med*, 1985. 36: p. 207-16.
100. Yang, S.C., et al., *Understanding the role of neutrophils in acute respiratory distress syndrome*. *Biomed J*, 2021. 44(4): p. 439-446.
101. Kawabata, K., T. Hagio, and S. Matsuoka, *The role of neutrophil elastase in acute lung injury*. *Eur J Pharmacol*, 2002. 451(1): p. 1-10.
102. Demkow, U. and F.J. van Overveld, *Role of elastases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: implications for treatment*. *Eur J Med Res*, 2010. 15 Suppl 2: p. 27-35.
103. Swenson, K.E. and E.R. Swenson, *Pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome and COVID-19 Lung Injury*. *Crit Care Clin*, 2021. 37(4): p. 749-776.
104. Pierrakos, C., et al., *Acute respiratory distress syndrome: pathophysiology and therapeutic options*. *J Clin Med Res*, 2012. 4(1): p. 7-16.
105. Sommerhoff, C.P., et al., *Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells*. *J Clin Invest*, 1990. 85(3): p. 682-9.
106. Schmickl, C.N., et al., *Comparison of hospital mortality and long-term survival in patients with acute lung injury/ARDS vs cardiogenic pulmonary edema*. *Chest*, 2015. 147(3): p. 618-625.
107. Taylor, J.D., *COPD and the response of the lung to tobacco smoke exposure*. *Pulm Pharmacol Ther*, 2010. 23(5): p. 376-83.
108. Laurell, C.B. and S. Eriksson, *The electrophoretic alpha1-globulin pattern of serum in alpha1-antitrypsin deficiency*. 1963. *COPD*, 2013. 10 Suppl 1: p. 3-8.
109. Barnes, P.J., *Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. *J Allergy Clin Immunol*, 2016. 138(1): p. 16-27.
110. Pandey, K.C., S. De, and P.K. Mishra, *Role of Proteases in Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. *Front Pharmacol*, 2017. 8: p. 512.
111. Weathington, N.M., et al., *A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation*. *Nat Med*, 2006. 12(3): p. 317-23.
112. Takeyama, K., et al., *Neutrophil-dependent goblet cell degranulation: role of membrane-bound elastase and adhesion molecules*. *Am J Physiol*, 1998. 275(2): p. L294-302.
113. Voynow, J.A. and M. Shinbashi, *Neutrophil Elastase and Chronic Lung Disease*. *Biomolecules*, 2021. 11(8).
114. Granel, J., et al., *Pathogenicity of Proteinase 3-Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody in Granulomatosis With Polyangiitis: Implications as Biomarker and Future Therapies*. *Front Immunol*, 2021. 12: p. 571933.
115. Nakazawa, D., et al., *Pathogenesis and therapeutic interventions for ANCA-associated vasculitis*. *Nat Rev Rheumatol*, 2019. 15(2): p. 91-101.
116. McKelvey, M.C., et al., *Targeting Proteases in Cystic Fibrosis Lung Disease. Paradigms, Progress, and Potential*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020. 201(2): p. 141-147.
117. Toomes, C., et al., *Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis*. *Nat Genet*, 1999. 23(4): p. 421-4.

118. Pham, C.T., et al., *Papillon-Lefevre syndrome: correlating the molecular, cellular, and clinical consequences of cathepsin C/dipeptidyl peptidase I deficiency in humans*. J Immunol, 2004. 173(12): p. 7277-81.
119. Roberts, H.M., et al., *Impaired neutrophil directional chemotactic accuracy in chronic periodontitis patients*. J Clin Periodontol, 2015. 42(1): p. 1-11.
120. Guay, D., C. Beaulieu, and M.D. Percival, *Therapeutic utility and medicinal chemistry of cathepsin C inhibitors*. Curr Top Med Chem, 2010. 10(7): p. 708-16.
121. Korkmaz, B., et al., *Cathepsin C inhibition as a potential treatment strategy in cancer*. Biochem Pharmacol, 2021: p. 114803.
122. Yoshimura, K. and O. Tanabe, *[Structure and expression of the human neutrophil elastase gene--regulatory mechanism and its relevance to the respiratory diseases]*. Nihon Rinsho, 1996. 54(2): p. 396-404.
123. Ferdous, M., et al., *Expression of neutrophil elastase and myeloperoxidase mRNA in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus*. Diabetes Metab Syndr, 2020. 14(2): p. 83-85.
124. Edgington, L.E., M. Verdoes, and M. Bogyo, *Functional imaging of proteases: recent advances in the design and application of substrate-based and activity-based probes*. Curr Opin Chem Biol, 2011. 15(6): p. 798-805.
125. Kasperkiewicz, P., et al., *Toolbox of Fluorescent Probes for Parallel Imaging Reveals Uneven Location of Serine Proteases in Neutrophils*. J Am Chem Soc, 2017. 139(29): p. 10115-10125.
126. Castillo, M.J., et al., *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): p. 53-64.
127. Arian, D., J. Harenberg, and R. Kramer, *A Chromogenic and Fluorogenic Peptide Substrate for the Highly Sensitive Detection of Proteases in Biological Matrices*. J Med Chem, 2016. 59(16): p. 7576-83.
128. Wysocka, M., et al., *New chromogenic substrates of human neutrophil cathepsin G containing non-natural aromatic amino acid residues in position P(1) selected by combinatorial chemistry methods*. Mol Divers, 2007. 11(2): p. 93-9.
129. Gomori, G., *Chromogenic substrates for aminopeptidase*. Proc Soc Exp Biol Med, 1954. 87(3): p. 559-61.
130. Hedstrom, L., *Serine protease mechanism and specificity*. Chem Rev, 2002. 102(12): p. 4501-24.
131. Brubaker, M.J., et al., *Human neutrophil proteinase 3: mapping of the substrate binding site using peptidyl thiobenzyl esters*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. 188(3): p. 1318-24.
132. Janoff, A., *Alanine p-nitrophenyl esterase activity of human leucocyte granules*. Biochem J, 1969. 114(1): p. 157-9.
133. Legowska, M., et al., *Development of the first internally-quenched fluorescent substrates of human cathepsin C: The application in the enzyme detection in biological samples*. Arch Biochem Biophys, 2016. 612: p. 91-102.
134. Carmona, A.K., M.A. Juliano, and L. Juliano, *The use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) peptides for measurement of clinically important proteolytic enzymes*. An Acad Bras Cienc, 2009. 81(3): p. 381-92.

135. Popow-Stellmaszyk, J., et al., *A new proteinase 3 substrate with improved selectivity over human neutrophil elastase*. *Anal Biochem*, 2013. 442(1): p. 75-82.
136. Korkmaz, B., et al., *Measuring elastase, proteinase 3 and cathepsin G activities at the surface of human neutrophils with fluorescence resonance energy transfer substrates*. *Nat Protoc*, 2008. 3(6): p. 991-1000.
137. Brooks, H.B., et al., *Basics of Enzymatic Assays for HTS*, in *Assay Guidance Manual*, S. Markossian, et al., Editors. 2004: Bethesda (MD).
138. Bisswanger, H., *Enzyme assays*. *Perspectives in Science*, 2014. 1(1): p. 41-55.
139. Greenbaum, D., et al., *Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools*. *Chem Biol*, 2000. 7(8): p. 569-81.
140. Jugniot, N., et al., *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: p. 7417192.
141. Blum, G., et al., *Noninvasive optical imaging of cysteine protease activity using fluorescently quenched activity-based probes*. *Nat Chem Biol*, 2007. 3(10): p. 668-77.
142. Pan, S., et al., *Target identification of natural products and bioactive compounds using affinity-based probes*. *Nat Prod Rep*, 2016. 33(5): p. 612-20.
143. Patricelli, M.P., et al., *Direct visualization of serine hydrolase activities in complex proteomes using fluorescent active site-directed probes*. *Proteomics*, 2001. 1(9): p. 1067-71.
144. Greenbaum, D., et al., *Chemical approaches for functionally probing the proteome*. *Mol Cell Proteomics*, 2002. 1(1): p. 60-8.
145. Sadaghiani, A.M., S.H. Verhelst, and M. Bogyo, *Tagging and detection strategies for activity-based proteomics*. *Curr Opin Chem Biol*, 2007. 11(1): p. 20-8.
146. Kasperkiewicz, P., *Peptidyl Activity-Based Probes for Imaging Serine Proteases*. *Front Chem*, 2021. 9: p. 639410.
147. Campbell, E.J., E.K. Silverman, and M.A. Campbell, *Elastase and cathepsin G of human monocytes. Quantification of cellular content, release in response to stimuli, and heterogeneity in elastase-mediated proteolytic activity*. *J Immunol*, 1989. 143(9): p. 2961-8.
148. Hasmann, A., et al., *Sensor materials for the detection of human neutrophil elastase and cathepsin G activity in wound fluid*. *Exp Dermatol*, 2011. 20(6): p. 508-13.
149. Turkoglu, O., et al., *Are proteinase 3 and cathepsin C enzymes related to pathogenesis of periodontitis?* *Biomed Res Int*, 2014. 2014: p. 420830.
150. Kasperkiewicz, P., 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): p. 2518-23.
151. Witko-Sarsat, V., et al., *Proteinase 3, a potent secretagogue in airways, is present in cystic fibrosis sputum*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. 20(4): p. 729-36.
152. Campbell, E.J., M.A. Campbell, and C.A. Owen, *Bioactive proteinase 3 on the cell surface of human neutrophils: quantification, catalytic activity, and susceptibility to inhibition*. *J Immunol*, 2000. 165(6): p. 3366-74.
153. Attucci, S., et al., *Measurement of free and membrane-bound cathepsin G in human neutrophils using new sensitive fluorogenic substrates*. *Biochem J*, 2002. 366(Pt 3): p. 965-70.

154. Hashimoto, S., et al., *Neutrophil elastase activity in acute lung injury and respiratory distress syndrome*. *Respirology*, 2008. 13(4): p. 581-4.
155. Mantyla, P., et al., *Acute myocardial infarction elevates serine protease activity in saliva of patients with periodontitis*. *J Periodontal Res*, 2012. 47(3): p. 345-53.
156. Liu, H., et al., *Proteinase 3 expression on the neutrophils of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*. *Exp Ther Med*, 2018. 15(3): p. 2525-2532.
157. Choi, S.R., et al., *Neutrophil elastase in cervical fluid in women with short cervical length*. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2018. 57(3): p. 407-410.
158. Cagnone, M., et al., *A Pilot Study to Investigate the Balance between Proteases and alpha1-Antitrypsin in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Lung Transplant Recipients*. *High Throughput*, 2019. 8(1).
159. Thulborn, S.J., et al., *Neutrophil elastase as a biomarker for bacterial infection in COPD*. *Respir Res*, 2019. 20(1): p. 170.
160. Barry, R., et al., *Faecal neutrophil elastase-antiprotease balance reflects colitis severity*. *Mucosal Immunol*, 2020. 13(2): p. 322-333.
161. Patterson, E.K., et al., *Proteinase 3 contributes to endothelial dysfunction in an experimental model of sepsis*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021. 246(21): p. 2338-2345.
162. Liu, Y., et al., *The role of neutrophil elastase in aortic valve calcification*. *J Transl Med*, 2022. 20(1): p. 167.
163. McElvaney, O.F., et al., *Protease-anti-protease compartmentalization in SARS-CoV-2 ARDS: Therapeutic implications*. *EBioMedicine*, 2022. 77: p. 103894.
164. J. Leding, C.P.S., *Aktivitätsbasierte Assays zur Quantifizierung Granula-assoziiierter Serinproteasen in Leukozyten und Mastzellen*, in *Inauguraldissertation der Ludwig-Maximilians-Universität München*. 2022.
165. Koehl, C., C.G. Knight, and J.G. Bieth, *Compared action of neutrophil proteinase 3 and elastase on model substrates. Favorable effect of S'-P' interactions on proteinase 3 catalysts*. *J Biol Chem*, 2003. 278(15): p. 12609-12.
166. Caughey, G.H., et al., *Purification and characterization of dog mastocytoma chymase: identification of an octapeptide conserved in chymotryptic leukocyte proteinases*. *Biochim Biophys Acta*, 1988. 952(2): p. 142-9.
167. Radzey, H., et al., *E-64c-hydrazide: a lead structure for the development of irreversible cathepsin C inhibitors*. *ChemMedChem*, 2013. 8(8): p. 1314-21.
168. Gillooly, J.F., A. Hein, and R. Damiani, *Nuclear DNA Content Varies with Cell Size across Human Cell Types*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015. 7(7): p. a019091.
169. Ginis, I., et al., *Comparison of actin changes and calcium metabolism in plastic- and fibronectin-adherent human neutrophils*. *J Immunol*, 1992. 149(4): p. 1388-94.
170. Berntzen, H.B. and M.K. Fagerhol, *L1, a major granulocyte protein; isolation of high quantities of its subunits*. *Scand J Clin Lab Invest*, 1990. 50(7): p. 769-74.
171. Nilsen, T., S.H. Haugen, and A. Larsson, *Extraction, isolation, and concentration of calprotectin antigen (S100A8/S100A9) from granulocytes*. *Health Sci Rep*, 2018. 1(5): p. e35.
172. Kao, R.C., et al., *Proteinase 3. A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters*. *J Clin Invest*, 1988. 82(6): p. 1963-73.

173. Parker, H., et al., *Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide*. J Leukoc Biol, 2012. 91(3): p. 369-76.
174. Chalmers, J.D., et al., *Neutrophil Elastase Activity Is Associated with Exacerbations and Lung Function Decline in Bronchiectasis*. Am J Respir Crit Care Med, 2017. 195(10): p. 1384-1393.
175. Frey, D.e., proteinase 3 and cathepsin G activities at the surface of human neutrophils with fluorescence resonance energy transfer substrates, et al., *Monitoring Neutrophil Elastase and Cathepsin G Activity in Human Sputum Samples*. J Vis Exp, 2021(171).
176. Serena, T.E., et al., *Defining a new diagnostic assessment parameter for wound care: Elevated protease activity, an indicator of nonhealing, for targeted protease-modulating treatment*. Wound Repair Regen, 2016. 24(3): p. 589-95.
177. Grassi, L., et al., *Dynamics of Transcription Regulation in Human Bone Marrow Myeloid Differentiation to Mature Blood Neutrophils*. Cell Rep, 2018. 24(10): p. 2784-2794.
178. Zhao, D., et al., *Catalytic Antibodies: Design, Expression, and Their Applications in Medicine*. Appl Biochem Biotechnol, 2023. 195(2): p. 1514-1540.
179. Srinivasan, B., *Words of advice: teaching enzyme kinetics*. FEBS J, 2021. 288(7): p. 2068-2083.
180. Onyeogaziri, F.C. and C. Papanephytou, *A General Guide for the Optimization of Enzyme Assay Conditions Using the Design of Experiments Approach*. SLAS Discov, 2019. 24(5): p. 587-596.
181. Rao, N.V., et al., *Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties*. J Biol Chem, 1991. 266(15): p. 9540-8.
182. Benarafa, C., et al., *Characterization of four murine homologs of the human ov-serpin monocyte neutrophil elastase inhibitor MNEI (SERPINB1)*. J Biol Chem, 2002. 277(44): p. 42028-33.
183. Cui, C., et al., *Isolation of polymorphonuclear neutrophils and monocytes from a single sample of human peripheral blood*. STAR Protoc, 2021. 2(4): p. 100845.
184. Kuhns, D.B., et al., *Isolation and Functional Analysis of Human Neutrophils*. Curr Protoc Immunol, 2015. 111: p. 7 23 1-7 23 16.
185. Au - Hsu, A.Y., et al., *Isolation of Human Neutrophils from Whole Blood and Buffy Coats*. JoVE, 2021(175): p. e62837.
186. Plank, K., C. Dorn, and S.W. Krause, *The effect of erythrocyte lysing reagents on enumeration of leukocyte subpopulations compared with a no-lyse-no-wash protocol*. Int J Lab Hematol, 2021. 43(5): p. 939-947.
187. Keir, H.R., et al., *Profile of the ProAxis active neutrophil elastase immunoassay for precision medicine in chronic respiratory disease*. Expert Rev Mol Diagn, 2017. 17(10): p. 875-884.
188. Department of Pediatrics, O.H., Medical University of Lodz. *FixNet - Fix Neutropenia*. URL: <https://fixnet.umed.pl/contact/>. 2023 abgerufen am 29.12.2023].
189. Aratani, Y., *Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function*. Arch Biochem Biophys, 2018. 640: p. 47-52.
190. de Haar, S.F., et al., *Loss-of-function mutations in cathepsin C in two families with Papillon-Lefevre syndrome are associated with deficiency of serine proteinases in PMNs*. Hum Mutat, 2004. 23(5): p. 524.

191. Methot, N., et al., *In vivo inhibition of serine protease processing requires a high fractional inhibition of cathepsin C*. Mol Pharmacol, 2008. 73(6): p. 1857-65.
192. Korkmaz, B., et al., *Lung Protection by Cathepsin C Inhibition: A New Hope for COVID-19 and ARDS?* J Med Chem, 2020. 63(22): p. 13258-13265.
193. Shen, X.B., et al., *Cathepsin C inhibitors as anti-inflammatory drug discovery: Challenges and opportunities*. Eur J Med Chem, 2021. 225: p. 113818.
194. Cipolla, D., et al., *Dipeptidyl peptidase-1 inhibition with brensocatib reduces the activity of all major neutrophil serine proteases in patients with bronchiectasis: results from the WILLOW trial*. Respir Res, 2023. 24(1): p. 133.
195. Chalmers, J.D., et al., *Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Evaluation of the Dipeptidyl Peptidase 1 Inhibitor Brensocatib for Non-cystic Fibrosis Bronchiectasis*. Clin Pharmacokinet, 2022. 61(10): p. 1457-1469.
196. Gilliver, S.C., *Sex steroids as inflammatory regulators*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. 120(2-3): p. 105-15.
197. Straub, R.H., *The complex role of estrogens in inflammation*. Endocr Rev, 2007. 28(5): p. 521-74.
198. Bain, B.J. and J.M. England, *Normal haematological values: sex difference in neutrophil count*. Br Med J, 1975. 1(5953): p. 306-9.
199. Rodenas, M.C., et al., *G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 Regulates Human Neutrophil Functions*. Biomed Hub, 2017. 2(1): p. 1-13.
200. Ecker, S., et al., *Genome-wide analysis of differential transcriptional and epigenetic variability across human immune cell types*. Genome Biol, 2017. 18(1): p. 18.
201. Dai, R., et al., *Neutrophils and neutrophil serine proteases are increased in the spleens of estrogen-treated C57BL/6 mice and several strains of spontaneous lupus-prone mice*. PLoS One, 2017. 12(2): p. e0172105.
202. Cowland, J.B. and N. Borregaard, *The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules*. J Leukoc Biol, 1999. 66(6): p. 989-95.
203. Garwicz, D., et al., *Biosynthetic profiles of neutrophil serine proteases in a human bone marrow-derived cellular myeloid differentiation model*. Haematologica, 2005. 90(1): p. 38-44.
204. Lakschevitz, F.S., et al., *Neutrophil transcriptional profile changes during transit from bone marrow to sites of inflammation*. Cell Mol Immunol, 2015. 12(1): p. 53-65.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Daniel Teupser, der mir die Möglichkeit gegeben hat meine Promotion am Institut für Laboratoriumsmedizin der LMU München durchzuführen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christian Sommerhoff für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und sein großes Vertrauen. Er eröffnete mir mit größter Leidenschaft die wunderbare Welt der Proteasen und Enzymkinetik. Allzeit stand er mir mit Ratschlägen zur Seite und begleitete alle Schritte dieser Arbeit mit unvergleichlichem Engagement sowie großer Menschlichkeit. Durch unzählige konstruktive Diskussionen prägte er mein wissenschaftliches Denken und Schreiben in besonderer Art und Weise. Auch für die Möglichkeit der Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen danke ich ihm herzlich.

Weiterhin danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Proteolyse für die sehr gute Atmosphäre und große Hilfsbereitschaft. Erika Siepmann und Stephan Simon danke ich ganz besonders für ihren großen Einsatz im Rahmen meiner Einführung in experimentelle Techniken und jegliche Unterstützung während meiner Zeit im Labor. Besonders möchte ich meinem Mitdoktoranden Herrn Fabian Ullrich für die moralische Unterstützung und kreativen Einfälle, die den Laboralltag bunter machten, danken.

Tief verbunden bin ich meinem Ehemann Herrn PD Dr. Nikolaus Thierfelder für seine liebevolle Unterstützung in den letzten Jahren und all die wertvollen Diskussionen, die mich während der Erstellung dieser Arbeit vielfältig inspirierten.

Von Herzen danke ich meinen Eltern Sigrun und Bernhard Riedlinger, ohne deren bedingungslosen Rückhalt und Zuspruch das Studium der Humanmedizin sowie diese Arbeit niemals möglich gewesen wären. Danken möchte ich auch meinen beiden wunderbaren Brüdern Matthias und David, die mir immer eine große Stütze sind.

Schließlich möchte ich auch meinem gesamten Freundeskreis und insbesondere Laura, Sabrina, Isabel, Felix und Alex für ihre Unterstützung und Verständnis in den letzten Jahren danken.