Humane neutrophile Elastase: Identifizierung der ß$_2$–Integrine als Bindungsstellen auf humanen neutrophilen Granulozyten

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte

Dissertation
(D386)

vorgelegt von

Frank Zimmermann

Flonheim
2000

Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahrens eingereicht am: 25.01.2000

Betreuer: Prof. Dr. W. Trommer
Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 28.02.2000

Promotionskommission: Vorsitzender: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk
1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. E. Trommer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. M. Hänsch

Die vorliegende Arbeit entstand vom Oktober 1996 bis Februar 2000 im Rahmen des Graduiertenkollegs „Experimentelle Nieren– und Kreislaufforschung“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft am Institut für Immunologie und Serologie, ärztl. Direktor Prof. Dr. S. Meuer, in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. G. M. Hänsch.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. G. Maria Hänsch für die Themenstellung, so–wie für Ihre stete Diskussionsbereitschaft und Anregungen während der Erstellung der Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Stefan Meuer, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an seinem Institut.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer danke ich für die Betreuung dieser Arbeit am Fachbereich Chemie.

Teile dieser Arbeit wurden Veröfentlicht in:

Orginalarbeiten:

Morcos, M., **Zimmermann, F.**, Radsak, M., Wörner, I., Kramer, M. D., Roland, J., Hänsch, G.M., Andrassy, K. (1998) Autoantibodies to polymorphonuclear neutrophil elastase do not inhibit but enhance elastase activity. Am. J. Kidney Dis. 31, 978–985.

Eine weitere Publikation ist in Vorbereitung.

Kongreßbeiträge:

2. – 5. April 1998: The 8th International Meeting on Vasculitis and ANCA–related Diseases, Birmingham UK: „Surface bound expression of polymorphonuclear neutrophil (PMN) elastase: ß2–integrins may serve as binding site“ (Clin. Exp. Immunol. 112, 1998, 40.)

23. – 26. Sept. 1998: 29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI), Freiburg: „Binding of elastase to the cell surface of polymorphonuclear neutrophils (PMN): ß2–integrins might act as major binding site“ (Immunobiol. 199, 1998, 507.)

29. Sept. – 2. Oct. 1999: 30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI), Hannover: „Expression of elastase on the cell surface of human polymorphonuclear neutrophils: the complement receptor type 3 (CR3, CD11b/CD18) serves as ligand“ (Immunobiol. 200, 1999, 643.)

1. – 8. Nov. 1999: ASN 32nd Annual Meeting and Scientific Exposition, Miami Beach, USA: „Binding of elastase to the surface of polymorphonuclear neutrophils: ß2–integrins serve as ligands“ (J. Am. Soc. Neph. 10, 1999)

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....1

1 Einleitung.....1

1.1 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN).....1
1.1.1 Die Adhäsionskaskade.....3
1.1.2 Phagozytose und Abtötung pathogener Keime.....5
1.2 Die Serinproteasen.....6
1.2.1 Die Serinproteasen des zellulären Immunsystems.....7
1.3 ß2−Integrine.....10
1.4 Fehlgeleitete Entzündungen.....14
1.5 Immunmodulatorische Funktionen der PMN und der Serinproteasen.....16

2 Problemstellung.....18

3 Ergebnisse.....19

3.1 Bindungsstudien mit exogener Elastase.....19
3.1.1 Exogene Elastase bindet an die Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten und promyeloblastischer Zellinien.....19
3.1.2 Untersuchungen zur Hemmbarkeit der Bindung von Elastase an die Zelloberfläche unter dem Einfluß verschiedener Faktoren.....21
3.1.2.1 Hemmung der Bindung exogener Elastase durch Antikörper.....21
3.1.2.2 Peptidfragmente des Komplementspaltstückes C3bi hemmen die Bindung exogener Elastase an die Zelloberfläche.....27
3.1.2.3 Die Serinproteasen PR3, Cathepsin G und PPE hemmen die Oberflächenbindung exogener Elastase.....29
3.1.2.4 Die Bindung exogener Elastase an die Zelloberfläche wird von zweiwertigen Kationen beeinflußt.....32
3.1.2.5 Die Inaktivierung der katalytischen Elastaseaktivität vermindert …die Zahl der Bindungen an die Zelloberfläche.....37
3.2 Elastase bindet an den isolierten Komplementrezeptor Typ 3 (CR3, CD11b/CD18).....39
3.3 Elastase läßt sich mit CD11a und CD11b von der Zellmembran stimulierter PMN isolieren.....41
3.4 Einfluß der Serinproteasen auf die Zahl der Bindungsstellen auf stimulierten PMN.....43
3.5 Kolokalisation von Elastase und CD11b auf stimulierten PMN.....47
3.6 Oberflächengebundene Elastase erhöht die Bindung von PMN an C3bi−opsonierte Schafserythrozyen.....49
3.7 Die Bindung exogener Elastase auf an PMN induziert eine Konformationsänderung in der I−Domäne von CD11b.....51
3.8 Auswirkung der Elastasebindung an die Zelloberfläche von PMN auf die Adhäsion an Epithelien und Endothelien.....53

4 Zusammenfassende Diskussion.....55

5 Material und Methoden.....63

5.1 Material.....63
5.1.1 Chemikalien.....63
5.1.2 Antikörper.....65

5.1.2.1 Primäre monoklonale Antikörper von der Maus.....65
5.1.2.2 Primäre polyklonale Antikörper.....65
5.1.2.3 Sekundäre Antikörper.....66
5.1.2.4 Kontrollantikörper.....66
5.1.3 Verbrauchsmaterialien.....66
5.1.4 Verwendete Puffer.....67
5.2 Geräte.....70
5.3 Methoden.....70
5.3.1 Isolation und Stimulation von Granulozyten.....70
5.3.1.1 Zellisolation.....70
5.3.1.2 Zellstimulation.....71
5.3.2 Durchflußzytometrie.....71
5.3.3 Kultivierung permanenter Zellinien.....72
5.3.4 Kompetitive Bindungsstudien mit exogener Elastase.....72
5.3.4.1 Bestimmung der Bindungsstellen auf der Zelloberfläche.....72
5.3.4.2 Hemmung der Bindung exogener Elastase.....73
5.3.4.3 Einfluß zweiwertiger Kationen auf die Bindung.....73
5.3.5 Herstellung von Zellmembranextrakten.....73
5.3.6 SDS−Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS−PAGE) und Immunoblot...74
5.3.7 Immunpräzipitation.....75
5.3.8 Indirekte Immunfluoreszenz.....75
5.3.9 Bindung von Elastase an isolierten Komplementrezeptor Typ 3 (CR3, Mac−1, CD11b/CD18).....76
5.3.9.1 Isolierung von CR3.....76
5.3.9.2 Bindungststudien an isoliertem CR3.....76
5.3.10 Einfluß der oberflächengebundenen Elastase auf die CD11b−C3bi−Wechselwirkung.....77
5.3.10.1 Kopplung des Komplementfragments C3bi an Schafserythrozyten.77
5.3.10.2 Rosettenbildung.....77
5.3.11 Adhäsion auf Monolayer.....78
5.3.11.1 Adhäsion auf Epithelzellmonolayer.....78
5.3.11.2 Adhäsion auf Endothelzellmonolayer.....78

6 Literaturverzeichnis.....79

Abkürzungen

5(6)−FAM	5−(und−6−)−Carboxyfluorescein
α_1−PI	α_1−Proteaseinhibitor
ANCA	anti−neutrophile zytoplasmatische Antiköper
APS	Ammoniumperoxodisufat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
BPI	bakterizides/Permeabilitä−erhöhendes Protein
BSA	Serumalbumin vom Rind
BSOCOES	Bis[2−succinimidyl(oxycarbonyl)ethyl]sulfon
CD	*cluster of differentation*
CG	Cathepsin G
CR1	Komplementrezeptor Typ 1 (CD35)
CR3	Komplementrezeptor Typ 3 (CD11b/CD18, Mac−1)
CR4	Komplementrezeptor Typ 4 (CD11c/CD18, p150,95)
CRR	cysteinreiche Region
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DSP	Dithiobis[succinimidylpropionat]
EC	Endothelzelle
ECGF	Endothelzellwachstumsfaktor
ECL	*enhanced chemiluminescence*
EDTA	Ethylendiamin−N,N,N',N'−tetraacetat
EGTA	Ethylenglycol−bis(2−aminoethylether)−N,N,N',N'−tetraessigsäure
ELISA	*Enzyme linked Immunoassay*
FcγR	Fcγ−Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescinisothiocyanat
fMLP	formyl−Methionin−Leucin−Phenylalanin (fMet−Leu−Phe)
G−CSF	Granulozytenkolonien−stimulierender Faktor
GM−CSF	Granulozyten−Makrophagenkolonien−stimulierender Faktor
HBSS	Hank´s gepufferte Kochsalzlösung
HEV	hochendotheliale Venole
HNE	humane neutrophile Elastase
HRP	Meerrettichperoxidase
HSA	humanes Serumalbumin
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
INF	Interferon
KI	Konfidenzintervall
LAD	Leukozytenadhäsionsdefekt

LTB4	Leukotrien B4
MIDAS	Metallionen−abhängige Bindungsstelle
MIP	Macrophagen−inflammatorisches Protein
MPO	Myeloperoxidase
NIF	Neutrophilen inhibierender Faktor
OD	Optische Dichte
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerithrin
PECAM−1	Plättchen−Endothelzell−Adhäsionsmolekül 1
PFA	Paraformaldehyd
PI	Phosphatidylinositol
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol−12−myristat−13−acetat
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonsäurefluorid
PPE	Pancreaselastase vom Schwein
PR3	Proteinase 3
PSEGL−1	P−Selektin−Glykoproteinligand 1
PVDF	Polyvinyldifluorid
S_D	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
S_E	Standardfehler
SEC	Serpin−Enzym−Komplex
SOD	Superoxiddismutase
ß−ME	ß−Mercaptoethanol
sulfo−EGS	Ethylenglycolbis(sulfosuccinimidylsuccinat)
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N‘,N‘−Tertramethlyethylendiamin
TIU	Trypsininhibitoreinheit
TNF−α	Tumornekrosefaktor−α
Tris	Tris−hydroxmethyl−aminomethan
v/v	Volumen/Volumen
VBS	Veronal gepufferte Kochsalzlösung
w/v	Masse/Volumen
WG	Wegener´sche Granulomatose

1 Einleitung

Das Immunsystem hat die Aufgabe pathogene Mikroorganismen und entartete körpereigene Tumorzellen unschädlich zu machen. Dazu stellt es eine Reihe unspezifischer und spezifischer Abwehrmechanismen bereit. Die alternative Komplementkaskade, sowie die phagozytischen Zellen (polymorphkernige neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen) stehen als unspezifische Mechanismen zur schnellen Abwehr pathogener Keime bereit. Das Komplementsystem kann pathogene Mikroorganismen direkt inaktivieren und eine Entzündungsreaktion vermitteln, die phagozytischen Zellen können die Erreger mittels zytotoxischer Metabolite und antimikrobieller Proteine abtöten. Die spezifischen Abwehrmechanismen gehen von den Lymphozyten aus, die mittels Antikörperproduktion (B−Zellen) zur Komplementaktivierung bzw. Neutralisation und Opsonierung pathogener Keime beitragen, Sezernierung von Zytokinen (T−Helferzellen), welche die Immunreaktion koordinieren, oder als zytotoxische Killerzellen ($CD8^+$ T−Zellen) in virusinfizierten Zellen und Tumorzellen den programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen. All diese Mechanismen können im Zusammenspiel auf pathogene Erreger wirken.
In dieser Arbeit soll näher auf die Rolle der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) in der Infektabwehr und ihre Rolle bei Erkrankungen des Immunsystems eingegangen werden.

1.1 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)

Die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten machen etwa 50 − 70% der gesamten Leukozytenpopulation aus. 90% werden im Knochenmark als Reserve bereitgestellt, etwa 5% sind an den Gefäßwänden marginiert und weitere 5% zirkulieren im Blutstrom. Die PMN sind weitgehend ausdifferenzierte, nicht teilungsfähige Zellen mit einer Lebensdauer von 6 − 8 Stunden [Cline 1975]. Sie sind durch einen segmentierten Kern und intrazelluläre Granula [Malech 1987] gekennzeichnet. Man unterscheidet vier unterschiedliche Granula: die primären und sekundären Granula, die Gelatinasegranula, sowie die sekretorischen Vesikel. Die Granula der PMN enthalten verschiedene Protei−

ne, die für die unterschiedlichsten Aufgaben wie Adhäsion, Zellaktivierung oder das Abtöten von Keimen benötigt werden. Bei Bedarf werden durch Verschmelzung der Granula mit der Zellmembran die Inhalte der Granula an die Zelloberfläche gebracht oder in den extrazellulären Raum freigesetzt [Übersicht bei Borregaard 1993]. So sind in den primären Granula die Serinproteasen Elastase (HNE), Cathepsin G (CG) und Proteinase 3 (PR3), sowie das, die Perchloratproduktion katalysierende, Enzym Myeloperoxidase (MPO) aufbewahrt. In den sekundären Granula sind unter anderem das bakterizide eisenbindende Protein Lactoferrin, der Rezeptor für das Zytokin Tumornekrosefaktor−α (TNF−α) und der Elektronenüberträger Cytochrom−b_{558}, der in der Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite eine wichtige Rolle spielt, lokalisiert. In den Gelatinasegranula sind neben der Metalloprotease Gelatinase, dem Rezeptor für das N−formylierte Peptid fMLP aus gramnegativen Bakterien auch die Adhäsionsmoleküle CD11b[1] und CD18 zu finden. Die sekretorischen Vesikeln enthalten z. B. CD11b und CD18, alkalische Phosphatase und den fMLP−Rezeptor. *In vitro* und *in vivo* läßt sich nach Stimulation mit Zytokinen oder Chemokinen eine feste Reihenfolge der Verschmelzung der verschiedenen Granula mit der Zellmembran beobachten [Sengelov 1995]: sekretorische Vesikel > Gelatinasegranula >> sekundäre > primäre Granula.

Die PMN stellen neben dem Komplementsystem die erste Reihe bei der Abwehr von Bakterien dar. Durch ihre Fähigkeit zur gerichteten Wanderung (Chemotaxis) [Boyden 1962] und ihrer hohen Zahl im Blut sind sie schnell am Ort der Infektion und mit ihren amtimikrobiellen Proteinen, sowie der Fähigkeit zur Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten, in der Lage Bakterien abzutöten.

Die, bei einer Entzündung freigesetzten, Zytokine Granulozytenkolonien−stimulierender Faktor (G−CSF) und Granulozyten/Makrophagenkolonien−stimulierender Faktor (GM−CSF) bewirken eine erhöhte Freisetzung der zur Diapedese (Auswanderung in den extravaskulären Raum) verfügbaren PMN aus dem Knochenmark sowie eine verringerte PMN−Apoptose [Cox 1992, Aman 1996].

1 CD (*cluster of differentation)*: Nummerierung der Leukozytenoberflächenproteine

1.1.1 Die Adhäsionskaskade

Die Diapedese, die Auswanderung der PMN aus den Gefäßen in das Gewebe, erfolgt nach dem Kaskadenprinzip. Mehrere Schritte sind für eine erfolgreiche Auswanderung notwendig und jeder einzelne Schritt ist die Voraussetzung für den nächsten.

Tritt ein Erreger in das Gewebe ein, wird er von Gewebezellen (Gewebsmakrophagen, Fibroblasten, Langerhans–Zellen oder Keratinozyten) als fremd erkannt. Daraufhin sezernieren diese Zytokine (Interleukin–1ß (IL–1ß) und PAF (plättchenaktivierender Faktor)), Metabolite des Arachidonsäurestoffwechsels (z. B. Leukotrien B4 (LTB4)), oder Chemokine (*chemo*taktische Zyto*kine*; z. B. IL–8, MIP–1α und MIP–1ß (*macrophage inflammatory protein*)) [Bokoch 1995]. Diese Entzündungsmediatoren diffundieren in das umliegende Gewebe und aktivieren, unter anderem, die Endothelzellen der Blutgefäße. Es resultiert eine Expression von P– (CD62P) und E–Selektin (CD62E) (Plättchen– und Endothelselektin), sowie von interzellulärem Adhäsionsmolekül–1 (ICAM–1) [Menger 1996, Liu 1998] auf ihrer Oberfläche. Es kommt zum ersten Schritt der sogenannten Adhäsionskaskade. Lose Bindungen der PMN an das Endothel führen zum Rollen der Granulozyten entlang der Endothelwand. Dies geschieht über Wechselwirkungen der Selektine CD62P und CD62E mit sialylierten, bzw. fukosylierten Strukturen des P–Selektin–Glykoproteinliganden 1 (PSEGL–1) [Tiemeyer 1991, Berg 1992, Sako 1993] und L–Selektin (CD62L, Leukozyten–Selektin) auf den Leukozyten mit sialylierten, fukosylierten und sulfatisierten Strukturen auf CD34 der Endothelzellen [Baumheter 1993, Dowbenko 1993], bzw. durch Interaktion der P– und E–Selektine mit L–Selektin [Picker 1991]. Dabei verringert sich ihre Geschwindigkeit von etwa 4 mm/s auf ca. 40 µm/s. Die PMN kommen in die nötige räumliche Nähe zu den sezernierten Chemokinen, die über elektrostatische Wechselwirkungen an die Glykokalix der Endothelzellen gebunden sind. Die Chemokinrezeptoren auf den PMN sind G–Protein gekoppelte Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen [Bokoch 1995], welche das Signal sehr schnell in das Zellinnere weiterleiten. Dieses Signal löst eine Konformationsänderung und damit eine Veränderung des niedrig affinen in den hoch affinen Zustand des Integrins CD11b aus [Diamond 1993a, Oxvig 1999]. Die nun auftretende Wechselwirkung zwischen CD11b mit ICAM–1 des Endothels führt zum Stillstand der PMN. Die PMN flachen sich ab und wandern mittels homophiler PECAM–1–Wechselwirkungen (Plättchen–Endothelzell–Adhäsionsmolekül 1, CD31) zwischen Leukozyten und Endothelzellen [Wakelin 1996] zu den Kontaktstellen zweier Endothelzellen. Dort durchdringen die PMN die Endothelwand und migrieren in das darunter liegende Ge–

webe. Der Prozeß der Transmigration ist nicht vollständig aufgeklärt. Der Kontakt der benachbarten Endothelzellen wird durch die Familie der Cadherinproteine vermittelt, die einen reißverschlußartigen Gürtel bilden. Vermutlich löst die Leukozytenadhäsion in den Endothelzellen das Signal zu einer transienten Auflösung des Kontaktes zur Nachbarzelle aus. Die Granulozyten können nun die Endothelwand durchwandern. Adhärente PMN induzieren in Endothelzellen eine erhöhte cytosolische Ca^{2+}–Konzentration [Huang 1993]. Dies führt zur Phosphorylierung der leichten Myosinketten und einer damit verbundenen Änderung des Endothelzellzytoskeletts. Es ist nicht auszuschließen, daß lösliche Faktoren wie Histamin und Thrombin, welche im entzündeten Gewebe freigesetzt werden und das Zytoskelett der Endothelzellen beeinflussen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Diapedese spielen [Blum 1997]. Sind die PMN in das Gewebe eingedrungen, so werden sie durch das Konzentrationsgefälle an sezernierten Chemokinen und Zytokinen chemotaktisch zum Infektionsherd geleitet.

Das Prinzip der Adhäsionskaskade ist für alle Leukozyten gültig. Unterschiedliche, spezifische Kombinationen der Chemokine und Zytokine bzw. Adhäsionsmoleküle ermöglichen es die jeweils benötigten Leukozyten aus dem Blutstrom ins Gewebe zu leiten.

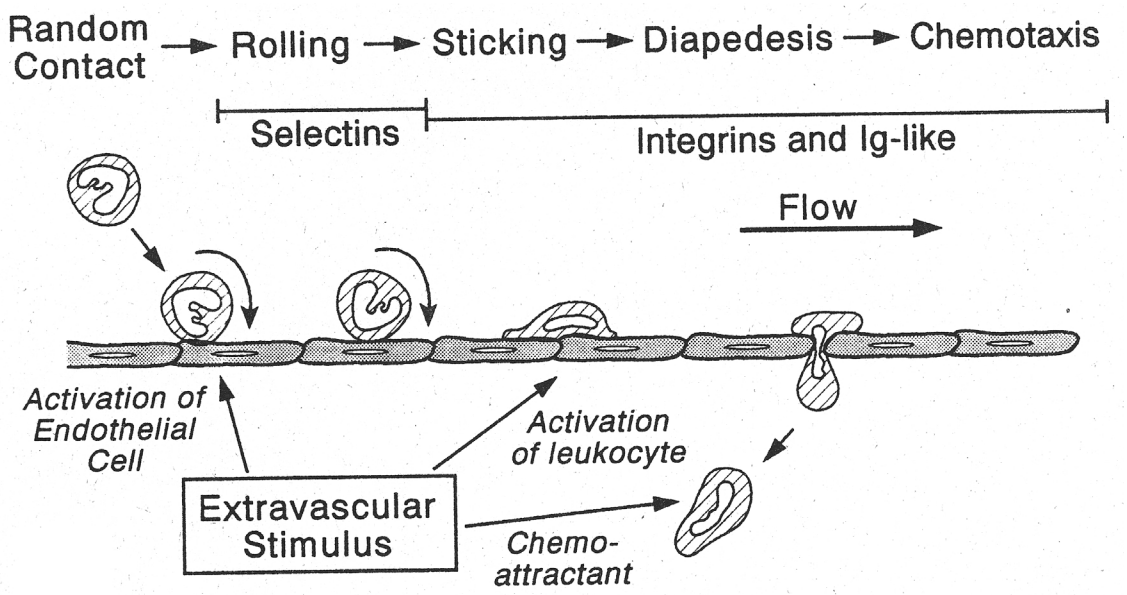


Abb. 1: Die Adhäsionskaskade [aus L. A. Lasky: "Selectins: Interpreters of cell–specific carbohydrate information during inflammation". Science 258, 1992, 964–969.]: Nach dem ersten Kontakt der Leukozyten mit dem Endothel kommt es zum Rollen entlang der Endothelwand. Chemokine und/oder Zytokine in der Glykokalix des Endothels aktivieren die Leukozyten, es kommt zur Adhäsion. Die Leukozyten flachen sich ab, wandern zu den Kontaktstellen der Endothelzellen und durchwandern die Endothelwand an diesen Stellen. Im Gewebe folgen die Leukozyten dem Konzentrationsgefälle an inflammatorischen Mediatoren zum Entzündungsherd.

1.1.2 Phagozytose und Abtötung pathogener Keime

Die Granulozyten besitzen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, welche der Erkennung von mit IgG (Fcγ–Rezeptoren) oder den Komplementfragmenten C3b und C3bi (Komplementrezeptor Typ 1 (CR1) und 3 (CR3)) beladenen Keimen dienen. PMN binden mit ihren Rezeptoren an die beladenen Keime und umschließen diese in das sogenannte Phagosom. Intrazelluläre Kompartimente verschmelzen mit dem Phagosom zum Phagolysosom. Dort werden reaktive Sauerstoffradikale und proteolytische Enzyme freigesetzt, welche die Keime abtöten [Thomas 1988]. Die Produktion von Sauerstoffradikalen (Abb. 2) wird durch die Aktivierung der NADPH–Oxidase eingeleitet, dabei wird Sauerstoff unter Oxidation von NADPH zum Superoxidanion ($\cdot O_2^-$) umgewandelt. Das Superoxidanion wird durch die Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reduziert [Weiss 1989]. H_2O_2 und $\cdot O_2^-$ können in Gegenwart von Eisenionen zum Hydroxylradikal ($\cdot OH$) umgesetzt werden (Haber–Weiss–Reaktion), diese Reaktion ist jedoch im Bezug auf die PMN umstritten. Ein weiterer zytotoxischer Mechanismus stellt die MPO–katalysierte Umwandlung von H_2O_2 zu Hypochlorid ($\cdot OCl^-$) dar.
Auch das freie Stickoxidradikal ($\cdot NO$) spielt durch eine Reihe physiologischer und pathophysiologischer Effekte eine wichtige Rolle in der Immunabwehr. PMN sind in der Lage über die Desaminierung von Arginin $\cdot NO$ zu produzieren, welches im Zusammenspiel mit den Sauerstoffradikalen die zytotoxischen Mechanismen der Zellen reguliert [Beckman 1990]. $\cdot NO$ induziert eine Relaxation der glatten Gefäßwandmuskulatur [Nussler 1993] wodurch sich der lokale Blutfluß erhöht und somit zu einem vermehrten Transport von PMN zum Entzündungsherd führt. Des weiteren induziert $\cdot NO$ eine vermehrte $ß_2$–Integrinexpression auf zirkulierenden PMN, und damit eine vermehrte PMN–Adhärenz auf dem Endothel [Kubes 1991].

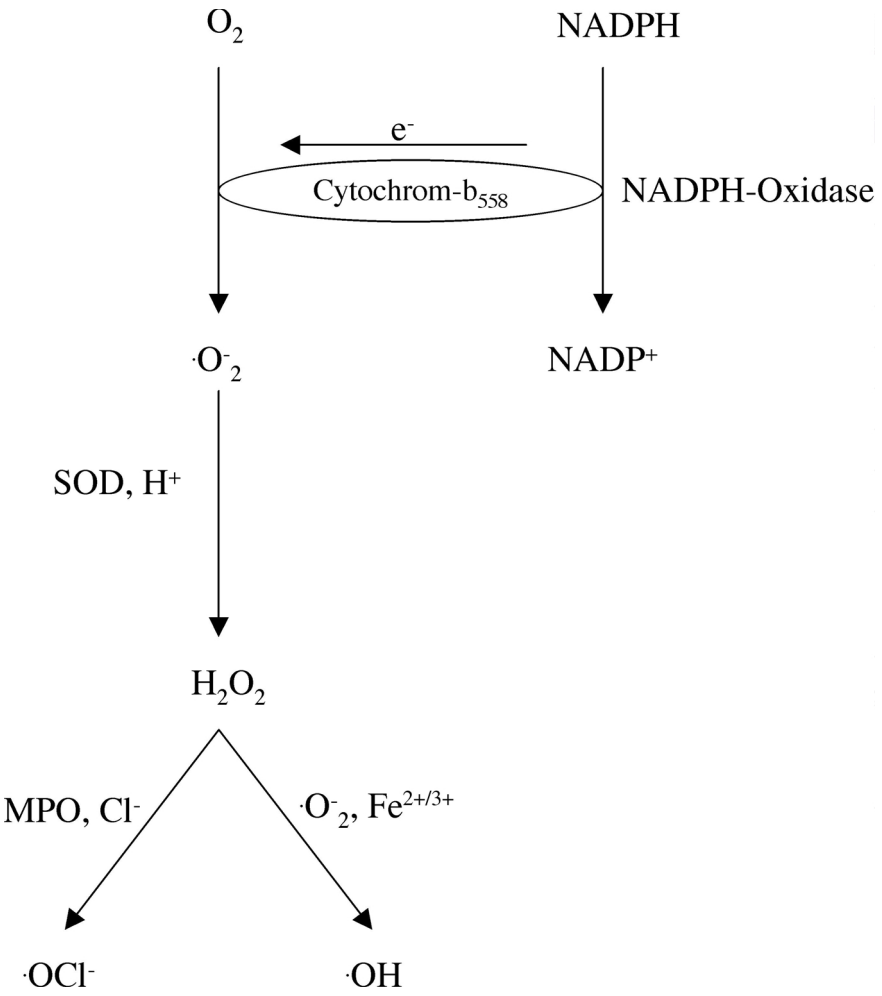


Abb. 2: Kaskade zur Bildung der reaktiven Sauerstoffmetabolite durch PMN

1.2 Die Serinproteasen

Proteasen werden aufgrund ihrer aktiven Gruppen der katalytischen Zentren in vier Hauptklassen unterteilt: Serinproteasen, Cysteinproteasen, Asparaginsäureproteasen und Metalloproteasen [Neurath 1984]. Die Serinproteasen gehören zu den großen Trypsin– und Substilisinfamilien, allerdings hat sich der Begriff Serinprotease für die Trypsinsu–perfamilie eingebürgert. Sie zeichnen sich durch die gleiche räumliche Anordnung der Aminosäuren Histidin, Asparaginsäure und Serin in den katalytischen Zentren aus.

Die drei wichtigen Aminosäuren des katalytischen Zentrums wurden in Chymotrypsin beschrieben, weshalb die Aminosäuren oftmals nach Chymotrypsin nummeriert werden [Blow 1976]. His^{57}, Asp^{102} und Ser^{195} kommen sich in der Tertiärstruktur bis auf Was–

serstoffbindungsabstände nahe und formen ein sogenanntes Ladungsaustauschsystem (*charge−relay−system*) [Neurath 1984]. Das Serin wird stark nukleophil, da His^{57} und Asp^{102} vorübergehend das Proton der Ser^{195} OH−Gruppe binden (Abb. 3). Es erfolgt der nukleophile Angriff am Carbonylatom des Substrates und eine Protonenübertragung auf das N−Atom der Peptidbindung [Bieth 1986; Bode 1986; Sinha 1987] führt schließlich zur Spaltung der Peptidbindung.

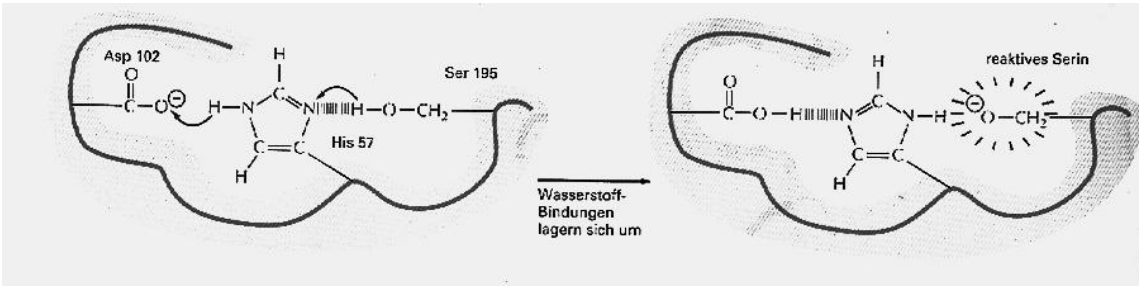


Abb. 3: Charge−relay−system der Serinproteasen am Beispiel des Chymotrypsins (aus B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und J. D. Watson: „Molekularbiologie der Zelle“ VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1995)

1.2.1 Die Serinproteasen des zellulären Immunsystems

Die Klasse 6 der Trypsinsuperfamilie besteht aus einer Reihe von Serinproteasen, die ein charakteristisches Expressionsmuster in Effektorzellen des Immunsystems zeigen: Mastzellen (Chymase 1, Cathepsin G) [Caughey 1993], neutrophile Granulozyten und Monozyten (Cathepsin G, Elastase, Proteinase 3, Azurozidin) [Caughey 1993, Heusel 1991, Zimmer 1992], aktivierte Lymphozyten und natürliche Killer (NK)−Zellen (Granzym A, B und H, Metase−1) [Fink 1993, Smyth 1993].

Humane neutrophile Elastase ist ein kationisches Glykoprotein von etwa 29,5 kD. Das Polypeptidgrundgerüst besteht aus 218 Aminosäuren mit 2 Asn−gebundenen Kohlenhydratseitenketten (Asn^{95} und Asn^{144}) [Bode 1986, Sinha 1987], welche etwa 25% der Masse des Proteins ausmachen. Es existieren 3 in den Seitenketten variierende Isoenzymformen, die sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte unterscheiden lassen. Elastase kommt neben den homologen Enzymen Proteinase 3 (54%) und Cathepsin G (37%) in großen Mengen (0,5 −3 pg/Zelle) in den primären Granula der PMN vor [Dewald 1975]. Elastase wird in den myelotischen Vorläuferzellen im Knochen−

mark gebildet [Takahashi 1988], in reifen PMN finden sich keine Hinweise zur Neusynthese der Serinproteasen. Elastase spaltet eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine, so z. B. die Komponenten des Bindegewebes Elastin, Kollagen und Proteoglykane, sowie die Plasmaproteine IgG, C3 und C5 [Starkey 1976a, Solomon 1978, Jochum 1984]. Elastase spaltet an kleinen, hydrophoben Aminosäuren in der P1−Position[2] des Substrats, bevorzugt Valin [Blow 1977a, Powers 1986]. Die katalytische Triade bilden die Aminosäuren Ser^{173}, His^{41} und Asp^{88}.

Cathepsin G (CG) ist ein Glykoprotein mit stärker ionischem Charakter als HNE, mit einer Asparagin gebundenen Seitenkette (Asn^{64}). CG spaltet vornehmlich sperrige, aliphatische oder aromatische Reste (z. B. Phenylalanin) in der P1−Position [Blow 1977b]. Die natürlichen Substrate des CG sind weniger gut beschrieben, es ist jedoch bekannt daß CG eine Reihe von Matrixmolekülen (Laminin, Fibronektin, Elastin) [Starkey 1976b] oder Plasmakomponenten (Komplementproteine und Immunglobuline) [Starkey 1976b, Solomon 1978] spaltet. Eine wichtige bekannte Eigenschaft des CG ist die Hydrolyse des inaktiven Angiotensin I in aktives Angiotensin II, einem Hormon, das die Kontraktion glatter Muskelzellen stimuliert und die vaskuläre Permeabilität erhöht [Reilly 1982].

Proteinase 3 (PR3) ist ein kationisches Protein mit zwei potentiellen Asn−Glykosilierungsstellen. PR3 spaltet bevorzugt kleine aliphatische Aminosäuren (Alanin, Serin, Valin) an der P1−Position [Rao 1991]. Wie Elastase und Cathepsin G ist auch PR3 dazu in der Lage eine Reihe extrazellulärer Matrixproteine zu spalten (Elastin, Fibronektin, Laminin und Vitronektin) [Rao 1991]. Bei der Wegener'schen Granulomatose, einer neutrophilen Vaskulitiserkrankung ist PR3 das Hauptantigen der anti−zytoplasmatischen Autoantikörper (ANCA), welche dieses Krankheitsbild charakterisieren.

Die Serpine (Serinproteaseinhibitoren) machen etwa 10% der Plasmaproteine aus, d. h. bei einer Freisetzung der Serinproteasen kommt es zu einer raschen Inaktivierung der Enzyme. Die Serpine wirken als sogenannte „Selbstmordsubstrate", das heißt sie werden bei der Inhibition selbst inaktiviert [Rubin 1990]. Der Mechanismus der Inhibition ist nicht vollständig aufgeklärt, es gilt jedoch als sicher, daß ein mehrstufiger Prozeß zugrunde liegt (Abb. 4).

2 Proteasen spalten ihre Substrate an der P1−P1´−Bindung. Die Bezeichnung der Aminosäuren ist P3−P2−P1−P1´−P2´−P3´. Die Bindungsstellen auf dem Enzym werden mit S3−S2−S1−S1´−S2´−S3´ bezeichnet.

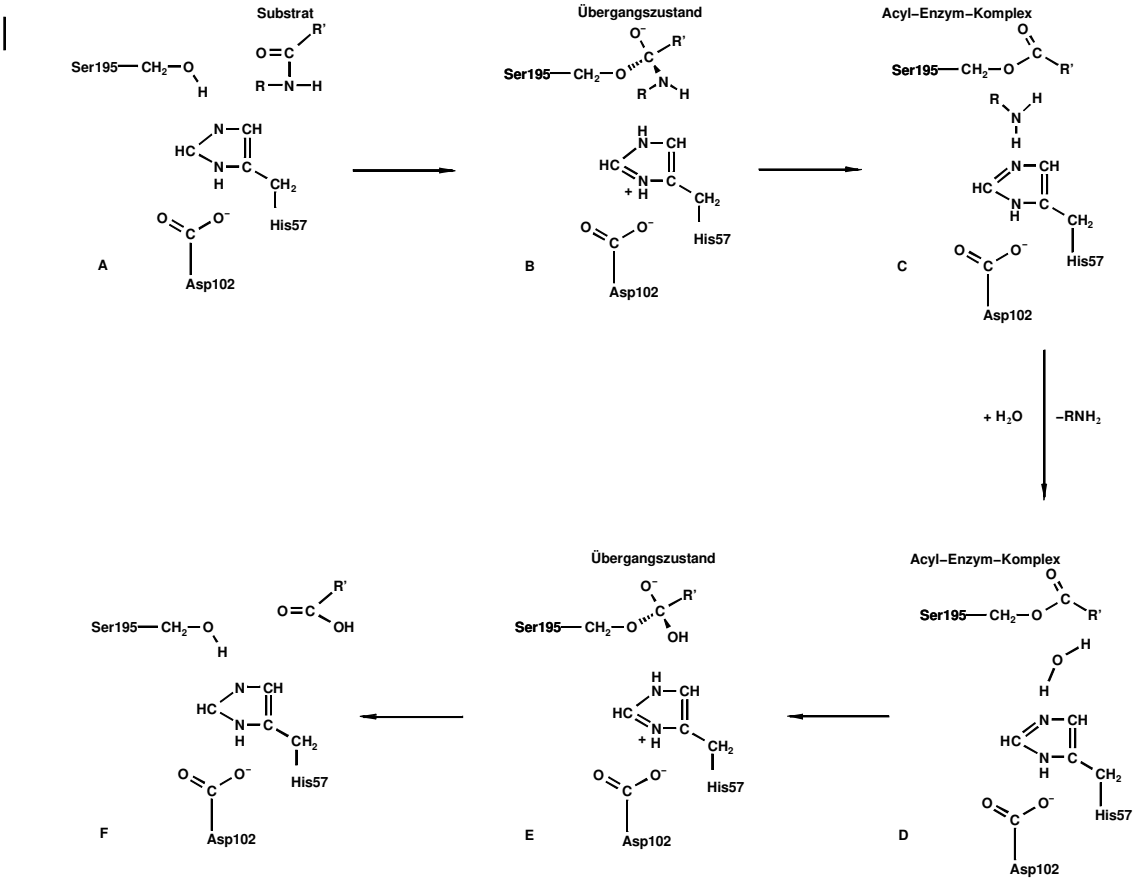
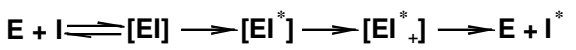


Abb. 4: Hydrolyse einer Peptidbindung durch Chymotrypsin. Im ersten Schritt greift das Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe des Ser^{195} nukleophil am Carbonyl–C–Atom der Peptidbindung an (A). Die Kohlenstoff–Sauerstoffbindung der Carbonylgruppe wird eine Einfachbindung und das Sauerstoffatom erhält eine negative Ladung (B). Diese wird von 2 NH–Gruppen des Histidingrundgerüsts stabilisiert. Die vier Atome am C–Atom der Carbonylgruppe sind tetraedrisch angeordnet. Ein wichtiger Schritt dabei ist die Übertragung eines Protons der OH–Gruppe von Ser^{195} auf His^{57}, die positive Ladung des Imidazolrings wird von der COO^-–Gruppe von Asp^{102} teilweise neutralisiert. Das protonierte His^{57} überträgt das Proton auf das Stickstoffatom der Peptidbindung, die dabei gespalten wird (C). Die Säurekomponente der Peptidbindung ist mit Ser^{195} verestert. Dieser Acyl–Enzymkomplex ist sehr stabil (C, D). Die Hydrolyse ist der limitierende Schritt dieser Reaktion. Wasser überträgt ein Proton auf His^{57} und das resultierende OH^-–Ion greift am Kohlenstoff der Carbonylgruppe des Substrats an (E). Es entsteht wie bei der Acylierungsreaktion ein tetraedrischer Übergangszustand. Durch Protonenübertragung vom Histidin auf Serin wird das Enzym wieder hergestellt und die Säuregruppe des Substrats wird freigesetzt (F).

In einer schnellen Reaktion zweiter Ordnung kommt es zur Bildung eines Michaelis–Menten–Komplexes (EI), der irreversibel über eine kurzlebige tetraedrische Zwischenstufe (EI^*) [Matheson 1991] zum Acyl–Enzymkomplex (EI^*_+) zerfällt [Lawrence 1995, Plotnik 1996], in dem die P1–P1'–Bindung des Serpins gespalten ist. Dieser Komplex ist mehrere Tage stabil und kann in aktives Enzym (E) und inaktives Serpin (I^*) zerfallen [Mellet 1998, Hopkins 1997]:



In vivo ist jedoch die Aufnahme und der Abbau des langlebigen Serpin–Enzym–Komplexes (SEC) über einen spezifischen Rezeptor auf Monozyten und Makrophagen wahrscheinlicher [Perlmutter 1990].
Die Serpine wirken als Pseudosubstrate, d. h. sie werden wie die Peptidbindungen der Substrate gespalten. Wichtige Hinweise zum Substratumsatz der Serine konnten aus der Eigenschaft zur analogen Spaltung von Esterbindungen gewonnen werden. Auch die Esterspaltung verläuft über eine tetraedrische Zwischenstufe zum Acyl–Enzymkomplex. Die Hydrolyse dieses Komplexes zur Regeneration des freien Enzyms ist der zeitlimitierende Schritt der Reaktion.

1.3 ß$_2$–Integrine

Integrine sind heterodimere, transmembrane Glykoproteine, bestehend aus einer α– und einer ß–Kette. Bisher kennt man 8 verschiedene ß– und 16 verschiedene α–Ketten, die zu 22 unterschiedlichen Integrinheterodimeren assoziieren (Abb. 5). Dabei können manche ß–Ketten mit mehreren α–Ketten assoziieren und umgekehrt. Die Integrine sind wichtige Bestandteile der homotypischen und heterotypischen Zell–Zell–Adhäsion, sowie der Bindung an Matrixproteine. Sie binden an eine Vielzahl zellulärer und extrazellulärer Liganden. Die Integrine werden, den ß–Ketten entsprechend, in 8 Gruppen zusammengefaßt.

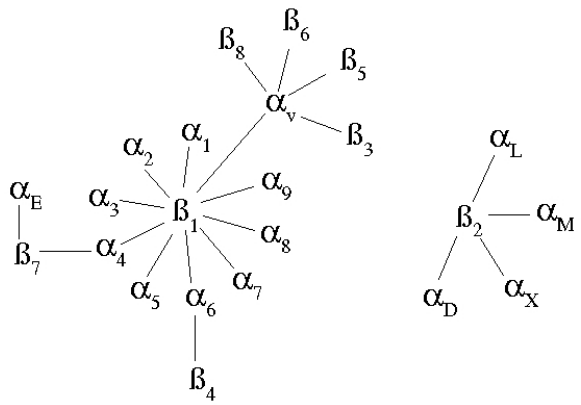


Abb. 5: Kombinationen der Integrinketten zu heterodimeren Strukturen

Humane PMN exprimieren $ß_1$, $ß_2$ und $ß_3$–Integrine, wobei die $ß_1$ und $ß_3$–Moleküle nur in geringen Mengen vorkommen.

$ß_2$–Integrine setzen sich aus der ß–Kette CD18 und den zueinander homologen (ca. 36 – 63%) α–Ketten CD11a (α_L), CD11b (α_M), CD11c (α_X) und CD11d (α_D) zusammen. CD11d/CD18 konnte bisher nur auf einer Subpopulation von Makrophagen gefunden werden [Sanchez–Madrid 1983, Danilenko 1995, Wong 1996], über seine Funktion ist noch nichts bekannt.

Die polymorphkernigen Neutrophilen exprimieren die $ß_2$–Integrine LFA–1 (CD11a/CD18), Mac–1 (CR3, CD11b/CD18) und p150/95 (CR4, CD11c/CD18). Sie besitzen eine lange extrazelluläre Domäne (1063 – 1091 Aminosäuren), eine kurze Transmembranregion (26 – 29 Aminosäuren) und eine kurze zytoplasmatische Region (19 – 53 Aminosäuren). Ihr wichtigstes Merkmal ist die sogenannte I–Domäne, ein etwa 200 Aminosäure langes Epitop, das fast alle Liganden der CD11–Proteine bindet. Die I–Domäne enthält eine, die Molekülfunktionen regulierende, Bindungsstelle für zweiwertige Kationen [Dransfield 1992a, Michishita 1993]. Die Bindung eines Metallions wie Ca^{2+}, Mg^{2+} oder Mn^{2+} beeinflußt die Affinität der I–Domäne für unterschiedliche Liganden wie z. B. ICAM–1 oder Fibrinogen. Des weiteren besitzen die CD11–Proteine 7 Tandemrepeats. Drei dieser Tandemrepeats besitzen eine hohe Homologie zu den Helix–Schleife–Helix–Strukturen (EF–Hände) der Ca^{2+}–bindenden Proteine Calmodulin, Parvalbumin und Troponin [Szebeny 1981] mit dem metallbindenden Nanopeptid DXXDXGXXD (D = Asparaginsäure, G = Glycin, X = beliebige Aminosäure).

Die biologische Funktion der $ß_2$–Integrine wurde in Patienten mit Punktmutationen im CD18–Gen entdeckt [Dana 1984]. Eine solche Mutation in einer, etwa 100 Aminosäuren vom N–Terminus entfernten, konservierten Region verhindert die Assoziation von

CD18 mit der α−Kette [Arnaout 1990a]. Leukozyten der Patienten mit diesem sogenannten LAD−Syndrom (Leukozytenadhäsionsdefizienz) zeigen keine oder nur geringe Expression der ß$_2$−Integrine, was sich in schwerwiegenden persistierenden Infekten manifestiert. Leukozyten können nicht mehr am Endothel anhaften [Arnaout 1990a] und gelangen somit nicht mehr zum Infektionsherd.

Integrine können sowohl Signale aus der Zelle nach außen vermitteln (inside−out signaling), als auch Signale von außen in die Zelle leiten (outside−in signaling). Inflammatorische Mediatoren bewirken bei PMN eine erhöhte ß$_2$−Integrinbindung an z. B. C3bi, Fibrinogen und Faktor X, ICAM−1 und ICAM−2. Bei der Zellstimulation werden neben klassischen Signaltransduktionswegen, wie z. B. die Proteinkinase C (PKC) auch bisher nicht genauer spezifizierte Tyrosinkinasen aktiviert, die die zytoplasmatische Region von CD18 phosphorylieren [Chatila 1989, Naccache 1994]. CD18 kann dieses positive Signal auf CD11 übertragen [Chatila 1989]. Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung eines Liganden oder Antikörpers [Monboisse 1991, Walzog 1994] an ein Integrin Zelldifferenzierung, −proliferation und −aktivierung, sowie Genexpression auslösen kann (outside−in signaling). Die Signaltransduktion erfolgt über Änderungen des intrazellulären pH−Wertes und der Ca^{2+}−Konzentration, Tyrosinphosphorylierung sowie Inositollipidumsatz [Ng−Sikorsky 1991, Altieri 1992]. Unterschiedliche outside−in Signale können über die kurze zytoplasmatische Region wie auch direkt über die hoch konservierte Transmembranregion ins Zellinnere geleitet werden [Ingalls 1997].

CD11a wird von allen Leukozyten exprimiert. Es zeigt eine Homologie von 36% zu CD11b und 37% zu CD11c [Larson 1989]. CD11a stellt das Pendant zu CD11b bei der Adhäsionskaskade der T−Zell−Rezirkulation aus den hochendothelialen Venolen (HEV) in die Lymphgefäße dar. Der Ligand auf den HEV ist das konstitutiv exprimierte ICAM−2 (CD102) [Staunton 1989]. Des weiteren bindet CD11a an die erste Ig−Domäne von ICAM−1 (CD54) [Rothlein 1986, marlin 1987, de Fougerolles 1991] und an ICAM−3 [de Fougerolles 1992] auf Endothelzellen, an ICAM−4 (Landsteiner−Wiener (LW) Blutgruppenantigen) auf roten Blutkörperchen [Baily 1994] und an ICAM−5 (Telencephalin, ein neuronales Glykoprotein) auf neuronalen Dendriten der cerebralen Cortex und der basalen Ganglia [Tian 1997, Arii 1999]. CD11a stellt einen wichtigen Faktor bei Zell−Zell−Interaktionen von T−Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen oder der Bindung von NK−Zellen an ihre Zielzellen dar [Colombati 1991]. Leukozyten können auch über CD11a mit Matrixproteinen wie Fibrinogen [Altieri 1988a] oder Faktor X [Altieri 1988b] interagieren.

Die Expression von CD11b ist auf die myeloiden Zellen (Granulozyten, Monozyten und Makrophagen) und auf NK−Zellen beschränkt. Auf den phagozytischen Zellen wird es konstitutiv exprimiert [Springer 1990] und präformiert in intrazellulären Granula aufbewahrt [Sengelov 1993]. Stimulation der Zellen reguliert CD11b aus den intrazellulären Kompartimenten auf die Zelloberfläche. Eine Vielzahl zellulärer und extrazellulärer Liganden, von denen die meisten an die I−Domäne binden, sind bereits beschrieben. Die Bindungsstellen der unterschiedlichen Liganden in dieser Region können überlappen [Zhang 1996]. Als Liganden der I−Domäne sind zu nennen ICAM−1 [Diamond 1990, Diamond 1991], ICAM−2 [Xie 1995] ICAM−4 [Baily 1995], C3bi [Ueda 1994, Zhang 1999], Fibrinogen [Wright 1988, Diamond 1993b, van Strijp 1993], der Neutrophilen inhibierende Faktor (NIF) aus dem Hakenwurm *Ancylostoma caninum* [Muchowski 1994, Zhang 1997], Faktor X [Altieri 1988b] und Kollagen [Walzog 1995]. Stimulation der PMN induziert eine Konformationsänderung in der I−Domäne [Oxvig 1999] vom niedrig affinen in einen hoch affinen Zustand. Mit einem Antikörper gegen dieses aktivierungsabhängige Epitop konnte gezeigt werden, daß etwa 10% der CD11b−Moleküle auf PMN dieses Epitop exprimieren und daß diese etwa 80% der PMN−Adhäsion an ICAM−1 oder Fibrinogen vermitteln [Diamond 1993a]. Die Aktivierung kann über zwei unterschiedliche Mechanismen erfolgen (inside−out signaling). Die chemotaktischen Peptide C5a oder fMLP binden an Rezeptoren, welche das Signal über G−Proteine ins Zellinnere weiterleiten. Die Integrinaktivierung durch Immunkomplexe über die Fcγ−Rezeptoren erfolgt über eine Tyrosinkinasekaskade, die durch die Phosphatidylinositol (PI) 3−Kinase aktiviert wird [Jones 1998].

CD11c, der Marker der Haarzelleukämie [Kishimoto 1989], wird ausschließlich auf myeloiden Zellen exprimiert, mit einer hohen Dichte auf Makrophagen. CD11c zeigt eine Homologie von 63% zu CD11b und kommt ebenso wie CD11b konstitutiv auf der Zelloberfläche und in sekretorischen Vesikeln vor. CD11c bindet an ähnliche Liganden wie CD11b, obgleich die CD11c−Liganden weniger gut charakterisiert sind. Zu nennen sind C3bi [Myones 1988], Fibrinogen [Loike 1991], ICAM−1 (bisher nur im Kaninchen gezeigt) [Blackford 1996], CD23 [Lecoanet−Henchoz 1995] und LPS [Ingalls 1995].

CD18 besitzt eine kurze zytoplasmatische Region mit mehreren potentiellen Phosphorylierungsstellen [Chatila 1989]. Ein Charakteristika der extrazellulären Region ist eine konservierte cysteinreiche Region (CRR) aus 4 Tandemrepeats eines 8−Cysteinmotifs. N−terminal zu CRR findet sich eine in den ß−Ketten hoch konservierte Region (60 −

89% Homologie). Diese Region ist essentiell zur Bildung des heterodimeren Komplexes mit CD11 [Arnaout 1990b + c].
Die Liganden der α−Ketten binden oftmals auch an CD18. Dies führt vermutlich zu einer erhöhten Stabilität/Affinität der Integrinbindung.

1.4 Fehlgeleitete Entzündungen

Entzündungen sind gezielte Reaktionen des Körpers auf das Eindringen von pathogenen Erregern. Die komplexen Vorgänge, die zu einer Entzündungsreaktion führen, bieten viele Möglichkeiten einer Fehlreaktion. So können Krankheiten z. B. auf Defekte innerhalb der Adhäsionskaksade, wie das bereits erwähnte LAD−Syndrom, zurückgeführt werden. Andere Krankheitsbilder, wie die chronische Granulomatose lassen sich auf Defekte in der Kaskade, die zur Bildung der O_2−Radikale führt, zurückführen.
In manchen Fällen kommt es jedoch zu einer Abwehrreaktion auf körpereigene Zellen oder Strukturen (Autoimmunerkrankung) oder zu einer Überreaktion gegen „harmlose" Substanzen (Allergie). In diesen Fällen führt die Entzündungsreaktion zu Schäden des Organismus. So kommt es z. B. bei der rheumathoiden Arthritis zu einer Infiltration des Gelenkknorpels durch T−Helferzellen (T_H−Zellen), die ein mit dem Gelenk assoziiertes Protein als fremd erkennen. Die T_H−Zellen sezernieren Zytokine, wodurch PMN und Monozyten angelockt und aktiviert werden. Diese können den Gelenkknorpel vollständig zerstören.
Autoimmunerkankungen, die stark mit einer Überreaktion der PMN assoziiert sind, sind z. B. die nekrotisierenden systemischen Vaskulitiden, wie die Wegener'sche Granulomatose oder die mikroskopische Polyangiitis. Bei diesen Erkrankungen finden sich Granulome im Gewebe, die hauptsächlich aus eingewanderten Granulozyten bestehen. Im Serum der Patienten finden sich Autoantikörper (ANCA, anti−neutrophile zytoplasmatische Autoantikörper) gegen Bestandteile der primären und sekundären Granula der PMN. Die ANCA−Titer sind mit dem Verlauf der Krankheit assoziiert und dienen somit als klinische Marker [Csernok 1995]. MPO−ANCA finden sich hauptsächlich in der mikroskopischen Angiitis. PR3−ANCA treten hauptsächlich bei der Wegener'schen

Granulomatose auf [Gross 1995, Kallenberg 1995]. Bei einem Krankheitsverlauf mit einer schweren Nierenbeteiligung können auch in geringem Masse Antikörper gegen Elastase gefunden werden [Apenberg 1996]. Sowohl die Entstehung, wie auch die Rolle der Autoantikörper bei der Pathogenese ist noch ungeklärt.

Im entzündeten Gewebe [Mrowka 1995] und auf den PMN der Patienten [Csernok 1994, Apenberg 1996] lassen sich Serinproteasen nachweisen. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, daß Zytokine wie TNF−α die Serinproteasen und MPO auf die Zelloberfläche der PMN regulieren [Falk1990, Csernok 1994, Owen 1995a, Owen 1997]. *In vivo* könnten die PMN durch die hohen Zytokinspiegel im Patientenserum zur Oberflächenexpression der Serinproteasen stimuliert werden [Noronha 1993]. Die oberflächengebundenen Proteasen sind katalytisch aktiv und inert gegen physiologische Inhibitoren, wie z. B. α_1−Proteineinhibitor (α_1−PI) [Owen 1995a + b, Morcos 1998, Owen 1998]. *In vitro* können ANCA PMN zur Produktion von Sauerstoffradikalen und zur Freisetzung granulärer Proteine aktivieren [Falk 1990], eine Beteiligung der Fcγ−Rezeptoren und/oder der $ß_2$−Integrine wird diskutiert [Porges 1994, Reumaux 1995]. Auch eine durch ANCA induzierte vermehrte Expression von CD11b/CD18 konnte nachgewiesen werden [Johnson 1997]. *In vitro* können HNE−ANCA die Aktivität des oberflächengebundenen Enzyms erhöhen [Morcos 1998].

Die Ätiologie der meisten Autoimmunerkrankungen ist unbekannt. Die Mehrzahl der ANCA−Antigene sind antimikrobielle Proteine der PMN (Defensin, PR3, HNE, CG, BPI (bakterizides/Permeabilität−erhöhendes Protein), Azurozidin, Lysozym oder Lactoferrin). Dies läßt bei der Bildung der ANCA einen Zusammenhang mit bakteriellen Infekten vermuten. Ein weiterer Hinweis dieser These läßt sich mit dem Verlauf der chronischen hyperreaktiven Onchoceriase, einer tropischen, parasitären Erkrankung postulieren. Die Onchoceriase zeigt in ihrem Verlauf Parallelen zur Wegener'schen Granulomatose auf. Es zeigen sich Granulome in der Haut und im Plasma lassen sich ANCA gegen Defesnin nachweisen. Die Autoimmunantwort ändert sich durch antiparasitäre Behandlung in einen teilweise bzw. vollständigen Rückgang der Autoantikörper. Diese Befunde lassen bei den Vaskulitiden ebenfalls einen Zusammenhang mit einem infektiösen Agens vermuten [Gallin 1995]. Einen weiteren Hinweis liefert der Zusammenhang von chronischen, nasalen *Staphylococchus aureus*−Infekten mit den Infektionsschüben bei WG−Patienten [Stegeman 1994].

1.5 Immunmodulatorische Funktionen der PMN und der Serinproteasen

In Granulomen von Vaskulitispatienten finden sich vermehrt neutrophile Granulozyten. Die unkontrollierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale stellt einen wichtigen Faktor der Gewebeschädigungen durch PMN dar.

Über die Rolle der Serinproteasen bei den Gewebeschädigungen ist bisher wenig bekannt. Im Plasma finden sich Proteaseinhibitoren in hohen Konzentrationen, welche freigesetzte Serinproteasen sofort unschädlich machen. Oberflächengebundene Serinproteasen finden sich jedoch auf PMN von Patienten mit ANCA−assoziierten Vaskulitiden. PMN gesunder Spender weisen Serinproteasen nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen (TNF−α, PAF) und chemotaktischen Peptiden (fMLP, IL−8, C5a) in katalytisch aktiver Form auf der Zelloberfläche auf [Csernok 1994, Owen 1995a und 1995b, Morcos 1998]. Durch die Bindung der Proteasen an die Zelloberfläche bleibt die katalytische Aktivität auch in Gegenwart der Proteaseinhibitoren erhalten. Dies läßt auf eine Beteiligung der oberflächengebundenen Serinproteasen bei der Pathogenese schließen.

Die oberflächengebundenen Proteasen können in vitro eine Reihe immunmodulatorischer Funktionen beeinflussen. So können oberflächengebundene Elastase und Cathepsin G C3 in C3a− und C3b−ähnliche Fragmente und weiter in C3c− und C3dg−ähnliche Fragmente, wichtige Komponenten der alternativen Komplementkaskade, spalten [Maison 1991]. Die C3b−Fragmente können komplexiert mit Immunkomplexen die B−Zellteilung und −differenzierung zu Antikörper−produzierenden Zellen stimulieren [Erdei 1985, Melchers 1985]. Cathepsin G auf der Zelloberfläche ist in der Lage das Zytokin IL−6 durch Spaltung zu inaktivieren [Laouar 1993] und somit auf die Entzündungsreaktion und Immunmodulation einzuwirken. IL−6 induziert u. a. die Zelldifferentation, inhibiert das Zellwachstum und die Genaktivierung [Übersicht bei van Snick 1990].

Durch die Spaltung von Angiotensinogen und Angiotensin I zu Angiotensin II mittels Cathepsin G auf der Zelloberfläche sind PMN dazu in der Lage eine Reihe immunmodulatorischer Funktionen zu beeinflussen [Owen 1998]. Die wichtigste Rolle des Angiotensin II ist die Regulation des Blutdrucks und des homeostatischen Flusses. Zusätzlich kann Angiotensin II durch die Stimulation der glatten Muskelzellkontraktion [Gimborne 1975], durch Erhöhung der vaskulären Permeabilität [Robertson 1974],

durch Induktion der Prostaglandinsynthese endothelialer Zellen [Gimborne 1975], durch Suppression der Lymphozytenproliferation und – differenzierung [Simon 1985], sowie durch verstärkte Akkumulation von PMN und Monozyten im Entzündungsbereich [Goetzl 1980, Farber 1990] auch immunmodulatorisch wirken.

2 Problemstellung

PMN sind in der Lage die Serinproteasen PR3, Elastase und Cathepsin G in katalytisch aktiver Form auf der Zelloberfläche zu exprimieren. Die oberflächengebundenen Proteasen können auch in der Gegenwart von Plasmaproteaseinhibitoren Proteine der Bindegewebsmatrix spalten. Auch bei immunmodulatorischen Funktionen wie die ANCA-vermittelte Stimulation von Granulozyten oder der Aktivierung/Inaktivierung immunmodulatorischer Komponenten wie Angiotnesin II oder IL-6 spielen die oberflächengebundenen Proteasen eine wichtige Rolle.

Es stellt sich nun die Frage nach der Bindung der Proteasen, hier im Speziellen der Elastase, an die Zelloberfläche. Aufgrund der starken positiven Oberflächenladung können die Serinproteasen unspezifisch an die Zelloberfläche binden. Die Tatsache, daß die Proteasen Signale in die Zelle weiterleiten können deutet jedoch auf einen spezifischen Rezeptor hin.

In dieser Arbeit wurde die Bindungsstelle für Elastase auf PMN, sowie der Einfluß der oberflächengebundenen Elastase auf unterschiedliche Funktionen der Granulozyten charakterisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Bindungsstudien mit exogener Elastase

Elastase wurde von der Firma Immundiagnostik, Bensheim mit ^{125}I markiert. Aus technischen Gründen war es nicht möglich die Konzentration markierter HNE zu bestimmen. Deshalb wurde die Menge an HNE, welche zur Markierung versandt wurde, als Ausgangskonzentration der Stammlösung angenommen. Differenzen in den Meßergebnissen verschiedener Versuchsreihen können durch unterschiedliche Ausgangskonzentrationen der eingesetzten Chargen markierter Elastase bergündet liegen. Die Inhibitionsversuche wurden alle in der Sättigung der Oberflächenbindung durchgeführt. Aus diesem Grund haben Konzentrationsschwankungen einen vernachläßigbaren Einfluß auf das Ergebnis. Ein Vergleich der Absolutwerte der Zerfallsraten auf der Zelloberfläche ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen Markierungen der einzelnen Chargen nicht möglich.

3.1.1 Exogene Elastase bindet an die Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten und promyeloblastischer Zellinien

Zunächst stellt sich die Frage, ob Elastase über einen spezifischen Rezeptor an die Zellen bindet oder ob das stark positiv geladene Molekül aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen an der Zelloberfläche anhaftet. Dieser Frage wurde in Bindungsstudien mit radioaktiv markierter HNE nachgegangen.

Zur Bestimmung der Bindungsstellen auf der Zelloberfläche wurden die promyeloblastischen Zellinien HL60 und U937 und frisch isolierte polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) verwendet. Jeweils 10^6 Zellen wurden mit radioaktiv markierter Elastase in Konzentrationen zwischen 1 nM und 6 nM 30 min ohne bzw. mit einem Überschuß (100 nM) nicht markierter HNE auf Eis inkubiert. Die Tabellen 1 und 2 zeigen die Mittelwerte aus 5 bzw. 6 Meßreihen. Die Differenz der Mittelwerte ergibt die spezifisch gebundene ^{125}I–HNE, der Standardfehler der spezifischen Bindung wurde aus der Varianz ermittelt. Mit Hilfe einer Eichkurve konnte die spezifisch gebundene

Molarität der Elastase ermittelt werden (Tabelle 1 und 2).

Aus Abb. 6 ist ersichtlich, daß die Bindung an die Zelloberfläche spezifisch und sättigbar ist. Die Zahl der Bindungsstellen wurde mittels Scatchard plot–Analyse bestimmt (Tabelle 3).

Tabelle 1: Die aus jeweils 6 Meßwerten ermittelte spezifisch gebundene ^{125}I–HNE und der Standardfehler (S_E) an HL60– und U937–Zellen in pmol.

einges. ^{125}I–HNE [pmol]	**HL60**		**U937**	
	geb. ^{125}I–HNE	S_E	geb. ^{125}I–HNE	S_E
1	0,0514	0,0011	0,0596	0,0014
2	0,2147	0,0011	0,0867	0,0016
3	0,2168	0,0007	0,1078	0,0036
4	0,2195	0,0033	0,1398	0,0062
5	0,0753	0,0008	0,1467	0,0004

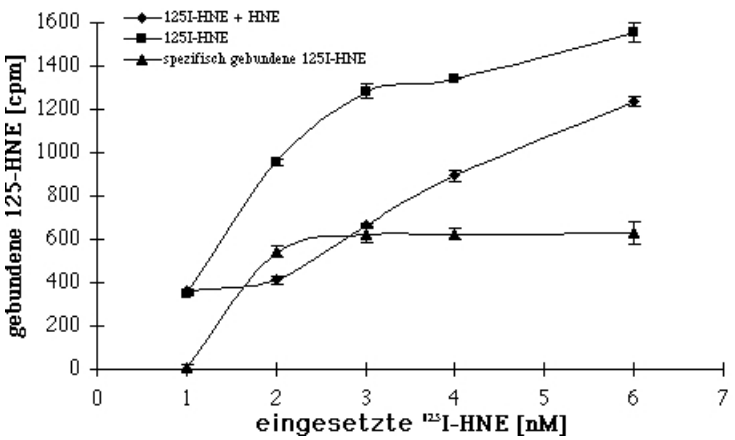


Abb. 6: Bindung von ^{125}I–HNE an U937. Je 10^6 U937 wurden mit ^{125}I–HNE in Konzentrationen zwischen 1 und 6 nM 30 min auf Eis inkubiert (‰). Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Zugabe von 100 nM unmarkierter HNE abgesättigt(◆) und die spezifisch gebundene ^{125}I–HNE aus der Differnz der Mittelwerte (n = 6) ermittelt (▲).

Tabelle 2: Die aus jeweils 5 Meßwerten ermittelte spezifisch gebundene ^{125}I–HNE und der Standardfehler (S_E) an PMN verschiedener Spender in pmol.

einges. ^{125}I–HNE [pmol]	**PMN Spender 1**		**PMN Spender 2**		**PMN Spender 3**	
	geb. ^{125}I–HNE	S_E	geb. ^{125}I–HNE	S_E	geb. ^{125}I–HNE	S_E
1			0,0665	0,0388	0,0240	0,0003
1,5	0,0305	0,0496			0,0710	0,0003
2	0,0802	0,0300	0,1923	0,3236	0,0900	0,0002
2,5	0,0900	0,1145	0,2107	0,1140	0,1060	0,0008
3	0,1081	0,0064	0,2293	0,1816	0,1280	0,0004
3,5	0,1142	0,0356				
4	0,1260	0,1029	0,2706	0,1200		

einges. ^{125}I–HNE [pmol]	PMN Spender 1		PMN Spender 2		PMN Spender 3	
	geb. ^{125}I–HNE	S_E	geb. ^{125}I–HNE	S_E	geb. ^{125}I–HNE	S_E
5			0,2880	0,2751		

Tabelle 3: Die mittels Scatchard–plot Analyse ermittelte Zahl der Bindungsstellen auf den untersuchten Zelltypen.

Zellen	Zahl der Bindungsstellen/Zelle	K_S [M^{-1}]
HL60	40600	2,5 x10^4
U937	185000	1,4 x10^7
PMN Spender 1	33500	5,5 x10^6
PMN Spender 2	107200	2,8 x10^6
PMN Spender 3	37400	5,9 x10^6

3.1.2 Untersuchungen zur Hemmbarkeit der Bindung von Elastase an die Zelloberfläche unter dem Einfluß verschiedener Faktoren

Zur Charakterisierung der spezifischen Bindungsstelle für Elastase auf PMN und U937 wurde versucht die Bindung mit den unterschiedlichsten Reagenzien zu hemmen. Alle Versuche wurden in Analogie zu den Bindungsstudien (siehe 3.1.1) in kompetitiven Ansätzen in HBSS mit je 1 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit den angegebenen Antikörpern, Proteasen, Peptiden bzw. Chemikalien vorbehandelt, mit radioaktiv markierter Elastase (4 nM) inkubiert und die gebundene Radioaktivität bestimmt. Als statistisch signifikante Unterschiede in der spezifischen Bindung wurden die Werte bezeichnet deren 95% Konfidenzintervall sich nicht mit dem der Pufferkontrolle überschneidet.

3.1.2.1 Hemmung der Bindung exogener Elastase durch Antikörper

Die Tatsache, daß die Bindungsstellen monoklonaler Antikörper gut untersucht sind, erlaubt eine gezielte Hemmung der Bindungstelle. In den Versuchen wurden PMN und U937–Zellen mit einer Reihe monoklonaler Antikörper gegen Oberflächenantigene, die auf PMN stark exprimiert werden (CD11a, CD11b, CD11c, CD16, CD18, CD35, CD43, CD58) präinkubiert. Es konnte gezeigt werden, daß Antikörper gegen die $ß_2$

−Integrine CD11a und CD11b, sowie Antikörper gegen CD35 und CD43 die Bindung exogener HNE um bis zu 80% hemmen.

Tabelle 4: U937 wurden mit den angegebenen Antikörpern (1µg/ml, 30 min, 4°C) vorinkubiert und in kompetitiven Ansätzten mit ^{125}I−HNE inkubiert. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte, Standardabweichungen, die spezifisch gebundene ^{125}I−HNE und deren Standardfehler (S_E) aus 6 einzelnen Meßwerten, sowie die Konfidenzintervalle (KI) mit einer Irrtumwahrscheinlichkeit von 5% bzw. 29% (CD11b). Das 95% KI konnte zur Beurteilung der spezifischen Bindung der Werte für die Hemmung mit α−CD11b nicht herangezogen werden, da der S_E im Verhältnis zur ermittelten Bindung zu groß ist.

Antikörper	**HBSS**	**m−IgG**	**CD11a**	**CD11b**	**CD11c**	**CD18**	**CD58**
^{125}I−HNE	8100	6711	7435	6357	7081	7157	8047
S_D	118	160	173	380	114	348	505
^{125}I−HNE + HNE	6490	5272	6641	6088	6069	5426	6900
S_D	590	374	301	56	522	213	122
geb. ^{125}I−HNE	1640	1439	794	269	1012	1731	1148
S_E	246	166	142	157	218	167	212
95% KI	[1128;2092]	[1114;1764]	[516;1072]	[−39;577]	[585;1439]	[1404;2058]	[732;1563]
71% KI	[1189;2031]			[1;537]			

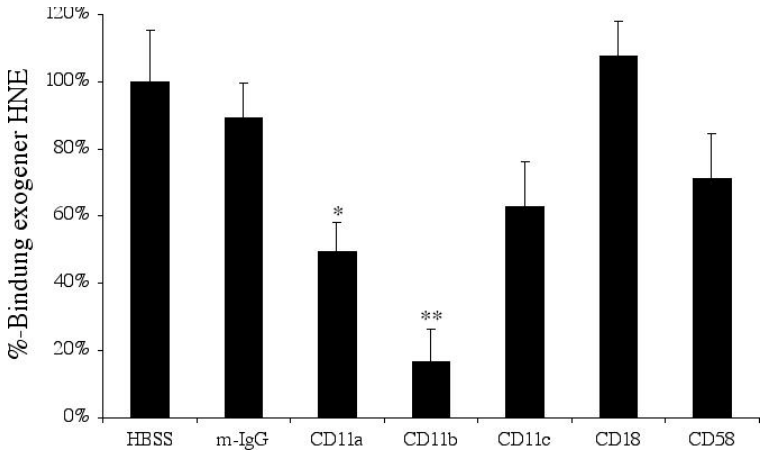


Abb. 7: U937−Zellen wurden mit den angegebenen monoklonalen Antikörpern vorinkubiert und die Bindung exogener HNE in kompetitiven Ansätzen ermittelt. Die Werte unterscheiden sich auf dem *5%−Nivea bzw. **29%−Niveau signifikant von der HBSS−Kontrolle.

Tabelle 5: U937 wurden mit Kombinationen von Antikörpern (je 1µg/ml, 30 min, 4°C) gegen die einzelnen Ketten der ß$_2$−Integrine vorinkubiert und in kompetitiven Ansätzten die spezifische Bindung markierter Elastase bestimmt. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte, Standardabweichungen, die spezifisch gebundene ^{125}I−HNE und deren Standardfehler (S_E) aus 4 einzelnen Meßwerten, sowie die Konfidenzintervalle (KI) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

Antikörper	**HBSS**	**m−IgG**	**CD11a + CD18**	**CD11b + CD18**	**CD11c + CD18**	**CD11a + CD11b + CD11c**
^{125}I−HNE	5314	5094	4687	5047	4376	4369
S_D	135	344	153	135	144	157
^{125}I−HNE + HNE	4532	4151	4160	4791	3872	4014
S_D	315	97	244	173	100	190
geb. ^{125}I−HNE	782	943	527	256	504	355
S_E	172	179	144	110	88	123
95% KI	[445;1119]	[592;1294]	[244;809]	[40;472]	[331;676]	[114;596]

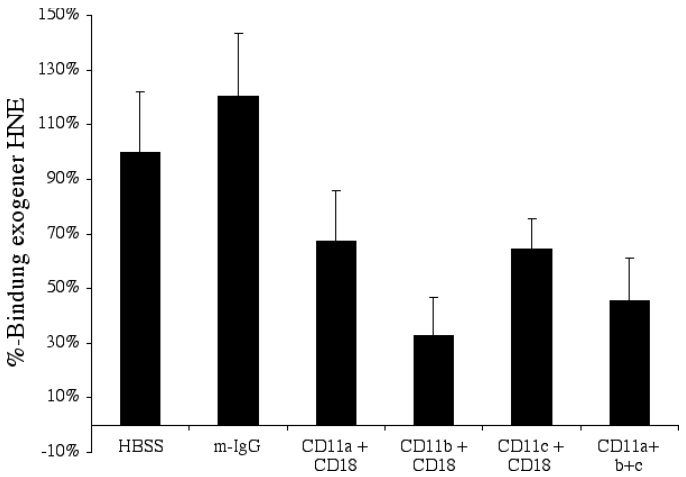


Abb. 8: U937 wurden mit Kombinationen monoklonaler Antikörper vorbehandelt und die Bindung exogener HNE kompetitiv bestimmt.

Aus Abb. 7 ist ersichtlich, daß Antikörper gegen die α−Ketten der ß$_2$−Integrine die Elastasebindung um bis zu 80% inhibieren. Dabei zeigen die Antikörper gegen CD11b den stärksten inhibitorischen Effekt. Kombinationen der Antikörper gegen CD11a/b/c mit einem Antikörper gegen CD18 konnten die Zahl der Bindungen von Elastasemolekülen an die Zelloberfläche nicht noch weiter verringern (Abb. 8). Diese mit U937 gewonnenen Ergebnisse konnten auch mit PMN verschiedener Spender bestätigt werden (Abb. 9 −12). Bei zwei Spendern zeigten auch Antikörper gegen CD35 und CD43 eine hemmende Wirkung (Abb.11 + 12).

Tabelle 6: PMN (Spender 1) wurden mit monoklonalen Antikörpern (1µg/ml, 30 min, 4°C) vorninkubiert und die Bindung exogener HNE in kompetitiven Ansätzten bestimmt. Mittelwerte, Standardabweichungen (S_D),die spezifisch gebundene ^{125}I–HNE und deren Standardfehler (S_E) aus 4 Einzelmeßungen, sowie die Konfidenzintervalle (KI) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

Antikörper	**HBSS**	**CD18**	**CD35**	**CD43**
^{125}I–HNE	32393	26883	29651	28621
S_D	202	2482	1325	2222
^{125}I–HNE + HNE	26902	20168	26105	25084
S_D	2060	1028	1977	77
geb. ^{125}I–HNE	5490	6715	3546	3537
S_E	1195	1284	1374	1550
95% KI	[3148;7832]	[4198;9232]	[853;6239]	[499;6575]

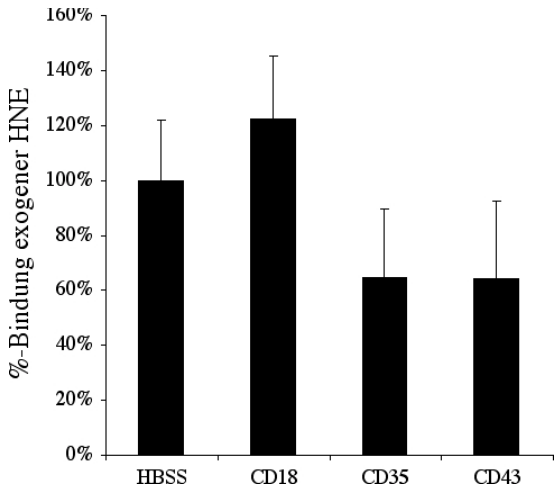


Abb. 9: PMN (Spender 1) wurden mit Antikörpern vorbehandelt und die Bindung exogener HNE in kompetitiven Ansätzen ermittelt.

Tabelle 7: PMN (Spender 2) wurden mit monoklonalen Antikörpern (1µg/ml, 30 min, 4°C) vorninku–biert und die Bindung exogener HNE in kompetitiven Ansätzten bestimmt. Mittelwerte, Standardab–weichungen (S_D), die spezifisch gebundene ^{125}I–HNE und deren Standardfehler (S_E) aus 5 Einzelme–ßungen, sowie die Konfidenzintervalle (KI) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

Antikörper	**HBSS**	**CD16**	**CD18**	**CD35**	**CD43**
^{125}I–HNE	49178	43350	46168	48435	43263
S_D	1169	462	4278	2134	2601
^{125}I–HNE + HNE	37953	32218	38369	43095	34446
S_D	3513	3804	3920	3154	3312
geb. ^{125}I–HNE	11225	11132	7799	5340	8818
S_E	1656	1713	2595	1703	1883
95% KI	[7979;14471]	[7775;14489]	[2713;12885]	[2002;8678]	[5127;12509]

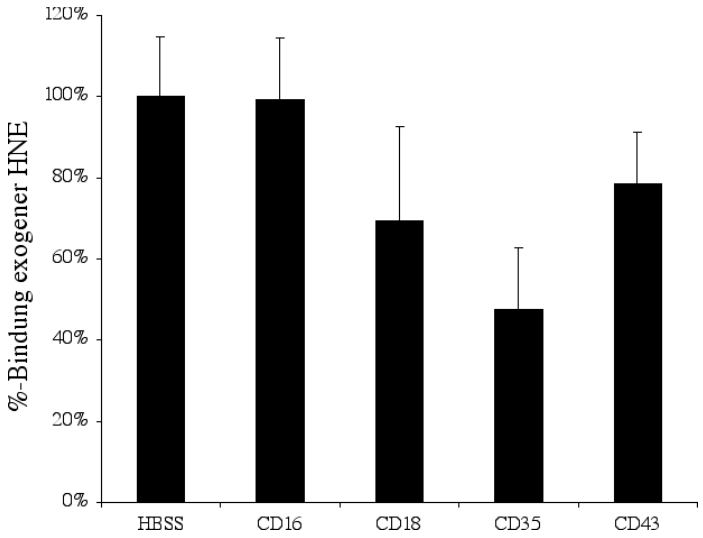


Abb. 10: Die Bindung exogener HNE an, mit Antikörpern vorbinkubierten, PMN (Spender 2) wurde in kompetitiven Ansätzen ermittelt.

Tabelle 8: PMN (Spender 3) wurden mit monoklonalen Antikörpern (1µg/ml, 30 min, 4°C) vorninku–biert und die Bindung exogener HNE in kompetitiven Ansätzten bestimmt. Mittelwerte, Standardab–weichungen (S_D), die spezifisch gebundene ^{125}I–HNE und deren Standardfehler (S_E) aus zwei Versuchs–reihen mit je 5 bzw. 4 Einzelmeßungen, sowie die Konfidenzintervalle mit einer Irrtumswahrschein–lichkeit von 5%.

Antikörper	**HBSS**	**CD11a**	**CD11b**	**CD11c**	**HBSS**	**CD18**	**CD35**	**CD43**
^{125}I–HNE	80375	75084	73815	81156	49464	54000	48844	59216
S_D	2411	3291	2518	5519	1383	1810	222	1687
^{125}I–HNE + HNE	45607	54618	53993	62397	32891	39617	36805	52993
S_D	3692	5119	1809	1827	2389	4186	1238	2184
geb. ^{125}I–HNE	34768	20466	19822	18759	16573	14383	12039	6222
S_E	1972	2724	1303	2475	1380	2280	629	1380
95% KI	[30903; 38633]	[15127; 25805]	[17268; 22376]	[13908; 23610]	[13668; 19278]	[9914; 18852]	[10806; 13272]	[3517; 8927]

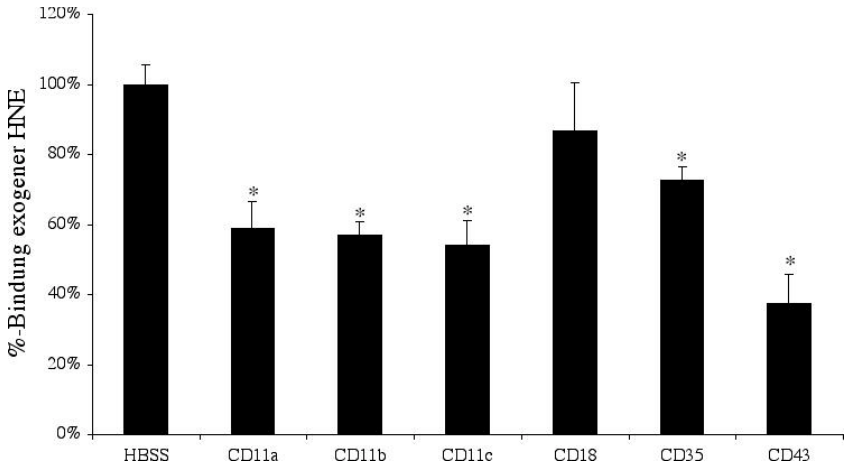


Abb. 11: Die Bindung exogener HNE an, mit Antikörpern vorinkubierten, PMN (Spender 3) wurde in kompetitiven Ansätzen ermittelt. *Die Werte unterscheiden sich auf dem 5%–Niveau von der Puffer–kontrolle.

Tabelle 9: PMN (Spender 4) wurden mit monoklonalen Antikörpern (1µg/ml, 30 min, 4°C) vorninkubiert und die Bindung exogener HNE in kompetitiven Ansätzten bestimmt. Mittelwerte, Standardabweichungen (S_D), die spezifisch gebundene ^{125}I–HNE und deren Standardfehler (S_E) aus 3 Einzelmeßungen, sowie die Konfidenzintervalle mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

Antikörper	**HBSS**	**CD11a,b,c**	**CD18**	**CD43**
^{125}I–HNE	63602	62782	57945	52024
S_D	2377	163	8664	926
^{125}I–HNE + HNE	47539	48809	38645	46679
S_D	4390	4776	533	2176
geb. ^{125}I–HNE	16063	13972	19300	5344
S_E	2882	2759	5012	1365
95% KI	[10414;21712]	[8564;19380]	[9476;29124]	[2669;8019]

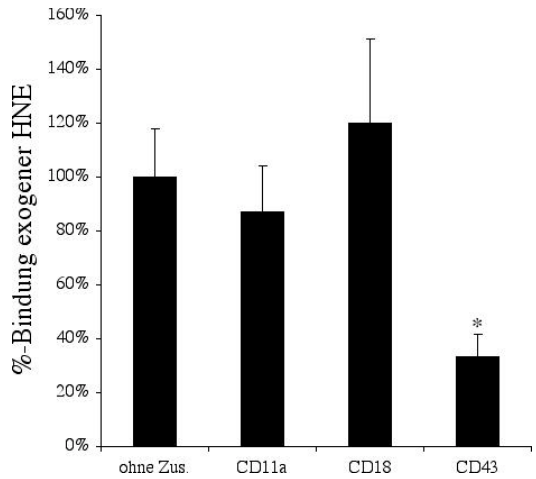


Abb. 12: Die Bindung exogener HNE wurde an, mit Antikörpern vorinkubierten, PMN (Spender 4) in kompetitiven Ansätzen ermittelt. *Die Werte unterscheiden sich auf dem 5%–Niveau von der Pufferkontrolle.

Antikörper gegen die α–Ketten (CD11a, CD11b und CD11c) der ß$_2$–Integrine sowie gegen CD35 und CD43 hemmen die Bindung exogener Elastase an U937–Zellen und PMN. Die Antikörper gegen CD35 und CD43 hemmen jedoch nicht die Bindung an PMN bei allen untersuchten Spendern. Auch ist eine sterische Hinderung der Bindungsstelle für Elastase nicht auszuschliessen.

3.1.2.2 Peptidfragmente des Komplementspaltstückes C3bi hemmen die Bindung exogener Elastase an die Zelloberfläche

ß$_2$–Integrine besitzen in der α–Kette eine hoch affine Bindungsstelle, die die RGD–Sequenz erkennt. Da Antikörper gegen CD11a und CD11b die Bindung an die Zelloberfläche inhibieren, wurden Peptidfragmente des CD11b–Liganden C3bi zur Hemmung der Bindungsstelle verwandt. Es zeigte sich, daß sowohl RGDS als auch das, die RGD–Sequenz enthaltende, Fragment Ac–M–15–K (Ac–MILEICTRYRGDQD–NH_2, Aminosäuren 1384 – 1397 bezüglich der C3–Sequenz) die Bindungsstelle für HNE auf PMN um 70 – 90% hemmt. Das als Negativkontrolle eingesetzte Fragment Nonapeptid (Ac–MILEICTRY–NH_2) ohne die RGD–Sequenz zeigte nur geringen Ein–fluß auf die Bindung von HNE an die Zelloberfläche.

Tabelle 10: U937 wurden mit synthetischen C3bi–Peptiden (10 nM, 30 min, 4°C) präinkubiert und in kompetitiven Ansätzen die Bindung exogener Elastase bestimmt. Mittelwerte, Standardabweichun–gen (S_D), die spezifisch gebundene ^{125}I–HNE und deren Standardfehler (S_E) aus 3 Meßwerten, sowie die Konfidenzintervalle mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% bzw. 50% für RGDS und Ac–M–15–K, da deren Fehler im Verhältnis zur spezifischen Bindung so hoch ist, daß das 95% KI einen negativen Wert ergibt.

Peptid	**HBSS**	**Nonapeptid**	**RGDS**	**Ac–M–15–K**
^{125}I–HNE	33019	32418	27933	29589
S_D	1454	2096	1726	970
^{125}I–HNE + HNE	23678	25275	25916	27299
S_D	2481	1685	1573	1955
geb. ^{125}I–HNE	9342	7142	2017	2290
S_E	1660	1553	1348	1260
95% KI	[6088;12596]	[4098;10186]	[–625;4659]	[–180;4760]
50% KI	[6868;11815]		[8;4026]	[413;4167]

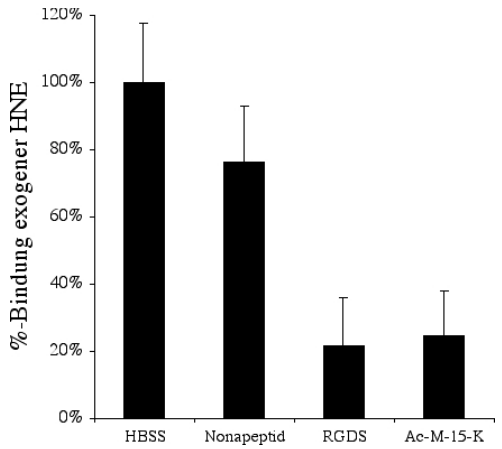


Abb. 13: Die Bindung exogener HNE an, mit C3bi–Peptiden vorinkubierten, U937 wurde in kompetiti–ven Ansätzen ermittelt.

Tabelle 11: PMN (Spender 2) wurden mit C3bi–Peptiden (10 nM, 30 min, 4°C) präinkubiert und in kompetitiven Ansätzen die Bindung exogener Elastase bestimmt. Mittelwerte, Standardabweichungen (S_D), die spezifisch gebundene ^{125}I–HNE und deren Standardfehler (S_E) aus 3 Meßwerten, sowie die Konfidenzintervalle mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% bzw. 23%. Das Verhältnis der ermittelten spezifischen Bindung zu deren Fehler ist so groß, daß das 95% KI mit einem negativen Wert beginnt.

Peptid	**HBSS**	**Nonapeptid**	**RGDS**	**Ac–M–15–K**
^{125}I–HNE	90812	106514	76452	87574
S_D	5041	253	500	3685
^{125}I–HNE + HNE	78071	98046	75484	83784
S_D	25	4893	1528	334
geb. ^{125}I–HNE	12741	8468	968	3790
S_E	2910	2825	928	2128
95% KI	[7037;18445]	[2931;14005]	[–851;2787]	[–381;7961]
77% KI	[7590;17821]		[3468;3468]	[23;7557]

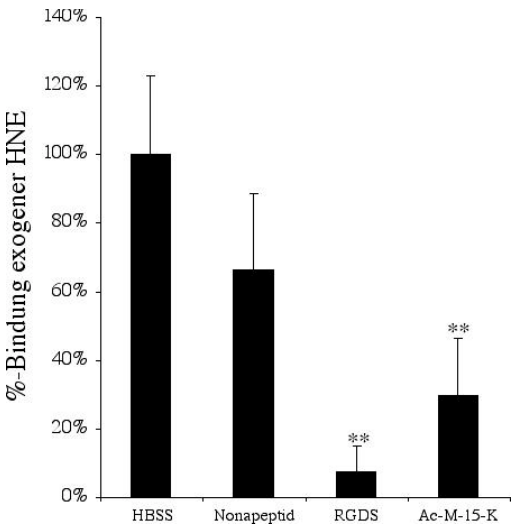


Abb. 14: Die Bindung exogener HNE an, mit C3bi–Peptiden vorinkubierten, PMN (Spender 2) wurde in kompetitiven Ansätzen ermittelt. ** Die Werte unterscheiden sich auf dem 23%–Niveau von der Puf–ferkontrolle.

Tabelle 12: PMN (Spender 3) wurden mit C3bi–Peptiden (10 nM, 30 min, 4°C) präinkubiert und in kompetitiven Ansätzen die Bindung exogener Elastase bestimmt. Mittelwerte, Standardabweichungen (S_D), die spezifisch gebundene ^{125}I–HNE und deren Standardfehler (S_E) aus 3 Meßwerten, sowie die Konfidenzintervalle mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

Peptid	**HBSS**	**Nonapeptid**	**RGDS**	**Ac–M–15–K**
^{125}I–HNE	47284	43292	30671	22449
S_D	2803	4414	1581	2080
^{125}I–HNE + HNE	14319	23449	20827	11481
S_D	1130	1058	1910	3771
geb. ^{125}I–HNE	32965	19843	9845	10968
S_E	1745	2620	1431	2486
95% KI	[27821;38091]	[14707;24978]	[7040;12650]	[6095;15841]

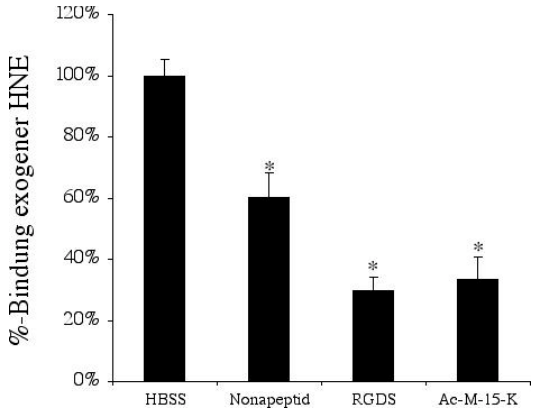


Abb. 15: Die Bindung exogener HNE an, mit C3bi−Peptiden vorinkubierten, PMN (Spender 3) wurde in kompetitiven Ansätzen ermittelt. *Die Werte unterscheiden sich auf den 5%−Niveau von der Pufferkontrolle.

Die Peptide RGDS und MILECTRYRGDQD die spezifisch and die CD11−Moleküle binden sind, ebenso wie die Antikörper gegen CD11b, in der Lage die Bindung exogener Elastase an PMN und U937 um bis zu 80% zu inhibieren. Dies zeigt, daß die Inhibition mit den CD11−Antikörper nicht auf sterischen Effekten beruht.

3.1.2.3 Die Serinproteasen PR3, Cathepsin G und PPE hemmen die Oberflächenbindung exogener Elastase

PMN von Vaskulitispatienten, sowie stimulierte PMN gesunder Spender, exprimieren neben HNE die homologen Serinproteasen Proteinase 3 (PR3) und Cathepsin G auf der Zelloberfläche. Deshalb wurde der Einfluß von PR3, Cathepsin G und Pankreaselastase vom Schwein (PPE, 43% homolog zu HNE) auf die Bindung exogener Elastase untersucht. Durch Vorinkubation der PMN mit PPE, Cathepsin G bzw. PR3 wurde die Bindung der Elastase auf bis zu 44%, 32% bzw. 29% (abhängig vom Spender), bezüglich Zellen die nur mit HBSS vorbehandelt wurden, gehemmt. Die Bindung exogener Elastase an die Zelloberfläche von U937−Zellen wird durch PPE bzw. PR3 auf 20 − 30% Bindung bezüglich der Pufferkontrolle reduziert.

Tabelle 13: U937 wurden mit den Serinproteasen PPE und PR3 (8 nM, 30 min auf Eis) inkubiert und die spezifische Bindung exogener HNE in kompetitiven Ansätzen bestimmt. Mittelwerte, Standardabweichung (S_D), die spezifisch gebundene ^{125}I–HNE und deren Standardfehler (S_E) aus 5 einzelnen Meßwerten, sowie die Konfidenzintervalle mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%, bzw. 37% für PPE.

Enzym	**HBSS**	**PPE**	**PR3**
^{125}I–HNE	69393	62939	67971
S_D	1180	1604	81
^{125}I–HNE + HNE	62775	61489	66039
S_D	1127	1152	1266
geb. ^{125}I–HNE	6618	1453	1932
S_E	730	883	567
95% KI	[5187;8049]	[–278;3184]	[821;3043]
37% KI	[5421;7815]	[1448;3671]	

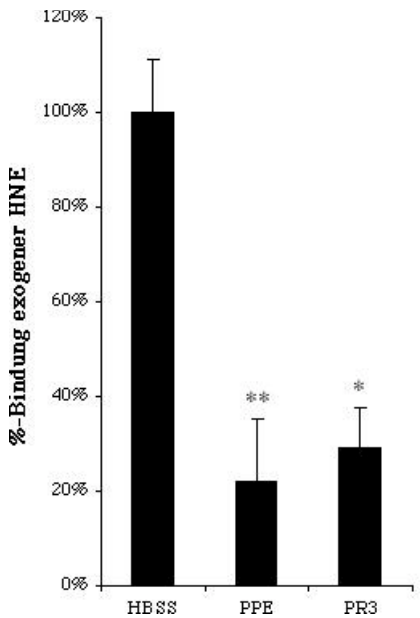


Abb. 16: Die Bindung exogener HNE an U937 wurde nach der Inkubation der Zellen mit PPE und PR3 ermittelt. Die Werte unterscheiden sich auf dem *5% bzw. **37%–Niveau.

Tabelle 14: PMN (Spender 1) wurden mit den Serinproteasen PPE, CG und PR3 (8 nM, 30 min auf Eis) inkubiert und die spezifische Bindung exogener HNE in kompetitiven Ansätzen bestimmt. Mittelwerte, Standardabweichungen (S_D), die spezifisch gebundene ^{125}I–HNE und deren Standardfehler (S_E) aus 4 einzelnen Meßwerten, sowie die Konfidenzintervalle mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

Enzym	**HBSS**	**PPE**	**Cathepsin G**	**PR3**
^{125}I–HNE	230805	167327	173134	334714
S_D	15895	31350	11641	9271
^{125}I–HNE + HNE	129914	123130	131275	305700
S_D	45447	5429	23161	6414
geb. ^{125}I–HNE	100891	44197	41859	29014
S_E	24073	15909	12961	5637
95% KI	[53708;148074]	[13015;75379]	[16455;67263]	[17965;40063]

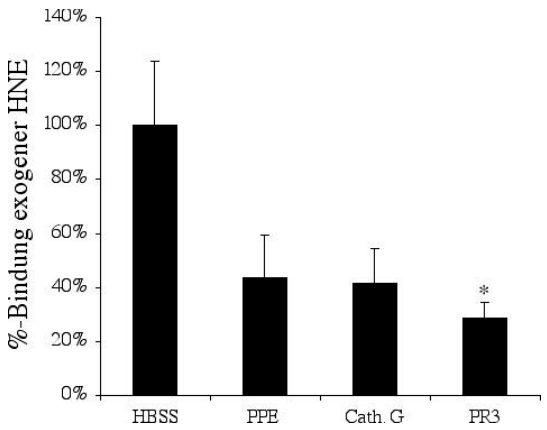


Abb. 17: Die Bindung exogener HNE an PMN (Spender 1) wurde nach der Inkubation der Zellen mit PPE, Cathepsin G und PR3 ermittelt. *Die Werte unterscheiden sich auf dem 5%–Niveau.

Tabelle 15: PMN (Spender 4) wurden mit den Serinproteasen Cathepsin G und PR3 (8 nM, 30 min auf Eis) inkubiert und die spezifische Bindung exogener HNE in kompetitiven Ansätzen bestimmt. Mittel–werte, Standardabweichungen (S_D), die spezifisch gebundene ^{125}I–HNE und deren Standardfehler (S_E) aus 6 einzelnen Meßwerten, sowie die Konfidenzintervalle mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

Enzym	**HBSS**	**PR3**	**Cathepsin G**
^{125}I–HNE	59509	35068	35840
S_D	758	5652	517
^{125}I–HNE + HNE	37049	22606	29710
S_D	7135	141	1559
geb. ^{125}I–HNE	22461	12606	6130
S_E	3209	260	735
95% KI	[16171;28751]	[12096;13116]	[4689;7571]

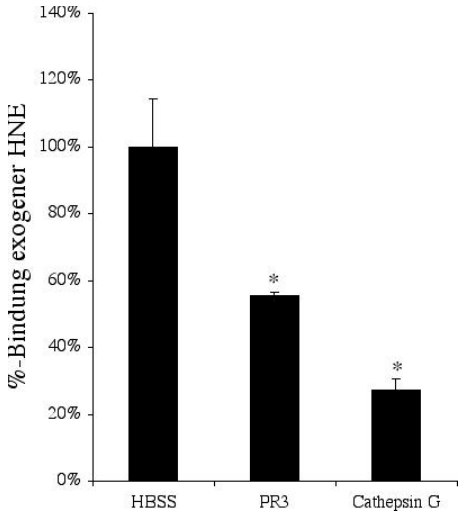


Abb. 18: Die Bindung exogener HNE an PMN (Spender 4) wurde nach der Inkubation der Zellen mit PR3 und Cathepsin G ermittelt. *Die Werte unterscheiden sich auf dem 5%−Niveau.

PMN und U937−Zellen, die mit den zu HNE homologen Serinproteasen PR3, Cathepsin G und PPE vorinkubiert wurden binden nur geringe Mengen Elastase. Dies läßt vermuten, das die Serinproteasen an die gleiche Stelle auf der Zelloberfläche binden.

3.1.2.4 Die Bindung exogener Elastase an die Zelloberfläche wird von zweiwertigen Kationen beeinflußt

Die Bindung der $ß_2$−Integrine an Liganden ist stark abhängig von der Anwesenheit zweiwertiger Kationen. Deshalb wurde der Einfluß des Chelatbildners EDTA, sowie von Ca^{2+}, Mg^{2+} und Mn^{2+} auf die Bindung exogener Elastase an die Zelloberflächen von Granulozyten untersucht. Alle vorhergehenden Versuche wurde in HBSS mit je 1 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} durchgeführt. In Anwesenheit von 1mg/ml EDTA bindet nur ca. 20% der Elastase an PMN, im Vergleich zur Pufferkontrolle. Zellen, welche in HBSS ohne zweiwertige Ionen inkubiert wurden (HBSS*), zeigten ebenfalls eine stark reduzierte HNE−Bindung (bis zu 20% Bindung). Dieser Effekt konnte ganz bzw. partiell durch die Zugabe von 1 mM Ca^{2+}, Mg^{2+} oder Mn^{2+} kompensiert werden. Verschiedene Kombinationen der drei Ionen zeigten, daß die Bindung von HNE an den Rezeptor am stärksten von der Anwesenheit von Ca^{2+}−Ionen begünstigt wird.

Tabelle 16: Die kompetitive Bindung exogener HNE an PMN (Spender 1) wurde in HBSS mit je 1 mM Ca^{2+} und 1 mM Mg^{2+}, in HBSS* ohne zweiwertige Ionen bzw. in HBSS* mit je 1 mM Ca^{2+}, Mg^{2+} oder Mn^{2+} durchgeführt. In einem analogen Ansatzt wurden PMN in HBSS in Gegenwart von 1 mg/ml EDTA mit ^{125}I–HNE inkubiert. Mittelwerte, Standardabweichungen (S_D), die spezifisch gebundene ^{125}I–HNE und deren Standardfehler (S_E) aus 5 unabhängigen Meßwerten, sowie die Konfidenzintervalle mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

Ionen	**HBSS**	**Ca^{2+}**	**Mg^{2+}**	**Mn^{2+}**	**HBSS***	**EDTA**
^{125}I–HNE	9772	8754	12131	12070	9865	6600
S_D	577	17	375	150	97	225
^{125}I–HNE + HNE	7199	5725	10539	10387	8463	6033
S_D	536	63	665	255	99	241
geb. ^{125}I–HNE	2573	3029	1592	1683	1403	567
S_E	455	38	441	171	80	190
95% KI	[1681;3465]	[2954;3103]	[728;2456]	[1348;2018]	[1246;1560]	[195;939]

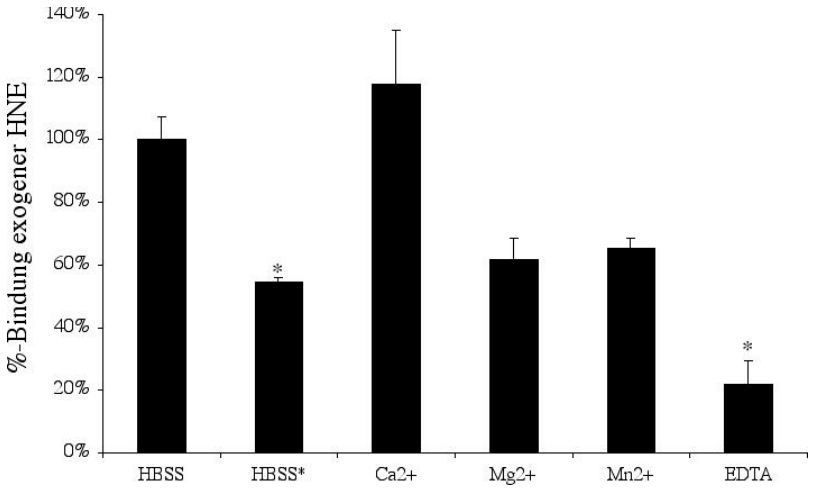


Abb. 19: Der Einfluß zweiwertiger Metallionen (HBSS mit je 1 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} in Gegenwart von 1 mg/ml EDTA, HBSS* ohne zweiwertige Ionen, bzw. mit je 1 mM Ca^{2+},Mg^{2+} oder Mn^{2+}) auf die Ober–flächenbindung exogener HNE an PMN (Spender 1). *Die Werte unterscheiden sich auf dem 5%–Niveau von der HBSS–Kontrolle.

Tabelle 17: Die kompetitive Bindung exogener HNE an PMN (Spender 3) wurde in HBSS mit je 1 mM Ca^{2+} und 1 mM Mg^{2+}, in HBSS* ohne zweiwertige Ionen bzw. in HBSS* mit je 1 mM Ca^{2+}, Mg^{2+} oder Mn^{2+} durchgeführt. Mittelwerte, Standardabweichungen (S_D), die spezifisch gebundene ^{125}I–HNE und deren Standardfehler (S_E) aus 4 unabhängigen Meßwerten, sowie die Konfidenzintervalle mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%. Das Verhältnis der spezifischen Bindung und deren Fehler ist im Falle der Pufferkontrolle so groß, daß erst das 53% KI bei einem positiven Wert beginnt, für Mn^{2+} beginnt das KI erst mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 82% mit einem positiven Wert. Da der Fehler für HBSS* größer ist als die ermittelte spezifische Bindung kann kein Konfidenzintervall bestimmt werden.

Ionen	**HBSS**	**Ca^{2+}**	**Mg^{2+}**	**Mn^{2+}**	**HBSS***
^{125}I–HNE	6126	6055	7072	7559	6950
S_D	312	206	132	242	232
^{125}I–HNE + HNE	5429	5473	6818	7028	6858
S_D	726	456	87	739	403
geb. ^{125}I–HNE	697	582	254	531	92
S_E	456	289	91	449	268
95% KI	[–197;1591]	[16;1148]	[76;432]	[–103;1657]	[–433;617]
53% KI	[0;1395]	[140;1024]	[114;393]	[–156;218]	[–318;502]

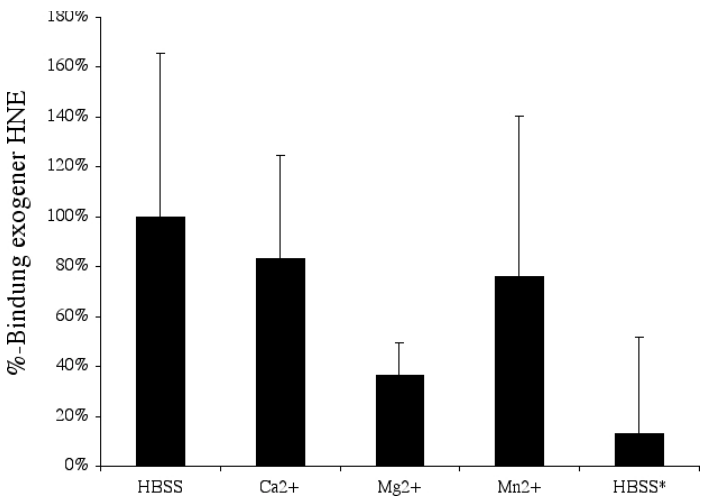


Abb. 20: Der Einfluß zweiwertiger Metallionen (HBSS mit je 1 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} HBSS* ohne zweiwertige Ionen, bzw. mit je 1 mM Ca^{2+},Mg^{2+} oder Mn^{2+}), auf die Oberflächenbindung exogener HNE an PMN (Spender 3).

Tabelle 18: Die kompetitive Bindung exogener HNE an PMN (Spender 2) wurde in HBSS mit je 1 mM Ca^{2+} und 1 mM Mg^{2+}, in HBSS* ohne zweiwertige Ionen bzw. in HBSS* mit je 1 mM Ca^{2+} und Mn^{2+} bzw. je 1 mM Mg^{2+} und Mn^{2+} durchgeführt. Mittelwerte, Standardabweichungen (S_D), die spezifisch gebundene ^{125}I–HNE und deren Standardfehler (S_E) aus 3 unabhängigen Meßwerten, sowie die Konfidenzintervalle mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%. Die ermittelte spezifische Bindung in HBSS* ist genau so groß wie deren Fehler, so daß kein Konfidenzintervall angegeben werden kann.

Ionen	**HBSS**	**Ca^{2+}/Mn^{2+}**	**Mg^{2+}/Mn^{2+}**	**HBSS***
^{125}I–HNE	6942	5068	6417	4620
S_D	806	15	368	306
^{125}I–HNE + HNE	4098	3427	5272	4384
S_D	50	60	134	136
geb. ^{125}I–HNE	2843	1642	1145	236
S_E	571	43	276	237
95% KI	[1730;3956]	[1558;1726]	[607;1683]	[–226;698]

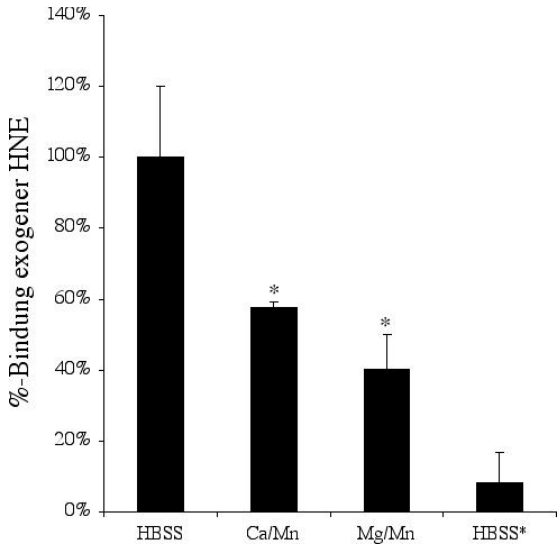


Abb. 21: Der Einfluß zweiwertiger Metallionen (HBSS mit je 1 mM Ca^{2+} und Mg^{2+}, HBSS* ohne zweiwertige Ionen, bzw. mit je 1 mM Ca^{2+} und Mn^{2+} oder je 1 mM Mg^{2+} und Mn^{2+}) auf die Oberflächenbindung exogener HNE an PMN (Spender 2). *Die Werte unterscheiden sich auf dem 5%–Niveau von der HBSS–Kontrolle.

Tabelle 19: Die kompetitive Bindung exogener HNE an PMN (Spender 3) wurde in HBSS mit je 1 mM Ca^{2+} und 1 mM Mg^{2+}, in HBSS* ohne zweiwertige Ionen bzw. in HBSS* mit je 1 mM Ca^{2+} und Mn^{2+} bzw. je 1 mM Mg^{2+} und Mn^{2+} durchgeführt. Mittelwerte, Standardabweichungen (S_D), die spezifisch gebundene ^{125}I–HNE und deren Standardfehler (S_E) aus 4 unabhängigen Meßwerten, sowie die Konfidenzintervalle mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% bzw. 33% (HBSS*).

Ionen	**HBSS**	**Ca^{2+}/Mn^{2+}**	**Mg^{2+}/Mn^{2+}**	**HBSS***
^{125}I–HNE	312327	329990	303015	254983
S_D	7405	26250	13915	14535
^{125}I–HNE + HNE	234778	245694	26559	241599
S_D	11788	10941	22989	10333
geb. ^{125}I–HNE	77549	84296	37425	13384
S_E	6226	12718	12017	7976
95% KI	[65408;89690]	[59496;109096]	[13992;60858]	[–2169;28937]
67% KI	[67152;87916]			[0,3;26768]

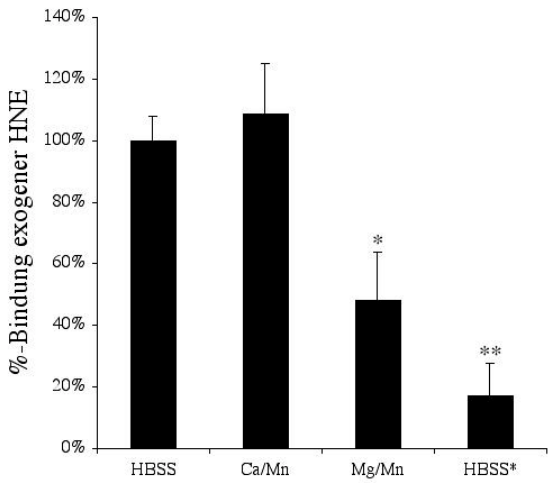


Abb. 22: Der Einfluß zweiwertiger Metallionen (HBSS mit je 1 mM Ca^{2+} und Mg^{2+}, HBSS* ohne zweiwertige Ionen, bzw. mit je 1 mM Ca^{2+} und Mn^{2+} oder je 1 mM Mg^{2+} und Mn^{2+}) auf die Oberflächenbindung exogener HNE an PMN (Spender 3). Die Werte unterscheiden sich auf dem *5%–Niveau, bzw. auf dem **23%–Niveau von der HBSS–Kontrolle.

Diese Daten veranschaulichen, daß die Elastasebindung an die Zelloberfläche stark von der Anwesenheit zweiwertiger Kationen abhängt, einem typischen Merkmal der Ligandenbindung an die $ß_2$–Integrine.

3.1.2.5 Die Inaktivierung der katalytischen Elastaseaktivität vermindert die Zahl der Bindungen an die Zelloberfläche

Elastase auf der Oberfläche stimulierter PMN ist katalytisch aktiv. Es stellte sich nun die Frage ob die katalytische Aktivität für die Bindung an die Zelloberfläche von Bedeutung ist. Dazu wurden PMN mit hitzeinaktivierter Elastase vorinkubiert. Es zeigte sich, daß die inaktivierte HNE die Bindung an PMN nicht beeinflußt. Um zu klären, ob die so inaktivierte HNE aufgrund der veränderten Struktur nicht in der Lage ist die Bindung zu inhibieren, wurden PMN in Gegenwart von PMSF mit ^{125}I–HNE inkubiert bzw. mit PMSF–inaktivierter HNE vorinkubiert. Auch die PMSF–inaktivierte HNE war nicht in der Lage die HNE–Bindung zu inhibieren. Analog dazu wurde durch die Inaktivierung der ^{125}I–HNE die Bindung an die Zelloberfläche reduziert. Der Erhalt der katalytischen Aktivität stellt somit einen wichtigen Faktor zur Bindung an den Liganden dar.

Tabelle 20: Bindung von ^{125}I–HNE an PMN (Spender 2) in Gegenwart von 1 mM PMSF in kompetivien Bindungsstudienl. In einem separaten Ansatz wurden die PMN mit hitzeinaktivierter HNE (30 min, 56°C) vorinkubiert und die Oberflächenbindung katalytisch aktiver ^{125}I–HNE in kompetitiven Ansätzen ermittelt. Mittelwerte, Standardabweichungen (S_D), die spezifisch gebundene ^{125}I–HNE und deren Standardfehler (S_E) aus 3 Meßwerten, sowie die Konfidenzintervalle mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

	HBSS	**PMSF**	**HBSS**	**HNE (inakt.)**
^{125}I–HNE	9772	6424	59509	57783
S_D	577	430	758	1577
^{125}I–HNE + HNE	7199	5472	39482	34845
S_D	536	428	5833	3575
geb. ^{125}I–HNE	2573	952	20027	22938
S_E	455	350	3209	1747
95% KI	[1686;3460]	[558;1346]	[16203;28719]	[1953;26345]

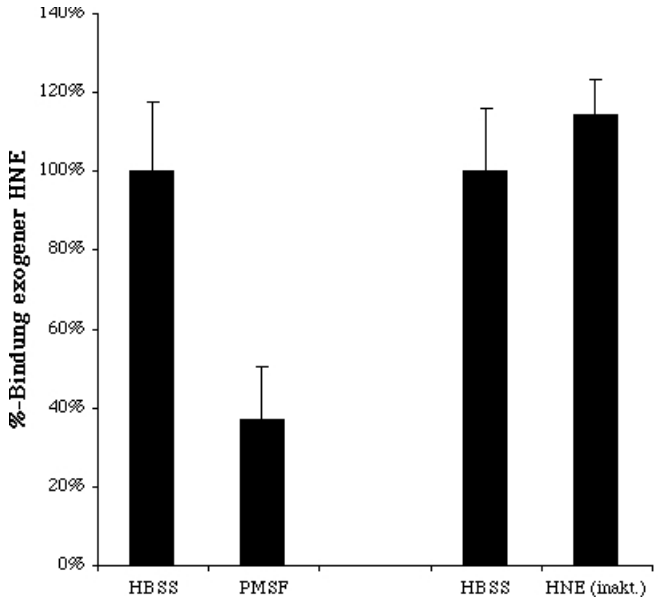


Abb. 23: Bindung von ^{125}I–HNE an PMN in Gegenwart von 1 mM PMSF, bzw. an, mit hitzeinaktivierter HNE vorinkubierten, PMN (Spender 2) aus 2 unterschiedlichen Versuchen. *Die Werte unterscheiden sich auf dem 5%–Niveau.

Tabelle 21: PMN (Spender 5) wurden mit HNE (8 nM, 30 min, 4°C) bzw. PMSF–inaktivierter HNE vorinkubiert und die Oberflächenbindung exogener HNE in kompetivien Ansätzen ermittel. Mittelwerte, Standardabweichungen (S_D), die spezifisch gebundene ^{125}I–HNE und deren Standardfehler (S_E) aus 3 Meßwerten, sowie die Konfidenzintervalle mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%. Der Fehler bei der Inhibition mit HNE ist so groß, daß kein KI bestimmt werden kann.

	HBSS	**HNE**	**HNE (inakt.)**
^{125}I–HNE	24266	22705	26416
S_D	2486	3990	602
^{125}I–HNE + HNE	10150	20400	8245
S_D	198	7225	569
geb. ^{125}I–HNE	14116	2306	18171
S_E	1440	4765	478
95% KI	[11308;16924]	[–3752;14832]	[17239;19103]

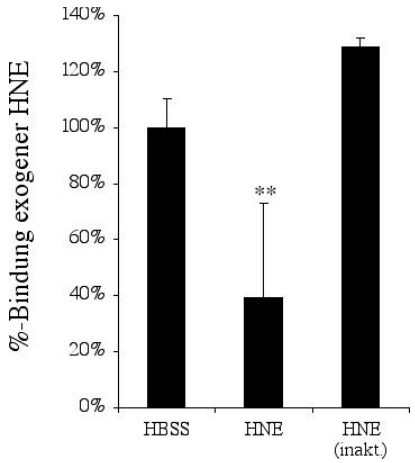


Abb. 24: Bindung exogener HNE an, mit aktiver bzw. PMSF−inaktivierter HNE (8 nM, 30 min, 4°C) vorbehandelten, PMN (Spender 5). Der große Fehler bei der Inhibition mit aktiver HNE ist vermutlich auf einen Austausch von gebundener HNE mit freier ^{125}I−HNE zurückzuführen. **Die Werte unterschei−den sich auf dem 16%−Niveau.

Sowohl die Denaturierung der Elastase als auch die kovalente Inaktivierung mit PMSF, die keine nennenswerten Konformationsänderungen induziert, unterdrückt die HNE−Bindung an die Zelloberfläche der PMN. Dies läßt vermuten, daß eine intakte katalytische Triade für die Oberflächenbindung exogener Elastase wichtig ist.

3.2 Elastase bindet an den isolierten Komplementrezeptor Typ 3 (CR3, CD11b/CD18)

Um zu zeigen, daß die Bindungshemmung exogener Elastase mittels Antikörper nicht durch sterische Hinderung hervorgerufen wird, wurde der Komplementrezeptor Typ 3 (CD11b/CD18) über immobilisiertes C3bi von PMN isoliert, die Reinheit mittels SDS−PAGE und ELISA ermittelt (Abb. 25). In der SDS−PAGE sind die Banden bei 185 kD der CD11b−Kette und 95 kD der CD18−Kette zu erkennen. Im ELISA binden aus−schließlich Antikörper gegen CD11b und CD18 an die aufgereinigten Proteine.

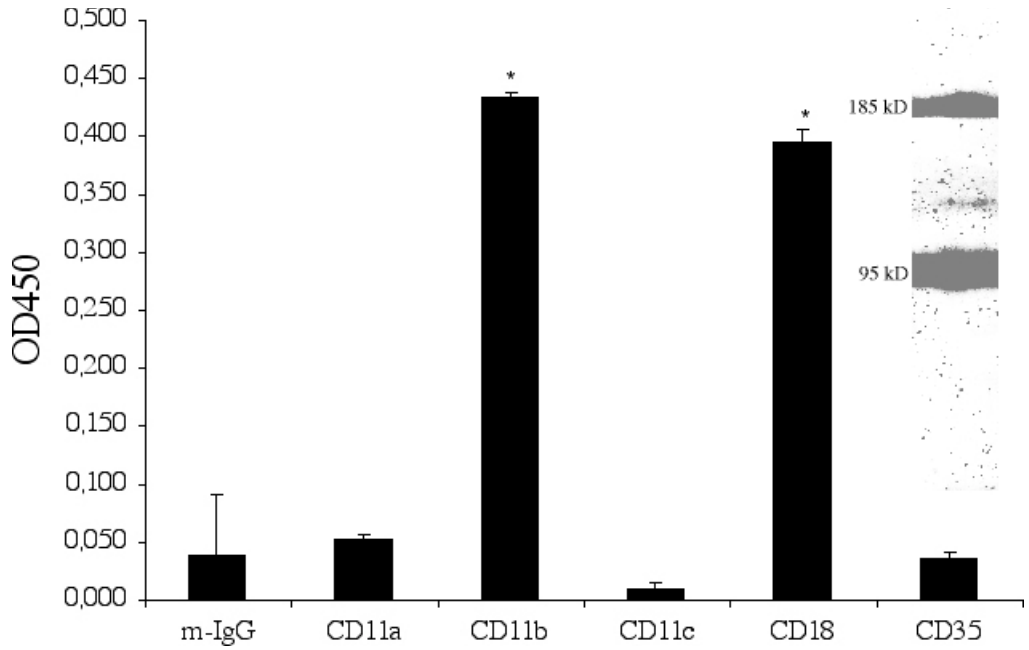


Abb. 25: Nachweis des isolierten CR3−Komplexes mittels ELISA mit monoklonalen Antikörpern gegen CD11a, CD11b, CD11c, CD18 und CD35; Mittelwerte und Standardabweichungen aus 6 Einzelmessungen ($^{*}p \leq 0{,}002$ bzgl. m−IgG). Der an eine ELISA−Platte gekoppelte, isolierte Proteinkomplex reagiert ausschließlich mit den Antikörpern gegen CD11b und CD18. In der SDS−PAGE (4 − 17%) sind die Banden der CD11b−Kette bei 185 kD und der CD18−Kette bei 95 kD zu erkennen.

CR3 wurde an eine ELISA−Platte gekoppelt und mit Elastase bzw. Cathepsin G inku−biert. Der Nachweis gebundener Elastase erfolgte mittels Umsatz des spezifischen Sub−strates MeOSuc−Ala−Ala−Pro−Val−pNA, Cathepsin G wurde durch den Umsatz von Suc−Ala−Ala−Pro−Phe−pNA nachgewiesen. Die Werte der Tabelle 22 zeigen, daß HNE an aufgereinigten CR3 bindet. Durch Antikörper gegen CD11b (Klon BEAR1 und ICRF44), nicht jedoch gegen CD18, konnte die Bindung inhibiert werden. Auch Cathepsin G bindet an den isolierten CD11b/CD18−Komplex (Tabelle 23). Die Bin−dung kann jedoch nicht mit den zur Verfügung stehenden Antiköpern inhibiert werden.

Tabelle 22: Der isolierte CR3 wurde an eine ELISA−Platte gekoppelt und mit 8 nM HNE in Gegenwart der angegebenen Antikörper inkubiert. Gebundene HNE wurde mittels Umsatz des spezifischen Sub−strats Suc−Ala−Ala−Pro−Val−pNa bei 405 nm bestimmt. Mittelwerte (MW), Standardabweichun−gen (S_D) und Signifikanz (p) bzgl. m−IgG des unabhängigen t−Tests aus 5 Einzelmessungen. * ohne CR3.

	BSA*	**m−IgG**	**α−CD11a**	**α−CD11b (BEAR1)**	**α−CD11b (OKM1)**	**α−CD11b (ICRF44)**	**α−CD18**
MW	0,095	0,304	0,244	0,181	0,235	0,209	0,292
S_D	0,043	0,045	0,064	0,026	0,014	0,009	0,040
p	0,0131		0,1241	0,0049	0,1338	0,0046	0,1859

Tabelle 23: Der isolierte CR3 wurde an eine ELISA−Platte gekoppelt und mit 8 nM Cathepsin G in Gegenwart der angegebenen Antikörper inkubiert. Gebundenes Cathepsin G wurde mittels Umsatz des spezifischen Substrats MeOSuc−Ala−Ala−Pro−Phe−pNa bei 405 nm bestimmt. Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (S_D) und Signifikanz (p) bzgl. m−IgG des unabhängigen t−Tests aus 5 Einzel−messungen. * ohne CR3.

	BSA*	**m−IgG**	**α−CD11a**	**α−CD11b (BEAR1)**	**α−CD11b (OKM1)**	**α−CD11b (ICRF44)**	**α−CD18**
MW	0,148	1,252	1,470	1,591	1,344	1,348	1,348
S_D	0,046	0,380	0,216	0,292	0,012	0,005	0,01
p	0,0031		0,7356	0,9121	0,1453	0,9121	0,5948

Diese Versuche zeigen, daß Elastase und Cathepsin G an den CD11b/CD18−Komplex binden. Im Falle der HNE kann die Bindung durch Antikörper gegen CD11b nicht jedoch gegen CD18 reduziert werden. Dies bestätigt die Ergebnisse der Inhibitionsstu−dien mit Antikörpern gegen CD11b (3.1.2.1) und C3bi−Peptiden (3.1.2.2). Die Bindung von Cathepsin G kann mit keinem der zur Verfügung stehenden Antikörper inhibiert werden. Dies läßt vermuten, daß Elastase und Cathepsin G nicht exakt an die gleiche Stelle auf CD11b binden. Es ist jedoch denkbar, daß sich ihre Bindungsstellen überlap−pen, da sie gegenseitig kompetitiv um die Bindungsstelle konkurrieren (3.1.2.3).

3.3 Elastase läßt sich mit CD11a und CD11b von der Zellmembran stimulierter PMN isolieren

Die Bindungsstellen exogener Elastase wurden mittels der Bindungsstudien charakteri−siert. Um zu klären, ob endogene Elastase an den gleichen Liganden bindet, wurden PMN in Gegenwart des homobifunktionellen Quervernetzer DSP mit TNF−α und fMLP stimuliert. Dieses Protokoll wurde zur maximalen Expression von HNE auf der Zelloberfläche beschrieben [Owen 1995a]. Die aus der Lyse mit Triton X−100 gewon−nenen Membranproteine wurden mit Protein A−Sepharose präabsorbiert. Die Mem−branextrakte wurden auf immobilisierte Antikörper gegen CD11a und CD11b aufgetra−gen und gebundene Proteine eluiert. Der Nachweis eluierter Proteine erfolgte mittels Western blot mit Antikörpern gegen HNE vom Schaf.

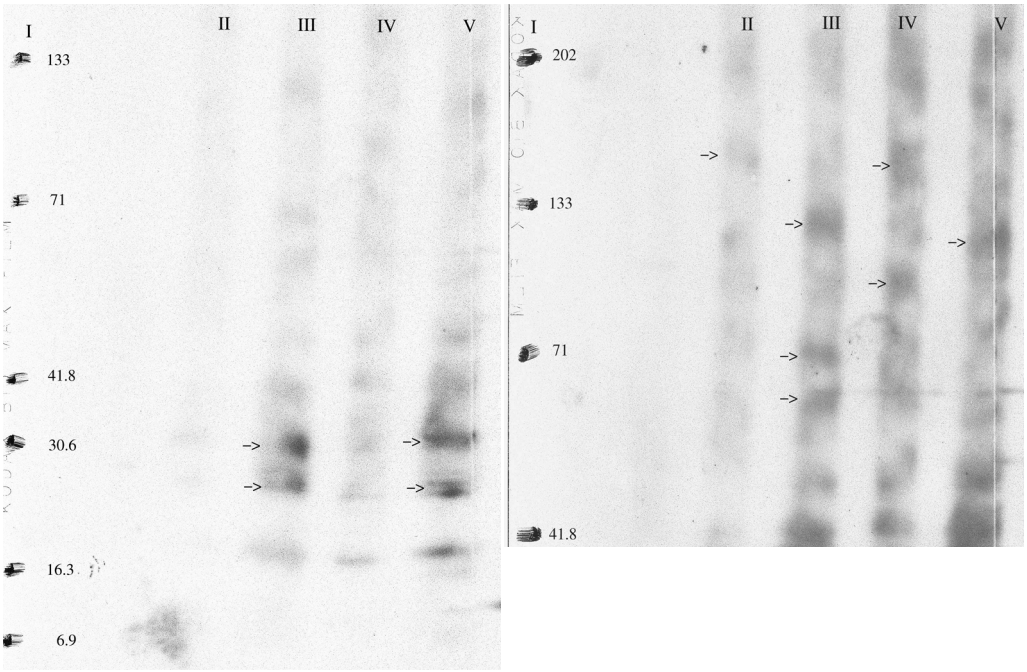


Abb. 26: Western−blot der präzipitierten Proteine mit Schaf α−HNE. Die Abbildungen zeigen unterschiedlich lange Exponationen der Filme. Die Elastasebanden zwischen 25 und 30 kD treten schon nach kurzer Exponation des Films auf (linke Abb.). Die Banden der HNE im Komplex mit CD11a (II und III) bzw. CD11b (IV und V) kommen erst nach 5 min Exposition zum Vorschein (rechte Abb). In Reihe I ist der Molekulargewichtsmarker zu sehen.

Es sind Banden bei 150 und 110 kD (Abb. 26 rechts, Reihe II und IV) zu sehen. Durch Spaltung der Disulfidbrücken des Quervernetzers mit ß−Mercaptoethanol (ß−ME) ver−schwinden diese und es treten Banden bei 120 kD, 70 kD, 65 kD und 25 − 30 kD auf (Reihe III und V). Dies zeigt, daß HNE sowohl mit CD11a wie auch mit CD11b auf der Membran stimulierter PMN assoziiert ist. Bereits nach kurzer Exponation der Filme treten die Elastasebanden der ß−ME−behandelten Proben zwischen 27 kD und 30 kD auf (Abb. 26 links, Reihe III und V). Proben die nicht mit ß−ME behandelt wurden zei−gen auch nach längerer Exponation der Filme nur schwache Banden freier Elastase.

3.4 Einfluß der Serinproteasen auf die Zahl der Bindungsstellen auf stimulierten PMN

Oberflächengebundene Serinproteasen sind katalytisch aktiv. Es besteht nun die Möglichkeit, daß die Bindungsstellen CD11a, CD11b und CD11c, bzw. das assoziierte CD18−Protein von den Enzymen angegriffen werden. Der Einfluß von Serinproteasen auf die Expression von Oberflächenproteinen wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Dazu wurden PMN in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Proteaseinhibitoren mit TNF−α und fMLP stimuliert. Diese Zellen wurden anschließend mit Schafantikörpern gegen Elastase bzw. Cathepsin G und mit monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenproteine (CD11a, CD11b, CD11c, CD16, CD18, CD32, CD35, CD43, CD45 oder CD64) gefärbt. In den Tabellen 24 + 25 sind die mittleren Fluoreszenzen, sowie die relative Anzahl positiv markierter Zellen verschiedener Spender dargestellt.

Im FACS sind für Elastase und Cathepsin G auf den stimulierten Granulozyten nur schwache Signale zu erkennen. Dies ist vermutlich durch die Versuchsanordung bedingt, da in der IIF (siehe 3.5) mit den selben Antikköpern eine starke Fluoreszenz auf der Zelloberfläche gefunden wird. Auch die Untersuchung des Umsatzes spezifischer Substrate zeigt eine starke Oberflächenexpression der Enzyme auf stimulierten PMN [Owen 1995a, Morcos 1998]. Es können in der Durchflußzytometrie jedoch ausschließlich mit den verwendeten Antiköpern Ergebnisse gewonnen werden. In Vorversuchen wurden eine Reihe kommerzieller, sowie von der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. M. Kramer (Institut für Immunologie und Serologie, Universität Heidelberg) hergestellten monoklonale Antikörper ausgetestet. Unter den beschriebenen Bedingungen bindet keiner dieser Antikörper an die Zelloberfläche stimulierter PMN. Ein weiteres Problem stellt eine geringe Aktivierung, bedingt durch die Isolation der Zellen, dar. Dadurch kann auch auf nicht stimulierten Zellen Elastase in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden.

In Abb. 27 ist exemplarisch das Ergebnis der durchflußzytometrischen Analyse mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenantigene der PMN dargestellt. Bei einigen Spendern zeigt sich, daß stimulierte PMN Maus IgG binden (Abb. 26A). Dies läßt sich durch die erhöhte Expression des hoch affinen Fcγ−Rezeptors CD64 erklären. Abb. 27B − F zeigt, daß die Zellstimulation mit TNF−α und fMLP nur geringen Einfluß auf die Expression der ß$_2$−Integrine hat. CD11b/CD18 werden aus intrazellulären Vesikeln auf

die Oberfläche gebracht (Abb. 27C). In Gegenwart der Proteasehemmer zeigt nur CD18 eine leicht erhöhte Intensität der Fluoreszenz. Das vom verwendeten Antikörper erkannte Epitop könnte somit einem proteolytischen Angriff ausgesetzt sein. CD11c zeigt im Falle des Spenders 6 eine leichte Sensitivität für proteolytische Spaltung, CD11a wird auf stimulierten PMN, unabhängig von den Serinproteasen, herabreguliert (Abb. 27B). Auch der Komplementrezeptor 1 (CD35) wird durch die Serinproteasen nicht beeinflußt.

Die Zahl der Fcγ–Rezeptoren III (CD16) nimmt leicht ab, wohingegen es zu einem starken Verlust an Fcγ–Rezeptor II (CD32) kommt (Abb. 27E +F). In Gegenwart der Proteasehemmer kann dieser Effekt nur im Falle von CD16 teilweise aufgehoben wer–den, CD32 wird demnach nicht von Serinproteasen von der Zelloberfläche herabregu–liert. Fcγ–Rezeptor I (CD64) wird nicht von ruhenden PMN exprimiert. Die Zahl an CD64–Molekülen auf stimulierten PMN ist leicht erhöht, die Zugabe der Proteasehem–mer hat keine Auswirkung auf die CD64–Expression.

Wie bereits von Rieu et al. beschrieben wird CD43, ein stark negativ geladenes Mole–kül, bei der Zellstimulation von der Zelloberfläche herabreguliert [Rieu 1992]. Dieser Effekt kann partiell durch Proteasehemmer blockiert werden. CD45, das gemeinsame Leukozytenantigen, wird durch die Stimulation der PMN nicht verändert.

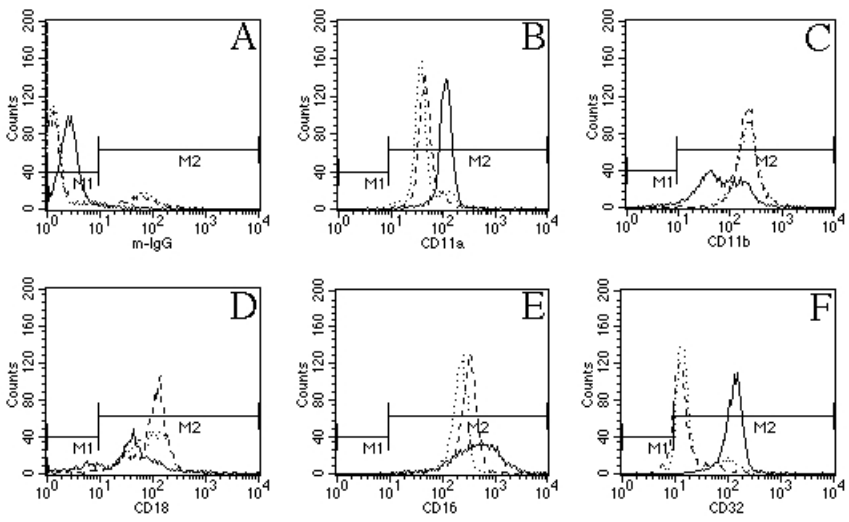


Abb. 27: Nicht stimulierte PMN (durchgezogene Linie), PMN stimuliert in Gegenwart von Proteaseinhibitoren (gestrichelte Linie), sowie ohne Proteaseinhibitoren (gepunktete Linie) wurden mit Antikörpern gegen CD11a (B), CD11b (C), CD18 (D), CD16 (E), CD32 (F) sowie der IgG–Kontrolle (A) im FACS gefärbt.

Tabelle 24: Die Expression von Oberflächenproteinen auf stimulierten PMN (Spender 4) wurde in Abhängigkeit der katalytischen Aktivität endogener Elastase durchflußzytometrisch bestimmt. Dazu wurden die PMN in Abwesenheit oder Gegenwart eines Proteaseinhibitormixes mit TNF−α und fMLP stimuliert.

Antikörper	**PMN**	**positive Zellen [%]**	**mittlere Fluoreszenz**
Schaf IgG	nicht stimuliert	5,0	123,7
	stimuliert	2,1	154,4
	stimuliert + Inhibitormix	2,1	115,6
HNE	nicht stimuliert	6,1	178,7
	stimuliert	12,0	541,8
	stimuliert + Inhibitormix	13,8	236,0
Cathepsin G	nicht stimuliert	2,2	97,9
	stimuliert	10,2	318,5
	stimuliert + Inhibitormix	9,3	170,4
Maus IgG	nicht stimuliert	1,2	26,5
	stimuliert	17,5	67,9
	stimuliert + Inhibitormix	16,5	83,5
CD11b	nicht stimuliert	98,3	90,3
(BEAR1)	stimuliert	100,0	219,9
	stimuliert + Inhibitormix	100,0	200,6
CD35	nicht stimuliert	99,1	55,4
	stimuliert	99,9	71,4
	stimuliert + Inhibitormix	99,9	71,4
CD43	nicht stimuliert	99,8	110,3
	stimuliert	99,8	67,9
	stimuliert + Inhibitormix	99,8	167,0

Tabelle 25: Die Expression von Oberflächenproteinen auf stimulierten PMN (Spender 6 + 7) wurde in Abhängigkeit der katalytischen Aktivität endogener Elastase durchflußzytometrisch bestimmt. Dazu wurden die PMN in Abwesenheit oder Gegenwart eines Proteaseinhibitormixes mit TNF−α und fMLP stimuliert.

Antikörper	**PMN**	**Spender 6**		**Spender 7**	
		positive Zellen [%]	mittlere Fluoreszenz	positive Zellen [%]	mittlere Fluoreszenz
Schaf IgG	nicht stimuliert	3,1	30,9	8,9	253,1
	stimuliert	3,7	109,5	6,3	101,4
	stimuliert + Inhibitormix	6,5	88,5	1,5	501,6
HNE	nicht stimuliert	1,8	98,1	9,9	151,0
	stimuliert	5,4	332.9	36,6	45,9
	stimuliert + Inhibitormix	7,3	290,2	3,3	165,4
Cathepsin G	nicht stimuliert	2,5	52,7	8,5	574,2
	stimuliert	1,8	93,7	6,3	122,7
	stimuliert + Inhibitormix	5,8	222,0	4,1	148,7
Maus IgG	nicht stimuliert	2,9	118,4	5,8	111,3
	stimuliert	9,9	49,7	3,8	56,5
	stimuliert + Inhibitormix	14,2	52,3	3,0	72,5
CD11a	nicht stimuliert	100,0	112,6	91,2	33,6
	stimuliert	99,8	50,6	83,1	27,5
	stimuliert + Inhibitormix	98,6	50,1	84,4	38,8
CD11b (BEAR1)	nicht stimuliert	99,7	605,9	97,5	168,3
	stimuliert	100,0	561,5	97,6	353,2
	stimuliert + Inhibitormix	100,0	681,7	98,7	297,8
CD11c	nicht stimuliert	99,9	72,3	64,3	30,5
	stimuliert	99,0	40,9	88,4	33,2
	stimuliert + Inhibitormix	99,5	54,3	80,6	35,3
CD18	nicht stimuliert	100,0	48,7	93,5	60,2
	stimuliert	99,0	66,7	98,6	95,5
	stimuliert + Inhibitormix	99,8	316,6	99,1	113,8
CD16	nicht stimuliert	100,0	603,7	95,3	632,5
	stimuliert	100,0	216,1	97,6	241,3
	stimuliert + Inhibitormix	100,0	322,1	97,8	527,1
CD32	nicht stimuliert	100,0	128,6		
	stimuliert	47,8	24,7		
	stimuliert + Inhibitormix	68,9	32,5		
CD64	nicht stimuliert	24,4	28,9	8,8	176,1
	stimuliert	23,8	44,0	96,4	81,1
	stimuliert + Inhibitormix	31,3	57,0	4,6	187,8

Antikörper	PMN	Spender 6		Spender 7	
CD43	nicht stimuliert	100,0	383,4	96,6	668,6
	stimuliert	99,9	573,8	97,6	145,9
	stimuliert + Inhibitormix	100,0	384,6	96,2	241,3
CD45	nicht stimuliert	100,0	514,3	98,7	190,8
	stimuliert	100,0	306,1	98,5	189,7
	stimuliert + Inhibitormix	100,0	354,5	98,4	190,3
CD11b (OKM1)	nicht stimuliert	3,0	76,3	6,9	108,8
	stimuliert	18,2	59,3	21,3	44,7
	stimuliert + Inhibitormix	22,7	103,8	84,3	35,5
CD11b (ICRF44)	nicht stimuliert			91,8	171,4
	stimuliert			92,5	203,1
	stimuliert + Inhibitormix			94,1	182,4

Diese Daten zeigen, daß die oberflächengebundene Elastase ihre Bindungsstellen auf der Zelloberfläche nicht angreift. Die Expression der CD11a, CD11b und CD11c–Moleküle wird durch Elastase nicht beeinflußt. Im Falle des CD11b konnte dies mit unterschiedlichen Antikörpen, die an verschiedene Epitope binden am besten verdeutlicht werden. Im Falle der mit CD11 assoziierten ß–Kette CD18 ist, in Abhängigkeit der Spender, in Gegenwart der Proteasehemmer eine verstärkte Oberflächenbindung zu erkennen.

3.5 Kolokalisation von Elastase und CD11b auf stimulierten PMN

Die Methode der indirekten Immunfluoerszenz (IIF) wurde angewandt um eine Kolokalisation von Elastase und CD11 auf der Zelloberfläche stimulierter PMN darzustellen. PMN wurden mit Schaf α–HNE, Mausantikörpern gegen Oberflächenantigene der PMN (CD11a, CD11b, CD11c, CD16, CD18, CD32, CD35, CD43 und CD64) sowie Kaninchen α–Cathepsin G gefärbt. Als sekundäre Antikörper fungierten Alexa 488 α–Schaf, TexasRed α–Maus und Cy5 α–Kaninchen. In Abb. 28 sind Fluoreszenzaufnahmen mit Elastase (grün), CD11b bzw. CD45 (rot), Cathepsin G (blau), sowie die Überlagerung aus den drei Einzelfluoreszenzen dargestellt.

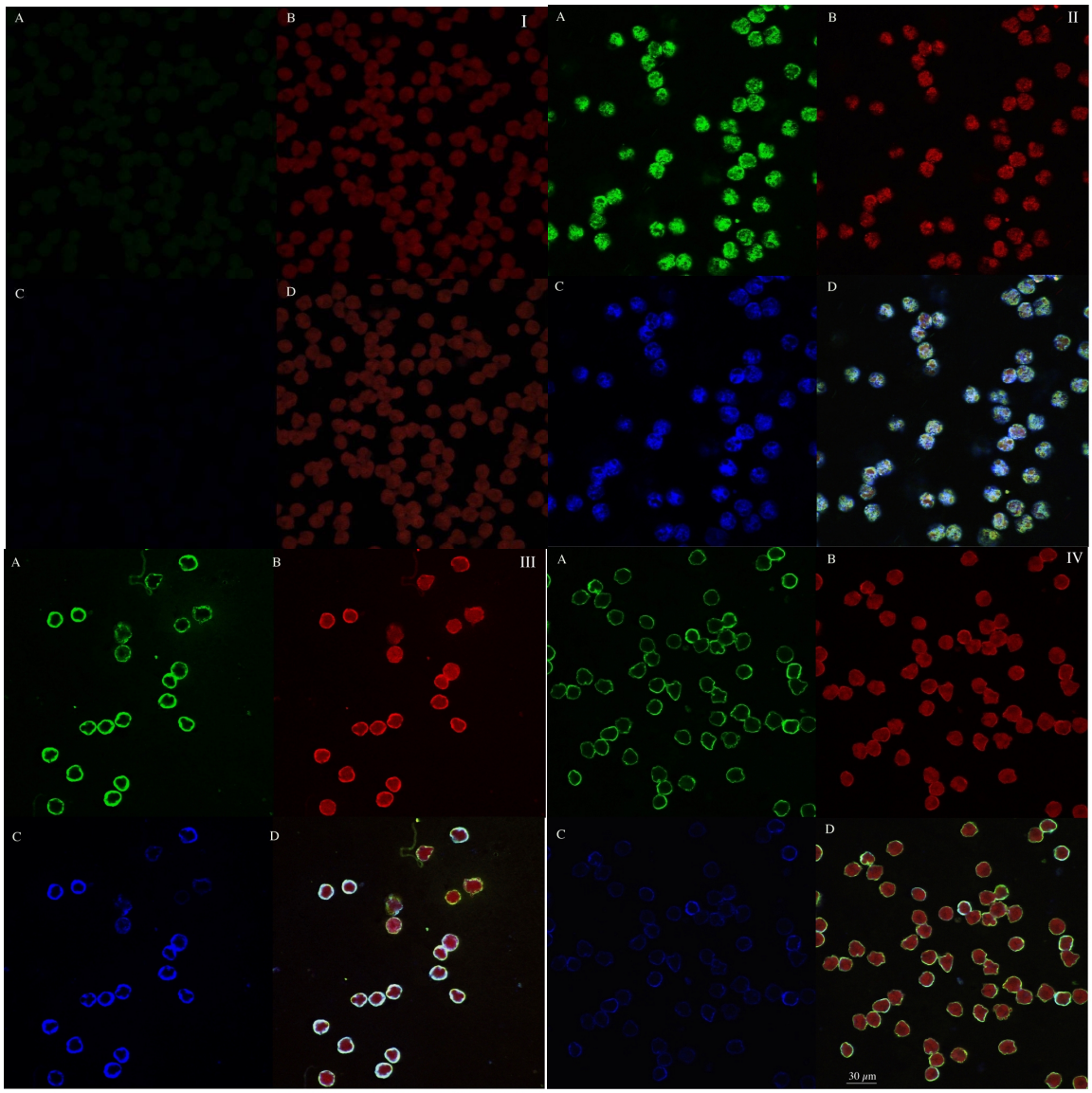


Abb. 28: Indirekte Immunfluoerszenz mit Antikörpern gegen Elastase (A), Cathepsin G (C) und CD11b (II + III) bzw. CD45 (IV) (B). Die Überlagerungen der Fluoreszenzen sind in D dargestellt. Die IgG–Kontrollen sind in I, die Fluoreszenzen nicht stimulierter PMN in II, stimulierter PMN in III + IV dargestellt.

Die Serinproteasen sind in nicht stimulierten Zellen in den intrazellulären Granula lokalisiert (Abb. 28II A + C). Die ß$_2$–Integrine, sind sowohl intrazellulär, als auch auf der Zellmembran (Abb. 28II B) zu finden. Sowohl die ß$_2$–Integrine, wie auch die Serinproteasen sind homogen auf der Oberfläche stimulierter PMN verteilt (Abb. 28III). Eine genaue Unterscheidung zwischen tatsächlicher Kolokalisation und physikalischer Überlappung der Fluoreszenzen nahe beieinander liegender Rezeptoren ist nur schwer möglich, da sich die Fluoreszenzen von HNE und Cathepsin G auch mit den Fluoreszenzen weiterer Oberflächenantigene, wie z. B. CD45 überlagern (Abb. 28IV).

3.6 Oberflächengebundene Elastase erhöht die Bindung von PMN an C3bi–opsonierte Schafserythrozyen

Die Bindung von CR3 an C3bi, stellt eine wichtige Sequenz in der Erkennung opsonierter Mikroorganismen dar. Dieser Vorgang läßt sich durch Adhäsion von PMN an mit C3bi–beladenen Schafserythrozyen darstellen. Die Erythrozyten wurden dazu mit C3bi gekoppelt und mit FITC markiert. PMN wurden 30 min bei 0°C mit 8 nM HNE inkubiert und der Komplementrezeptor 1 (CD35) wurde mit einem monoklonalen Antikörper abgesättigt. Die Erythrozyten wurden im Verhältnis 1:2,25 mit PMN in Gegenwart von Antikörpern gegen CD11b und CD18 bzw. Maus–IgG inkubiert. In Tabelle 26 und 27, sowie Abb. 30 sind die relative Anzahl der FITC– und PE–positiven Zellen dreier Spender dargestellt. Abb. 29 zeigt exemplarisch die Dot–plots eines Spenders.

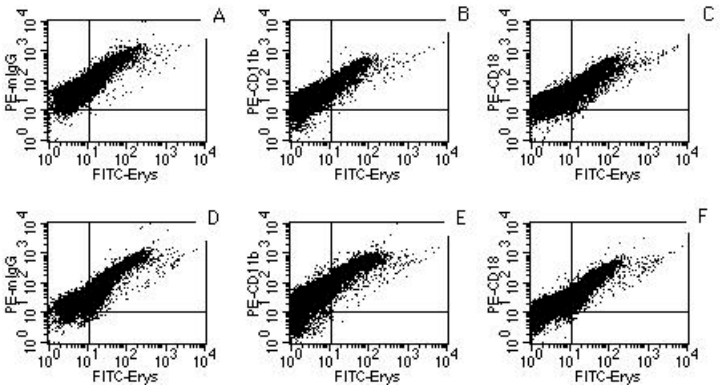


Abb. 29: Rosettingversuch; PMN (Spender 5) ohne HNE (A – C), PMN mit 8 nM HNE vorinkubiert (D – F) wurden mit FITC–markierten, C3bi–beladenen Schafserythrozyten in Gegenwart von Maus IgG (A + D) bzw. Antikörpern gegen CD11b (B + E) bzw. CD18 (C + F) 30 min inkubiert und mit PE–markiertem α–Maus IgG gefärbt. Zellen, die PE– und FITC–positiv sind wurden als Rosetten bezeichnet.

PMN mit oberflächengebundener Elastase zeigen eine signifikant höhere Tendenz an die C3bi–beladenen Erythrozyten zu binden. Antikörper gegen CD11b hemmen die Bindung der PMN an die Erythrozyten in beiden Fällen, wohingegen Antikörper gegen CD18 die CD11b–C3bi–Interaktion nur in geringem Maße (Abb. 30).

.

Tabelle 26: Schafserythrozyten wurden mit C3bi opsoniert und mit FITC markiert. PMN, mit/ohne gebundene exogene HNE, wurden mit den opsonierten Erythrozyten in Gegenwart der angegebenen monoklonalen Antikörper inkubiert, mit PE−gekoppelten α−Maus−IgG gefärbt und durchflußzytome−trisch Untersucht. Die Tabelle gibt die Zahl der FITC− und PE−doppelt positiven Ereignisse aus 20000 gemessenen Ereignisse wider.

		Maus IgG	**CD11b**	**CD18**
Spender 5	**ohne HNE**	41,4%	20,5%	28,5%
	mit HNE	61,3%	20,9%	37,2%
Spender 8	**ohne HNE**	42,9%	43,3%	46,4%
	mit HNE	51,5%	55,5%	42,1%
Spender 9	**ohne HNE**	39,6%	32,8%	20,9%
	mit HNE	53,1%	24,5%	23,6%

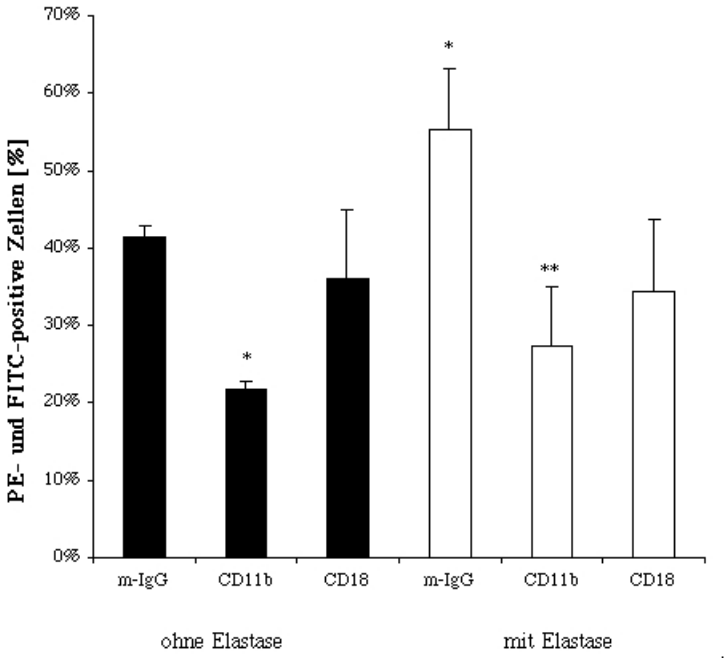


Abb. 30: PMN mit (weise Balken) bzw. ohne (schwarze Balken) oberflächengebundener HNE wurden mit FITC−markierten, C3bi−opsonierten Schafserythrozyen 30 min bei 37°C, in Gegenwart der angegebenen Antikörper inkubiert. Die PMN wurden anschließend mit einem PE−Antikörper gefärbt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte der relative Anzahl der FITC− und PE−positiven Zellen des Spenderpools. $p \leq 0{,}01$ bezüglich *m−IgG ohne HNE bzw. **m−IgG mit HNE.

Tabelle 27: Mittelwerte (MW), Varianzen und Signifikanz (p) im unabhängigen t–Test der relativen Zahl der positiven Ereignisse des Spenderpools. Die Signifikanzen beziehen sich auf PMN ohne HNE–Zugabe und Inkubation in Gegenwart von mIgG *bzw. mit HNE in Gegenwart von m–IgG.

		mIgG	CD11b	CD18
ohne HNE	**MW**	41,3%	21,7%	36,0%
	Varianz	0,0002%	0,0001%	0,0079%
	p		6×10^{-5}	0,3636
mit HNE	**MW**	55,3%	27,3%	34,3%
	Varianz	0,0024%	0,0060%	0,0086%
	p	0,0093	0,0062*	0,0259*

3.7 Die Bindung exogener Elastase auf an PMN induziert eine Konformationsänderung in der I–Domäne von CD11b

Die Elastase–vermittelte erhöhte Affinität der PMN für C3bi lies vermuten, daß die Bindung von HNE an CD11b dessen Konformation ändert, da die Zahl der CD11b–Moleküle durch oberflächengebundene HNE nicht verändert wird (3.4). Von Diamond und Springer wurde ein Antikörper (Klon CBRM1/5) beschrieben [Diamond 1993a], der ein Epitop auf CD11b erkennt, das bei der Stimulation der Zellen exprimiert wird. Um zu ermitteln ob durch die Bindung von HNE an die Zelloberfläche die Expression des aktivierungsabhängigen Epitops induziert wird, wurden PMN mit HNE bzw. Cathepsin G inkubiert (4 nM, 30 min 0°C) und mit dem CD11b–Antikörper CBRM1/5 für die Durchlußzytometrie gefärbt. Als Positivkontrolle dienten PMN die 30 min bei 37°C mit fMLP (100 nM) stimuliert wurden.

In Tabelle 28 sind die Zahl der Zellen die das CBRM1/5–Epitop exprimieren und die relativen Fluoreszenzen verschiedener Spender aufgelistet, in Abb. 31 sind die Histo–gramme eines Spenders dargestellt. Es zeigte sich, daß 25 – 60% der unbehandelten PMN und 34 – 99% der fMLP–stimulierten PMN das aktivierungsabhängige Epitop exprimieren. Dies verdeutlicht, daß die PMN verschiedener Spender unterschiedlich auf die Isolationprozedur und Stimulation reagieren. Etwa 28 – 98% der PMN, die mit Elastase oder Cathepsin G vorbehandelt wurden, exprimieren das CBRM1/5–Epitop. Mit Ausnahme von Spender 7 steigt auch die Zahl der Bindungsstellen für den CBRM1/5–Antikörper auf den mit Proteasen behandelten PMN (Tabelle 26). Cathepsin G zeigte bei allen untersuchten Spendern den stärkeren Effekt.

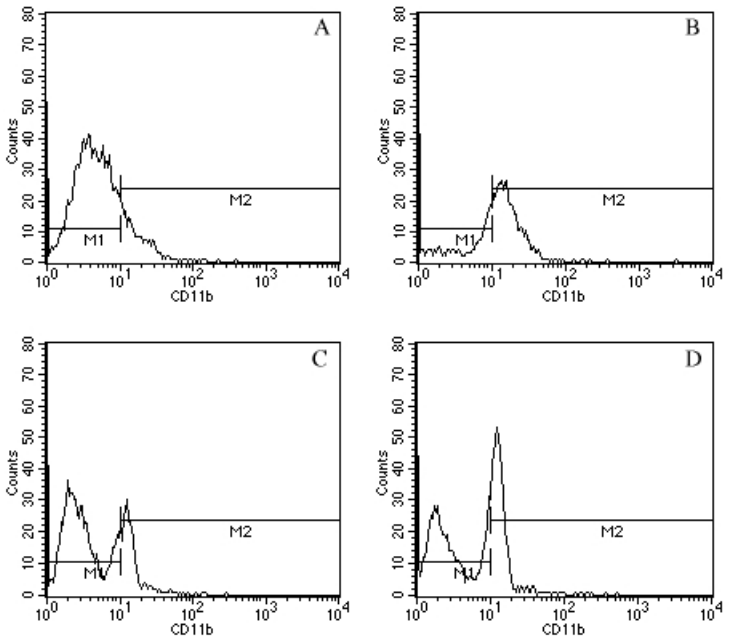


Abb. 31: Durchflußzytometrische Bestimmung der durch Elastase (C) bzw. Cathepsin G (D) induzierten Expression des aktivierungsabhängigen Epitops in der CD11b I–Domäne im Vergleich zu ruhenden (A) bzw. fMLP–stimulierten (B) PMN.

Tabelle 28: PMN wurden 30 min mit 8 nM HNE bzw. CG inkubiert und die Expression des aktivierungsabhängigen CD11b–Epitops mittels des Antikörpers CBRM1/5 in der Durchflußzytometrie bestimmt. In einem parallenen Ansatz wurden PMN 30 min bei 37°C fMLP (100 nM) stimuliert.

	Spender 2		**Spender 4**		**Spender 7**		**Spender 8**	
	%–pos. Zellen	**mean**	**%–pos. Zellen**	**mean**	**%–pos. Zellen**	**mean**	**%–pos. Zellen**	**mean**
IgG–Kontrolle	1,3	25,4	1,4	19,7	2,7	14,3	1,4	13,1
unbehandelte PMN	59,1	17,4	25,0	21,3	41,1	14,4	24,6	21,7
fMLP	93,1	23,5	34,2	26,6	54,3	17,8	98,9	42,4
HNE	95,4	25,7	74,0	27,3	50,4	16,5	28,4	19,6
Cathepsin G	97,9	27,4	92,3	35,7	72,3	16,9	28,8	25,3

3.8 Auswirkung der Elastasebindung an die Zelloberfläche von PMN auf die Adhäsion an Epithelien und Endothelien

Die CD11b/CD18−vermittelte Adhäsion der Granulozyten ist ein wichtiger Schritt in der Adhäsionskaskade. Der Einfluß von, an CD11b gebundene, Elastase auf die Wechselwirkung mit der CR3−Bindungsstelle auf Epithel− und Endothelzellen wurde untersucht. Dazu wurden konfluente Monolayer aus Epithelzellen (A549), bzw. Endothelzellen (HUVEC) mit INF−γ bzw. IL−1ß stimuliert, was die Expression von ICAM−1 (CD54) auf den Endothelzellen (Morzycki 1990) und einen bisher nicht charakterisierten CD11b/CD18−Rezeptor auf den Epithelzellen (Colgan 1993) induziert. PMN wurden mit 8 nM HNE vorinkubiert (30 min auf Eis) und zu den Monolayern gegeben. Nach 30 min bei 37°C wurden nicht adhärente PMN durch waschen mit HBSS entfernt, die Zellen fixiert und adhärente PMN mit einem Kaninchenantikörper im ELISA nachgewiesen.

Aus Tabelle 29 ist ersichtlich, daß an die Zelloberfläche der PMN gebundene Elastase nur geringen Einfluß auf die Adhäsion der PMN an die Epithelzellinie A549 hat; die Werte unterscheiden sich im unabhängigen t−Test nicht signifikant ($p > 0,05$). Die Adhäsion der PMN an HUVEC wird jedoch durch die oberflächengebundene HNE inhibiert (Tabelle 30, Abb. 32).

Tabelle 29 Adhäsion von PMN an INF−γ stimulierte (100 U/ml, 72 h) A549−Monolayer in Abhängigkeit oberflächengebundener HNE, Mittelwerte (MW), Varianz und Signifikanz (p) im unabhängigen t−Test aus 3 Meßwerten.

Spender	ohne Elastase		mit Elastase		
	MW	Varianz	MW	Varianz	P
4	0,335	0,0022	0,301	0,0012	0,3665
9	0,602	0,0031	0,456	0,0163	0,1446

Tabelle 30: Adhäsion von PMN an IL−1ß stimulierte (10 U/ml, 4 h) HUVEC−Monolayer in Abhängigkeit oberflächengebundener HNE, Mittelwerte (MW), Varianz und Signifikanz (p) im unabhängigen t−Test aus 3 Meßwerten.

Spender	ohne Elastase		mit Elastase		
	MW	Varianz	MW	Varianz	p
2	0,217	0,00094	0,064	0,00162	0,00635
3	0,346	0,00143	0,154	0,00081	0,00216
4	0,950	0,00109	0,726	0,00236	0,00274
9	1,324	0,02908	0,330	0,00011	0,00054

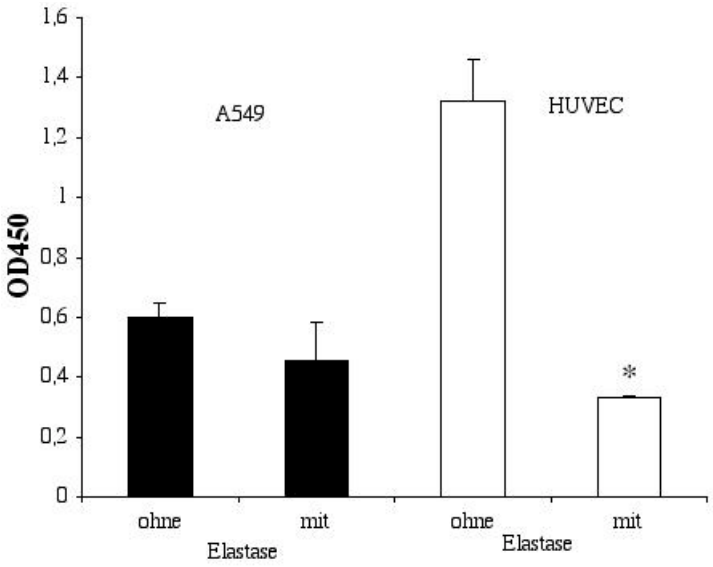


Abb. 32: Adhäsion von PMN (Spender 9) an INF−γ stimulierte A549−Epithelzellen (schwarze Balken) bzw. IL−1ß stimulierte HUVEC (weiße Balken). PMN mit bzw. ohne gebundene HNE wurden 30 min auf Monolayer aus Epithel− bzw. Endothelzellkulturen gegeben und anschließend im ELISA mit einem Kaninchenantikörper gegen humane PMN nachgewiesen. (* $p < 0,01$).

4 Zusammenfassende Diskussion

Auf neutrophilen Granulozyten (PMN) von Patienten mit necrotisierenden Vasculitiden, wie der Wegener´schen Granulomatose, lassen sich die Serinproteasen Elastase (HNE) und Proteinase 3 (PR3) auch auf der Zelloberfläche nachweisen. In vitro Studien zeigten, daß PMN gesunder Spender nach Stimulation mit Zytokinen wie TNF–α Elastase, PR3 und Cathepsin G (CG), in katalytisch aktiver Form, auf der Zelloberfläche exprimieren [Owen 1995a, Morcos 1998]. Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Bindungsstelle für Elastase auf der Zelloberfläche, sowie die Auswirkungen der Oberflächenbindung auf Funktionen der Granulozyten zu beschreiben.

In kompetitiven Bindungsstudien mit ^{125}I–markierter Elastase wurde die Zahl der Bindungsstellen/Zelle bestimmt. Die Versuche wurden alle auf Eis durchgeführt um zum einen eine Exozytose der PMN–Granula weitgehend zu unterdrücken und zum anderen die katalytische Aktivität der Elastase herabzusetzen. Dies sollte Veränderungen der Zelloberfläche durch die PMN selbst bzw. durch Elastase vermeiden. Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung von Elastase an die Zelloberfläche von Granulozyten, sowie den promyeloblastischen Vorläuferzellinien U937 und HL60 spezifisch und sättigbar ist, was auf einen spezifischen Rezeptor hinweist. Die Zahl der Bindungsstellen/Zelle konnte auf 35000 – 110000 auf PMN, 185000 auf U937 und 40600 auf HL60 bestimmt werden. Die Bindung der Elastase an PMN ist sehr stabil. Dies steht in Übereinstimmung mit der Literatur, wo beschrieben ist, daß unter physiologischen Bedingungen die Bindung exogener Elastase an humane Fibroblasten irreversibel ist [Campbell 1987]. Owen et al. konnten auf fixierten PMN zeigen, daß sich oberflächengebundene Elastase erst bei hohen Salzkonzentrationen (1 M NaCl) vom Oberflächenrezeptor löst, was die Autoren auf eine elektrostatische Wechselwirkung mit dem Rezeptor vermuten läßt [Owen 1997]. Auch die ungewöhnlich hohe Zahl an Bindungsstellen steht in Einklang mit den Daten aus der Literatur. Die Bindungsstellen für radioaktiv markierte, exogene HNE auf Fibroblasten konnten auf 180000/Zelle [Campbell 1987] bestimmt werden. Die Zahl der Bindungsstellen für endogene HNE auf stimulierten PMN konnte per Substratumsatz auf 2 x10^7/Zelle bestimmt werden [Owen 1995a]. Diese Zahl liegt also um eine Zehnerpotenz höher als die hier ermittelte Zahl der Bindungsstellen für exogene Elastase. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß bei der Isolation der PMN eine schwache Zellstimulation zu beobachten ist, die in der Oberflächenexpression gerin–

ger Mengen Elastase resultiert wodurch die Bindungsstellen für exogene Elastase teil−weise blockiert sind.

Zur näheren Bestimmung der Bindungsstellen für HNE wurde versucht, die Bindung mit kommerziellen monoklonalen Antikörper gegen Oberflächenproteine der PMN zu hemmen. Die Inhibitionsstudien mit Antikörpern wiesen die α−Ketten CD11a, CD11b und CD11c der $ß_2$−Intergrine als Bindungsstellen für HNE auf der Zelloberfläche aus, wobei die Antikörper gegen CD11b den stärksten hemmenden Effekt zeigten. Dies ist eventuell darauf zurückzuführen, daß CD11b auf PMN das am stärksten exprimierte $ß_2$ −Integrin ist. Antikörper gegen die mit CD11a/b/c assoziierte ß−Kette CD18 konnten die Bindung exogener Elastase nicht reduzieren. Diese heterodimeren Proteinklompexe sind an einer Vielzahl der Wechselwirkungen der PMN mit extrazellulären Matrixpro−teinen und anderen Zellen beteiligt. Die Integrine können dabei die unterschiedlichsten Strukturen als Liganden erkennen. Bei einigen Spendern hemmen auch Antikörper ge−gen das stark negativ geladene Leukosialin CD43 die Bindung exogener Elastase. Die Spaltung von CD43 durch exogene [Remold−O´Donnel 1995a] und endogene [Rieu 1992, Remold−O´Donnel 1994] HNE ist in der Literatur bekannt. CD43 hat mehrere O−gebundene glycosylierte und sialylierte Seitenketten, die etwa 60% der Molekül−masse ausmachen. So ist es möglich, daß Elastase mit seiner positiv geladenen Protein−oberfläche mit den negativ geladenen Sialylresten von CD43 interagiert und somit erst in die notwendige räumliche Nähe des Peptidgrundgerüsts kommt um Peptidbindungen in CD43 zu spalten. Die enzymatische Desialylierung von PMN verringert die Sensiti−vität exogener HNE für CD43 [Remold−O´Donnel 1995a]. Bei den hier angewandten Versuchsbedingungen (0°C) ist die katalytische Aktivität der HNE stark herabgesetzt, so daß CD43 wie eine potentielle Bindungsstelle erscheint.
Die weit verbreitete Sequenz RGD bindet an die CD11−Moleküle [Wright 1987]. Um zu zeigen, daß HNE an CD11 bindet wurden die Liganden RGDS, bzw. ein die RGD−Sequenz enhaltendes Peptid aus dem natürlichen CD11b−Liganden C3bi eingesetzt um die Bindung exogener HNE zu inhibieren. So konnte gezeigt werden, daß die Bindung−stelle für HNE auf den PMN tatsächlich die CD11−Molküle darstellen. Die durch das Tetrapeptid RGDS stark reduzierte HNE−Bindung läßt vermuten, daß HNE an die selbe Region auf CD11b bindet, die bisher noch nicht genau lokalisiert ist.

Es stellte sich nun die Frage nach der Art der Bindung an die Bindungsstelle. Viele Liganden der CD11−Moleküle sind auf die Anwesenheit zweiwertiger Kationen (Ca^{2+}, Mg^{2+} und/oder Mn^{2+}) zur Bindung angewiesen. Dabei bilden die Metallionen einen Komplex mit dem CD11−Molekül und dem Liganden. Auch die Bindung der Elastase an PMN zeigt eine starke Abhängigkeit von zweiwertigen Kationen, vornehmlich Ca^{2+}. In Gegenwart des Calciumchelators EDTA oder in Puffer ohne zweiwertige Kationen bindet kaum HNE an die Zelloberfläche der PMN. Die Zugabe von Ca^{2+}, Mg^{2+} bzw. Mn^{2+}, in Konzentrationen die den physiologischen Umgebungen entsprechen, steigert die Zahl der gebundenen Elastasemoleküle. Aus den Versuchen mit nur einem zweiwertigen Kation und mit Kombinationen der Ionen zeigte sich, daß Ca^{2+} den stärksten positiven Effekt auf die Bindung der Elastase hat. Dies legt die Vermutung nahe, daß Elastase in der Region der EF−Hand Strukturen oder der metallionenabhängige Adhäsions−Struktur (MIDAS) [Altieri 1991, Dransfield 1992b, Griggs 1998] in der I−Domäne an CD11 bindet.

Die Bindung exogener Elastase ist abhängig von der katalytischen Aktivität des Enzyms. Hitzeinaktivierte HNE ist nicht in der Lage, die Bindung katalytisch aktiver HNE zu inhibieren. Dies könnte ein Effekt sein der auf der Denaturierung des Proteins beim Erhitzen beruht. Deshalb wurde die Seitenkette der für die katalytische Aktivität verantwortliche Aminosäure $Serin^{173}$ kovalent mit PMSF blockiert. Eine solche Inhibition führt zu keinen großen räumlichen Veränderungen der Molekülstruktur. Es zeigte sich, daß PMSF−inhibierte HNE nicht mehr in der Lage ist, an die Oberfläche von PMN zu binden. Dies konnte auch für die in der Literatur beschriebenen Bindung von HNE an Fibroblasten gezeigt werden [Campbell 1987]. Elastase, deren katalytisch aktiver Serinrest mit Diisopropylfluorophosphat kovalent blockiert wurde war nicht mehr in der Lage an die Zelloberfläche zu binden. Auch die Bindung von Cathepsin G an PMN ist Abhängig von der katalytischen Aktivität des Enzyms [Renesto 1996].

Die Serinproteasen der PMN zeigen untereinander eine hohe Homologie. So stellte sich die Frage ob Cathepsin G, PR3 und die ebenfalls homologe Pancreaselastase vom Schwein (PPE) in der Lage sind die Bindung von HNE an PMN zu inhibieren oder ob diese an eine andere Bindungsstelle binden. Präinkubation der PMN sowohl mit Cathepsin G, als auch mit PR3 oder PPE führte zu einer Hemmung der Elastasebindung. Dies läßt vemuten, daß die neutrophilen Serinproteasen alle an den gleichen Rezeptor

auf der Zelloberfläche binden. Campbell et al. konnten demonstrieren, daß die Serinproteasen PPE, Cathepsin G, Trypsin und Chymotrypsin kompetitiv mit HNE um die Bindungsstelle auf humanen Fibroblasten konkurrieren [Campbell 1987].

Die Ergebnisse der Inhibitionsstudien konnten mit der spezifischen Bindung von HNE und Cathepsin G an den isolierten CD11b/CD18−Komplex bestätigt werden. Die HNE−Bindung an den isolierten Rezeptor kann mit Antikörper gegen CD11b inhibiert werden. Die verwendeten Antikörper waren jedoch nicht in der Lage die Cathepsin G−Bindung zu hemmen. Dies legt die Vermutung nahe, daßCathepsin G und Elastase an unterschiedlich Epitope auf CD11b binden, diese Epitope sich jedoch teilweise überlappen, da die Serinproteasen gegenseitig um die Bindung an CD11b konkurrieren. Diese direkte molekulare Interaktion von HNE und CD11b zeigt, daß die Antikörper gegen CD11a und CD11b die HNE−Bindung an die PMN nicht aufgrund sterischer Hinderung unterdrücken. Die Präzipitationsstudien verdeutlichen, daß sowohl exogene als auch endogene Elastase an den gleichen Rezeptor auf der Zelloberfläche binden. HNE kann mit Antikörpern gegen CD11a und CD11b von der Zellmembran stimulierter PMN co−präzipitiert werden.

In der indirekten Immunfluoreszenz sollte die Bindung der Elastase und Cathepsin G an CD11b auf stimulierten PMN dargestellt werden. Dazu wurden Dreifachfärbungen mit unterschiedlichen Antikörpern angefertigt um HNE, Cathepsin G und unterschiedliche Oberflächenmolküle gleichzeitig darzustellen. Es zeigte sich eine homogene Verteilung von Elastase und Cathepsin G auf der Zelloberfläche stimulierter PMN, die sich mit den Fluoreszenzen der $ß_2$−Integrine überlappen. Die Kolokalisation mit CD11 konnte mit dieser Methode jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die homogene Verteilung der Proteasen auf der Zelloberfläche brachte die Molküle auch in die räumliche Nähe weiterer Oberflächenproteine wie CD45 oder CD16, was sich auch in einer Überlappung der Fluoreszenzsignale dieser Proteine zeigte.

Die Serinproteasen auf der Zelloberfläche stimulierter Zellen sind katalytisch aktiv [Owen 1995a, Morcos 1998]. In der Literatur sind etliche Beispiele beschrieben, in denen oberflächengebundene Serinproteasen eine Vielzahl an Molekülen spalten [Maison 1991, Laouar 1993, Owen 1998]. Die katalytische Aktivität bleibt auch in der Gegenwart des Inhibitors α_1−Proteaseinhibitor, der in großen Mengen im Plasma vorkommt

erhalten. Es stellt sich nun die Frage wie sich die Oberflächenbindung der HNE auf die Bindungsstellen auswirkt. Dazu wurden PMN zur Oberflächenexpression der Serinproteasen stimuliert [Owen 1995a] und die Aktivität der oberflächengebundenen HNE inhibiert. In der Durchflußzytometrie mit unterschiedlichen Antikörpern gegen die einzelnen Ketten der $ß_2$–Integrine CD11a, CD11b, CD11c und CD18 wurde deren Expression im Vergleich zu unstimulierten PMN und im Vergleich zu stimulierten PMN mit katalytisch aktiven Serinproteasen auf der Zelloberfläche untersucht.

Die durchflußzytometrische Analyse zeigte, daß auf stimulierten PMN die exprimierten Serinproteasen keinen oder nur geringen Einfluß auf die $ß_2$–Integrine haben. Der CD11b/CD18–Komplex wird aus intrazellulären Vesikeln auf die Zelloberfläche gebracht, was sich in einer erhöhten Expression zeigt. Die Zellstimulation in Gegenwart von Proteasehemmern führt zu einer quantitativ vergleichbaren Regulation der CD11b/CD18–Proteine auf die Zelloberfläche. Die Expression von CD11a und CD11c auf stimulierten PMN ist leicht reduziert. Im Falle eines Spenders weist CD11a eine leichte Sensitivität für proteolytische Spaltung auf.

Zur Kontrolle des Versuchsaufbaus wurden eine Reihe weiterer Oberflächenproteine getestet. Der hoch affine Fcγ–Rezeptor I (CD64) wird nicht auf ruhenden PMN exprimiert. Stimulation bewirkt eine schwache Expression auf der Zellmembran, aus den sekretorischen Vesikeln. Inhibition der Serinproteasen hat weder einen Einfluß auf CD64, noch auf CD32 (FcγR II) der bei der Zellstimulation vollständig von den Zellen verloren geht. Der Verlust an FcγR III (CD16) kann durch Inhibition der Serinproteasen partiell aufgehoben werden. Dies steht in Einklang mit der Untersuchung des Einfluß exogener Elastase auf die Fcγ–Rezeptoren auf PMN [Tosi 1988], die zeigten, daß CD16 nicht jedoch CD32 proteolytisch abgespalten wird.

Leukosialin (CD43) ein voluminöses, stark negativ geladenes Transmembranprotein auf beinahe allen Leukozyten, zeigt eine hohe Sensitivität für HNE. CD43 wird sowohl von exogener, als auch endogener HNE gespalten, wobei etwa 40% der distalen Sialomucinregion entfernt werden [Remond–O´Donell 1995a, Remond–O´Donell 1994]. Der Verlust an CD43 bei der Zellstimulation geht mit der Hochregulation von CD11b einher [Rieu 1992, Bazil 1993]. CD43 ragt etwa 45 nm aus der Zellmembran heraus, weshalb man eine regulatorische Funktion von Zell–Zell–Interaktionen vermutet. Der Verlust an CD43 reduziert die negative Oberflächenladung der Leukozyten und ermöglicht somit Zell–Zell–Kontakte, wie z. B. die homotypische Adhäsion [Rieu 1992]. Auch die Fähigkeit stimulierter PMN zur Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten geht

mit einem Verlust an CD43 einher [Remond–O´Donell 1995b]. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten der Durchflußzytometrie zeigen ebenfalls eine proteolytische Abspaltung von CD43 auf stimulierten PMN.

CD11b bindet an eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden. Ein wichtiger Ligand stellt das Komplementspaltstück C3bi dar. C3 wird durch Aktivierung der klassischen oder alternativen Komplementkaskade zunächst in C3a und C3b gespalten, C3b wird in einem weiteren Schritt zu C3bi modifiziert, das kovalent an Proteine binden kann. Die Bindung von C3bi an Pathogene erhöht die Fähigkeit der PMN und Monozyten zur Erkennung und Phagozytose der pathogenen Keime.

Der Einfuß von HNE auf die Fähigkeit der PMN an C3bi zu binden wurde mittels der Rosettenbildung mit C3bi gekoppelten Schafserythrozyen untersucht. In der Durchflußzytometrie zeigte sich, daß mit HNE vorbehandelte PMN weitaus mehr C3bi–gekoppelte Schafserythrozyten binden, als nicht vorbehandelte PMN. Dies könnte durch eine Konformationsänderung von CD11b verursacht werden, wobei ein aktivierungsabhängiges Epitop auf der CD11b I–Domäne exprimiert wird. Diamond und Springer konnten mittels eines Antikörpers zeigen, daß die CD11b–ICAM–1 Interaktion stimulierter PMN durch wenige (ca. 20%) CD11b–Moleküle stattfindet, die dieses Epitop exprimieren [Diamond 1993a]. Dieses Epitop liegt in der Nähe der Bindungstelle vieler Liganden, unter anderem für ICAM–1 und C3bi, und wird duch eine Konformationsänderung der I–Domäne zugänglich [Oxvig 1999]. In der Durchflußzytometrie mit HNE bzw. Cathepsin G behandelten PMN konnte gezeigt werden, daß die Bindung der Serinproteasen diese Konformationsänderung in CD11b induzieren. Sowohl die Zahl der PMN die das aktivierungabhängige Epitop exprimieren als auch die Zahl der Bindungsstellen für den Antikörper CBRM1/5 erhöht ist.

Die Bindung löslicher Polysaccharide an die Lektinregion, C–terminal zur I–Domäne in CD11b löst ein Tyrosinkinasen–abhängiges Signal aus, das in der Expression des aktivierungsabhängigen Epitops resultiert [Vetvicka 1996]. Die Bindung der löslichen Polysaccharide, wie z. B. ß–Glucan erhöht die Zytotoxizität von NK–Zellen und PMN gegenüber C3bi–gekoppelten Zielzellen. HNE könnte mit seinen Polysaccharidseitenketten ebenfalls an die Lektinregion binden. Ob die HNE–Bindung an PMN ein Signal in der Zelle auslöst und welcher Art dieses Signal ist muß in weiteren Studien untersucht werden. Lange Zeit wurde der Mechanismus der ANCA–induzierten PMN–Aktivierung als eine Quervernetzung membrangebundener Proteasen mit den Fcγ–Rezeptoren über den Fc–Teil der Antikörper angenommen. Neueste Studien zeigen allerdings,

daß die Kinetik der ANCA−induzierten Zellstimulation von der FcγR−induzierten Stimulation abweicht [Ben−Smith 1999]. So könnte CD11−gebundene Protease als Vermittler einer ANCA−induzierten, Integrin−abhängigen PMN−Stimulation fungieren, was in weiteren Studien zu klären ist.

In einem physiologischeren Modell sollte der Einfluß oberflächengebundener Elastase auf die Wechselwirkung von PMN mit Epithel− bzw. Endothelzellen untersucht werden. Ein wichtiger Schritt der Diapedese ist die Adhäsion der PMN an die Epithel− bzw. Endothelzellen. Dies geschieht im Falle des Endothels hauptsächlich über die Wechselwirkung von CD11b und ICAM−1. Für die PMN−Epithelzellwechselwirkung spielt CD11b eine weniger wichtige Rolle. In den Adhäsionsversuchen zeigte sich, daß Elastase keinen Einfluß auf die Adhäsion an stimulierte Epithelzellen hat. Dies verdeutlicht, daß die Interaktion der PMN mit dem Eptithel nicht nur über CD11b/CD18 stattfindet, sondern auch über CD47, auf den Epithelzellen und den PMN, mit einem bisher nicht näher charakterisierten Liganden [Parkos 1996]. Die Adhäsion der PMN an stimulierte Endothelzellen wird durch die Bindung von HNE an die PMN unterdrückt. Champagne et al. konnten zeigen, daß Elastase ICAM−1 spaltet [Champagne 1998]. So ist es denkbar, daß die oberflächengebundene Elastase ICAM−1 auf den HUVEC angreift und somit die Zelladhäsion unterdrückt. Die Bindung von exogenem Cathepsin G an die Zelloberfläche von PMN unterdrückt die Adhäsion der PMN an HUVEC und Fibrinogen [Renesto 1996], ohne dabei die Expression der CD11b/CD18−Moleküle zu modifizieren. PMN sind auch in der Gegenwart von α_1−PI in der Lage Makromoleküle proteolytisch zu abzubauen. Als Beispiele seien hier der HNE−vermittelte Abbau der von HUVEC produzierten Matrixproteine [Weis 1984], sowie die Spaltung von Fibronektin [Campbell 1982, Liou 1996] durch PMN in Gegenwart von α_1−PI genannt. So ist es möglich, daß die Serinproteasen auf der Zelloberfläche der PMN Adhäsionsliganden auf den HUVEC spalten und somit die Adhäsion der PMN an das Endothel unterdrükken. Eine Blockierung der Bindungsstelle für ICAM−1 auf CD11b ist jedoch ebenfalls in betracht zu ziehen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Bindung der Elastase an die Zelloberfläche, wie sie auf stimulierten Granulozyten zu finden ist, auf einer spezifischen Bindung an CD11a und CD11b beruht. Die Bindung der HNE an die Bindungsstelle bewahrt die katalytische Proteaseaktivität und scheint die katalytische Seite vor den natürlichen Proteasehemmern abzuschirmen. Die Elastasebindung führt nicht zu einer

proteolytischen Veränderung der Bindungsstelle, es wird jedoch eine Konformationsänderung im CD11b–Molekül induziert, was sich in der Expression des aktivierungsabhängigen Epitops zeigt. Dies führt zu einer vermehrten Erkennung von mit C3bi opsonierten Partikeln. Elastase auf der Zelloberfläche der PMN unterdrückt die PMN–Adhäsion an Endothelzellen, einem wichtigen Schritt der Diapedese, die Adhäsion an Epithelzellen wird jedoch nicht beeinflußt. Dies beruht wahrscheinlich auf den verschiedenen Mechanismen mit denen PMN mit diesen unterschiedlichen Zellarten interagieren.

Oberflächengebundene Serinproteasen sind also in der Lage *in vitro* wichtige physiologische Funktionen der PMN zu beeinflussen. In wie weit sich dies *in vivo* auf die Funktion der PMN auswirkt ist jedoch weiterhin unklar.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

5(6)−FAM−SE	Molecular Probes
Ac−M−15−K (Ac−MILEICTRYRGDQD−NH_2)	Neosystem Laboratoire
Aprotinin	Sigma
APS	Serva
Benzamidin	Sigma
ß−Mercaptoethanol	Pierce
Bromphenolblau	Chroma−Gesellschaft
BSA	Sigma
BSOCOES	Pierce
C3	Calbiochem
$CaCl_2$	Riedel−de−Haen
Cathepsin G (human, neutrophil)	Calbiochem
Chloroform	Merck
D(+)Glucose Monohydrat	Merck
Diisopropylfluorophosphat	Fluka
DMSO	Sigma
DSP	Pierce
ECGF	Sigma
ECL™	AmershamPharmacia Biotech
EDTA−Na_2 x2H_2O	Roth
EGTA	Serva
Elastase (human, neutrophil)	Calbiochem
Elastase (Schweinepankreas)	Calbiochem
Eselserum	Labgen
Essigsäure	J. T. Baker
Ethanol	Merck
FCS	Seromed
Fluorescent Mounting Medium	Dako
fMLP	Sigma
Gel 30 (30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid)	Roth
Glutardialdehyd	Merck
HSA	Sigma
IgG−Sepharose 6b Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech
IL−1ß	Sigma
Iodacetamid	Sigma
Isopropanol	Riedel−de−Haen
Kaninchenserum	Labgen
KCl	J. T. Baker
KH_2PO_4	Merck
Kochsalzlösung, isoton	Braun
Komplementfaktor B	Sigma
Komplementfaktor D	Sigma
Leupeptin	Boehringer Ingelheim

L−Glutamin	GibcoBRL
Liquemin® N5000 (Heparin−Natrium)	Roche
Magermilchpulver	Glücksklee
MeOSuc−Ala−Ala−Pro−Val−pNA	Bachem
Methanol	Merck
$MgCl_2$ x6H_2O	Ferak
$MnCl_2$ x4H_2O	Merck
Molekulargewichtsmarker	BioRad
Na_2HPO_4 x2H_2O	J. T. Baker
NaCl	J. T. Baker
NaH_2PO_4 xH_2O	AppliChem
NaN_3	Merck
Natriumbarbital	Merck
Natronlauge (1 M)	J. T. Baker
$NiCl_2$ x6H_2O	Merck
n−Octyl−ß−thioglucosepyranosid	Sigma
Nonapeptid (Ac−MILEICTRY−NH_2)	Orpegen
OPD	Dako
Penicillin/Streptomycin	GibcoBRL
Pepstatin	Bachem
PFA	J. T. Baker
PMSF	Serva
Polymorphprep	Nycomed
Prehydrol (30% H_2O_2)	Merck
Proteinase 3 (human, neutrophil)	Prof. Andrassy, Nephrologie, Heidelberg
Protein A Sepharose CL4B	Amersham Pharmacia Biotech
Renal Epithelial Growth Medium	PromoCell
RGDS	Sigma
RPMI 1640	GibcoBRL
Salzsäure (1 M)	J. T. Baker
Saponin	Sigma
Schafserythrozyten	ICN Biomedicals GmbH
Schwefelsäure	Merck
SDS	Roth
Suc−Ala−Ala−Pro−Phe−pNA	Novabiochem
sulfo−EGS	Pierce
SYPRO Orange protein gel stain	Molecular Probes
TEMED	Serva
TNF−α	Biodesign International
Tris−hydroxymethyl−aminomethan	Roth
Triton X−100	Sigma
Trypanblau	Roth
Trypsin (TPCK−behandelt)	Serva
Trypsin−EDTA	GibcoBRL
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	Sigma
Tween 20	Calbiochem

5.1.2 Antikörper

5.1.2.1 Primäre monoklonale Antikörper von der Maus

Antigen	Klon	Hersteller
CD11a	25.3.1	Immunotech
CD11b	BEAR1	Immunotech
CD11b	CBRM1/5	T. A. Springer, The Center for Blood Research, Boston, Massachusets, USA
CD11b	ICRF 44	LABGEN
CD11b^{+}	OKM1	Ortho Diagnostics
CD11c	BU15	Immunotech
CD16	3G8	Immunotech
CD18	7E4	Immunotech
CD32$^{\#}$	2E1	Immunotech
CD35	J3.D3	Immunotech
CD43	DFT1	Immunotech
CD45	T200	ICN Biomedicals GmbH
CD54	84H10	Immunotech
CD58$^{\#}$	AICD58	Immunotech
CD63	CLB−gran12	Immunotech
CD64	10.1	Cymbus Biotechnology LTD
CD66b−FITC	80H3	Immunotech
CD68	Ki−M6	BMA
HNE	AHN−10	Chemicon International Inc.
HNE	NP57	Dako
HNE*	204	Biodesign International
MPO	MPO−7	Dako
PR3	CLB−12.8	CLB

Alle Antikörper sind vom Subtyp IgG_1, mit Ausnahme von $^{\#}IgG_{2a}$ und $^{*}IgG_{2b}$. $^{+}$Dieser Antikörper wird nicht mehr hergestellt und war somit nicht für alle Versuche verfügbar.

5.1.2.2 Primäre polyklonale Antikörper

Antigen	Host	Hersteller
humane neutrophile Elastase	Schaf	The Binding Site
humanes Cathepsin G	Kaninchen	Calbiochem
humanes Cathepsin G	Schaf	The Binding Site
PMN	Kaninchen	H. Brenneis, Institut für Immunologie, Universität Heidelberg

5.1.2.3 Sekundäre Antikörper

Antigen	Host	Markierung	Hersteller
Kaninchen IgG	Esel	Texas Red	Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.
Kaninchen IgG	Schaf	–	The Binding Site
Kaninchen IgG	Ziege	Cy5	Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.
Kaninchen IgG	Ziege	HRP	Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.
Maus IgG	Schaf	–	LABGEN
Maus IgG	Ziege	Alexa 488	Molecular Probes
Maus IgG	Ziege	HRP	Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.
Maus IgG	Ziege	Texas Red	Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.
Schaf IgG	Esel	Alexa 488	Molecular Probes
Schaf IgG	Kaninchen	–	Southern Biotechnology Associates, Inc.
Schaf IgG	Ziege	HRP	Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.
Ziege IgG	Esel	Alexa 488	Molecular Probes
Ziege IgG	Kaninchen	HRP	Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.

5.1.2.4 Kontrollantikörper

Kaninchen IgG	Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.
Maus IgG	Immunotech
Maus IgG_{2a}	Immunotech
Maus IgG_{2b}	Dako
Schaf IgG	Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.

5.1.3 Verbrauchsmaterialien

Adhäsionsobjektträger	Marienfeld

Deckgläser	Marienfeld
ELISA−Platten	Greiner
Hybond−P PVDF−Membran	Amersham Life Science
Hyperfilm™ ECL	Amersham
Kollodiumhülsen	Sartorius
Nunclon−Zellkulturplatten	Nalgene Nunc International
Objektträger	Menzel Gläser
Zellkulturflaschen	Nalgene Nunc International

5.1.4 Verwendete Puffer

Elutionspuffer: 20% (v/v) Triethylamin, pH 4
0,1% (w/v) n−Octyl−ß−thioglucosepyranosid

Equilibrierungspuffer: 50 mM Tris−HCl, pH 8,0
150 mM NaCl
2 mM $MgCl_2$
0,1% (v/v) Triton X−100

Hank´s gepufferte Kochsalzlösung (HBSS):
27,5 mM Tris−HCl, pH 7,3
140 mM NaCl
5,4 mM KCl
0,28 mM Na_2HPO_4
0,37 mM KH_2PO_4
1 mM $CaCl_2$
1 mM $MgCl_2$
2,2 g/l Glucose Monohydrat

FACS−Puffer: 1% (w/v) BSA
0,1% NaN_3
in PBS

Laufpuffer: 25 mM Tris−HCl, pH 8,3

192 mM Glycin
0,1% SDS

Lysepuffer: 100 mM Tris−HCl, pH 8,0
150 mM NaCl
2 mM $MgCl_2$
1% (v/v) Triton X−100
0,025% (w/v) NaN_3
5 mM Iodacetamid
1 mM Diisopropylfluorophosphat
0,2 TIU/ml Aprotinin
1 mM PMSF

Neutralisationspuffer: 1 M Tris−HCl, pH 7,4
150 mM NaCl
2 mM $MgCl_2$

Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS):
10 mM Na_2HPO_4
2,8 mM NaH_2PO_4
145 mM NaCl
pH 7,4

5 x−Probenpuffer: 1M Tris−HCl, pH 6,8
50 % (v/v) Glycerin
1% (w/v) Bromphenolblau
1% (v/v) ß−Mercaptoethanol

Stripping−Puffer: 62,5 mM Tris−HCl, pH 6,7
2% (w/v) SDS
100 mM ß−Mercaptoethanol

Transferpuffer: 12,5 mM Tris−HCl, pH 8,1 − 8,4

162,5 mM Glycin
20% (v/v) Methanol

Tris gepufferte Kochsalzlösung (TBS):

10 mM Tris−HCl, pH 7,4
100 mM NaCl

Tris−Puffer (Sammelgel):

0,5 M Tris−HCl, pH 6,8
2% (w/v) SDS

Tris−Puffer (Trenngel):

1,5 M Tris−HCl, pH 8,8
2% (m/v) SDS

TBS−T: 0,05% (v/v) Tween 20
in TBS

Veronal gepufferte Kochsalzlösung (VBS):

5 mM Na−Barbital, pH 7,3 − 7,4
140 mM NaCl

VBS^{2+}: 0,15 mM $CaCl_2$
1 mM $MgCl_2$
in VBS

Waschpuffer: 50 mM Tris−HCl, pH 8,0
150 mM NaCl
2 mM $MgCl_2$
1% (w/v) n−Octyl−ß−thioglucosepyranosid

5.2 Geräte

Centrifuge 5415C, Biofuge pico	Heraeus
Cytocentrifuge	Shandon Elliot
EASY READER EAR340AT	SLT Labinstuments
EPS600 (Electrophorese Power Supply)	Pharmacia Biotech
FACScan	Becton Dickinson
FLA2000	Fuji
Labovert (Durchlichtmikroskop)	Leitz
LB 951G (γ–counter)	Berthold
Minigelkammer	BioRad
Neubauer Zählkammer	Brand
Semi dry–Blotkammer	MBT Brand
Speed Vac Concentrator	Savant
TCS–NT (konfokales Lasermikroskop)	Leica
Varifuge RF, Varifuge 3.0R	Heraeus

5.3 Methoden

5.3.1 Isolation und Stimulation von Granulozyten

5.3.1.1 Zellisolation

Die Isolation von Granulozyten erfolgte aus frisch entnommenem, heparinisiertem Vollblut gesunder Spender. Erythrozyten, polymorph– und mononukleäre Zellen wurden duch Zentrifugation (30 min, 900 g) von 25 ml Blut, welches über 20 ml Polymorphprep geschichtet wurde, getrennt. Die Erythrozyten setzen sich am Boden ab, während die Leukozyten sich in zwei Ringe auftrennen. Der obere Ring bestehend aus mononukleären Zellen wurde abgesaugt und verworfen. Der Ring mit den Granulozyten wurde in ein neues Röhrchen überführt, 1:1 mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt und 10 min bei 900 g zentrifugiert. Kontaminierende Erythrozyten wurden durch zweimalige hypotone Lyse mit 0,2% und 1,6% (w/v) NaCl entfernt und die Granulozyten in 20

ml HBSS aufgenommen. Um die Mortalitätsrate der Zellen zu bestimmen wurde ein Aliquot vor dem Auszählen (Neubauer−Zählkammer) 1:1 mit Trypanblau gefärbt. Es stellte sich heraus, daß 2% der isolierten Zellen tot waren. Durchflußzytometrisch konnte, mittels eines FITC−markierten Antikörper gegen CD66b, eine Reinheit der PMN von 95−98% gezeigt werden (siehe 5.3.2).

5.3.1.2 Zellstimulation

In Gegenwart verschiedener homobifunktioneller Quervernetzer (1 mM sulfo−EGS, 1 mM BSOCOES oder 1 mM DSP) sowie Proteaseinhibitoren (1 mM PMSF, 2,2 mTIU Aprotinin, 75 mM Benzamidin, 80 nM Leupeptin und 0,2 mM Pepstatin) wurden je 2 − 5 x10^7 PMN 15 min mit 100 U/ml TNF−α und anschließend 30 min mit fMLP (10 nM) bei 37°C stimuliert. Die Stimulation wurde durch Zugabe von 30 ml eiskaltem HBSS gestoppt und die Zellen sofort 5 min bei 500 g abzentrifugiert.

5.3.2 Durchflußzytometrie

10^8 PMN in 10 ml HBSS wurden mit TNF−α und fMLP stimuliert (siehe 5.3.1.2). Ein Stimulationsansatz wurde ohne Proteasehemmer durchgeführt. Nicht stimulierte PMN wurden zwischenzeitlich auf Eis aufbewahrt.
Je 10^6 Zellen in 500 µl FACS−Puffer wurden mit FITC α−CD66b, FITC Maus IgG (je 1:10), Schaf−IgG, Schaf α−HNE oder Schaf α−Cathepsin G (je 1:50) bzw. mit Maus−IgG oder monoklonalen Antikörpern (je 1:50) gegen verschiedene Oberflächenantigene (CD11a, CD11b (BEAR1, OKM1 oder ICRF 44), CD11c, CD16, CD18, CD32, CD35, CD43, CD45, CD64) 30 min inkubiert. Es folgten 3 Waschschritte mit je 1 ml FACS−Puffer und Zentrifugation bei 900 g (5 min). Mit den sekundären Antikörpern Alexa 488 α−Schaf IgG (1:200) bzw. mit Alexa 488 α−Maus IgG (1:250) wurden die Zellen nochmals 30 min in 500 ml FACS−Puffer inkubiert, anschließend 3x gewaschen und in 500 ml PBS mit 1% (w/v) PFA fixiert. Die Analyse und Auswertung erfolgte mit einem FACScan und der Software Cell Quest 3.0.1f (Becton Dickinson).

Je 10^6 PMN wurden nach der Isolation 30 min mit 100 nM fMLP bei 37°C stimuliert oder mit 4 nM HNE bzw. Cathepsin G 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden vor der Fixation mit 3% (w/v) PFA/0,5% (v/v) Glutaraldehyd (10 min, RT) 1x in 1 ml eis−

kaltem HBSS gewaschen. Die Zellen wurden mit 20 µg/ml α–CD11b (CBRM1/5 aus Zellkulturüberständen) bzw. Maus–IgG 1 h in 200 µl FACS–Puffer inkubiert, 3x gewaschen und mit Alexa 488 α–Maus IgG (1:200, 1 h) in 100 µl FACS–Puffer gefärbt. Nach dreimaligem waschen wurden die Proben am FACScan analysiert.

5.3.3 Kultivierung permanenter Zellinien

Die promyeloblastischen Zellinien HL60 (ATCC–Nr. CCL–240) und U937 (DMSZ–Nr. ATCC 5) wurden in 50 ml Zellkulturflaschen in RPMI 1640 Medium (komplementiert mit 10% (w/v) FCS, 2 mM L–Glutamin und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen subkultiviert.
Die Epithelzellinie A549 (ATCC–Nr. CCL–185) wurde in 6–well Zellkulturplatten in Renal Epithelial Growth Medium (mit 10% FCS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Das Ablösen der subkonfluenten Zellen erfolgte durch waschen mit kaltem PBS und 500 µl Trypsin–EDTA pro well bei 37°C (5 min). Die Zellen wurden in 30 ml Medium aufgenommen, abzentrifugiert und im Verhältnis 1:4 subkultiviert.
Zur Kultivierung der humanen Endothelzellen aus Nabelschnüren (HUVEC, von Labor Prof. Meuer zur Verfügung gestellt) in RPMI 1640 (mit 20% (v/v) FCS, 4 mM L–Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 450 U Heparin und 0,5 µg/ml ECGF) in 6–well Kulturplatten, wurden die Platten 24 h mit Gelatine beladen (0,1% Gelatine in PBS). Die Zellen wurden alle 3 Tage wie A549 trypsiniert und im Verhältnis 1:4 subkultiviert.

5.3.4 Kompetitive Bindungsstudien mit exogener Elastase

5.3.4.1 Bestimmung der Bindungsstellen auf der Zelloberfläche

Elastase wurde von der Firma Immundiagnostik, Bensheim mit ^{125}I markiert.
Je 10^6 Zellen (PMN, HL60 und U937) in 1 ml HBSS wurden mit 0,5 nM – 6 nM ^{125}I–HNE versetzt. In parallelen Ansätzen wurden zusätzlich 100 nM nicht markierte Elastase zugegeben. Nach 1 h Inkubation auf Eis und 3x waschen in kaltem HBSS wurden die Zellen in 1 ml HBSS aufgenommen und in Zählröhrchen überführt. Die

Bestimmung der gebundenen Radioaktivität erfolgte in einem γ–counter.

5.3.4.2 Hemmung der Bindung exogener Elastase

Je 10^6 PMN bzw. U937–Zellen in 1 ml HBSS wurden entweder mit 1µg Mausantikörper (IgG, CD11a, CD11b, CD11c, CD16, CD18, CD35, CD43, CD59), 10 nM C3b–Fragment (RGDS, Ac–M–15K (Ac–MILEICTRYRGDQD–NH_2) (Aminosäuren 1384 – 1397 bezüglich der C3–Sequenz) bzw. Nonapeptid (Ac–MILEICTRY–NH_2)), 8 nM Serinproteasen (PR3, Cathepsin G, PPE und HNE; aktiv bzw. inaktiviert), 1 mM PMSF oder 1 mg/ml EDTA 30 min bei 4°C inkubiert, 1x mit HBSS gewaschen und anschließend wie unter 3.3.4.1 beschrieben mit ^{125}I–HNE (4 nM), bzw. ^{125}I–HNE (4 nM) und HNE im Überschuß (100 nM) inkubiert.

5.3.4.3 Einfluß zweiwertiger Kationen auf die Bindung

PMN (10^6/ml) wurden 1 h in HBSS ohne zweiwertige Ionen, in HBSS mit nur einem zweiwertigen Ion (Ca^{2+}, Mg^{2+} oder Mn^{2+}, je 1 mM) bzw. in HBSS mit je zwei zweiwertigen Ionen (Ca^{2+}/Mn^{2+}, Ca^{2+}/Mg^{2+} oder Mg^{2+}/Mn^{2+}, je 1 mM) bei 4°C geschüttelt. Die Inkubation erfolgte, wie unter 5.3.4.1 beschrieben, in den entsprechenden Puffern mit 4 nM ^{125}I–HNE bzw. 4 nM ^{125}I–HNE und 100 nM HNE und die gebundene Radioaktivität wurde bestimmt.

5.3.5 Herstellung von Zellmembranextrakten

Je 5 x10^7 Zellen wurden in 20 ml HBSS gewaschen, bei 500 g 5 min abzentrifugiert und das trockene Zellpellet bei –20°C eingefroren. Die aufgetauten Zellen wurden in 1 ml PBS mit 1 mM PMSF aufgenommen, bei 15000 g (30 min, 4°C) abzentrifugiert und erneut bei –20°C eingefroren. Das Pellet wurde ein weiteres mal in 1 ml PBS/PMSF resuspendiert und abzentrifugiert (15000 g, 30 min, 4°C). Nach 30 min Inkubation des Membranpellets auf Eis in 500 µl Lysepuffer erfolgte die Sedimentation unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation (30 min, 15000 g, 4°C).

Das Lysat wurde bis zur weiteren Verwendung in Aliquots zu 100 µl bei –20°C aufbewahrt.

5.3.6 SDS–Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS–PAGE) und Immunoblot

Proteinproben wurden mit 5x–Probenpuffer verdünnt, 5 min gekocht und auf kontinuierliche Gele (7,5%, 10% Acrylamid, 6 x 8 cm) bzw. diskontinuierliche Gradientengele (4–17% Acrylamid, 18 x 20 cm) aufgetragen. Die Elektrophorese der Minigele wurde bei 100 V (1 h), die der Gradientengele bei 70 V (über Nacht) durchgeführt.
Nach 30 min waschen der Gele in Transferpuffer wurden sie 30 min mit SYPRO–Orange (1:5000 in Transferpuffer) gefärbt und nochmals 2x 15 min in Transferpuffer gewaschen. Proteinbanden wurden an einem FLA2000 bei 488/572 nm mit der Software Image Reader V1.4E (Fujifilm) detektiert. Die Auswertung der Gele erfolgte mittels der Software Image Gauge V3.0 und L–Process V1.5 von Fujifilm.

Proteine wurden mit Hilfe einer semi–dry Blotkammer auf eine PVDF–Membran transferiert (1 h bei 2 mA/cm^2).
Unspezifische Antigenbindungsstellen der Membran wurden über Nacht bei 4°C in TBS–T mit 3% Magermilchpulver abgesättigt. Die primären Antikörper Schaf–α–HNE bzw. Schaf–α–Cathepsin G (1:200 in TBS–T (60–70 ml/cm^2)) inkubierten 1 h bevor der HRP–markierte Antikörper Ziege–α–Schaf IgG (1:50000 in TBS–T/0,5% Magermilchpulver) 1 h aufgetragen wurde. Nach jedem Färbeschritt wurde die Membran 4x 5 min in TBS–T gewaschen. Die Detektion der Banden erfolgte mittels des ECL–Kits.
Um die Membran mit dem Kontrollantikörper (Schaf–IgG) färben zu können wurde sie 30 min bei 50°C gestripped und 3x 10 min in TBS–T gewaschen.

5.3.7 Immunpräzipitation

Membranlysat wurde auf IgG−Sepharose (50 µl Sepharose/ml Lysat) über Nacht bei 4°C präabsorbiert. Nach Zentrifugation (5 min bei 15000 g, 4°C) und 3x waschen mit 1 ml PBS wurde die Sepharose in PBS mit 0,01% (w/v) NaN_3 aufbewahrt. 200 µl des Überstandes wurde mit 50 µl immobilisiertem Antikörper (1 µg Antikörper (Maus α −CD11a bzw. α−CD11b) über Nacht bei 4°C an 50 µl Protein A Sepharose gekoppelt und 2x in Equilibrierungspuffer gewaschen) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachdem die Sepharose abzentrifugiert und 2x mit je 1 ml PBS gewaschen war, wurde sie in 60 µl Probenpuffer 5 min gekocht, erneut abzentrifugiert und der Überstand auf ein 4 – 17% SDS−Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde wie unter 3.3.6 beschrieben durchgeführt.

5.3.8 Indirekte Immunfluoreszenz

3 $x10^6$ gereingte PMN wurden in 3 ml PBS mit 3% (w/v) PFA und 0,5% (v/v) Glut−araldehyd bzw. in PBS mit 3% (w/v) PFA, 0,5% (v/v) Glutaraldehyd und 0,1% (w/v) Saponin 10 min fixiert. Jeweils 5 $x10^5$ Zellen wurden bei 500 g (5 min) in einer Zyto−zentrifuge auf einen Objektträger zentrifugiert. Nachdem sie an der Luft getrocknet waren wurden sie bis zur weiteren Verwendung bei −20°C gelagert.

Alle Schritte der darauffolgenden Immunfärbung konnten bei Raumtemperatur durch−geführt werden. Absättigung unspezifischer Bindungstellen erfolgte mit 50 µl 1% (w/v) BSA und 0,5% (v/v) Eselserum in PBS (30 min). Die Antikörper wurden, falls nicht anders vermerkt, in PBS mit 1% BSA verdünnt. Zwischen jedem einzelnen Färbeschritt mußten die Objektträger 4x 5 min in PBS gewaschen werden.

Sowohl die primären Antikörper, wie auch die sekundären, wurden wie unten aufge−führt je 1 h inkubiert. Zwischen jeder Immunfärbung mußten die Präparate 4x 5 min in PBS gewaschen werden. Die Objektträger wurden nach dem letzten Waschschritt in Wasser gespült und in Fluorescent Mounting Medium eingedeckt. Um ein Antrocknen des Mediums zu gewährleisten wurden die Präparate über Nacht bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt und an einem konfocalen Lasermikroskop ausgewertet.

1. primärer Antikörper: Schaf−α−humane Elastase; 1:200
2. primärer Antikörper: monoklonale Antikörper von der Maus gegen: CD11a, CD11b, CD11c, CD16, CD18, CD32, CD35, CD43, CD63, CD64, CD68; je 1:100
3. primärer Antikörper: Kaninchen−α−humanes Cathepsin G; 1:200

1. sekundärer Antikörper: Alexa 488 Esel−α−Schaf IgG; 1:300
2. sekundärer Antikörper: TexasRed Ziege−α−Maus IgG; 1:250
3. sekundärer Antikörper: Cy5 Ziege−α−Kaninchen IgG; 1:300

5.3.9 Bindung von Elastase an isolierten Komplementrezeptor Typ 3 (CR3, Mac−1, CD11b/CD18)

5.3.9.1 Isolierung von CR3

Sepharose bewirkt eine Aktivierung der alternativen Komplementkaskade. Hierbei entsteht das Spaltstück C3bi, das an Sepharose koppelt.

Um humanes C3bi an Sepharose zu koppeln wurden 10 ml Sepharose und 100 ml Serum eines gesunden Spenders mit 4 mM $MgCl_2$ und 10 mM EGTA 1 h bei 37°C inkubiert [van Strijp 1993]. Die Sepharose wurde 2x in PBS, 1x in Elutionspuffer und 1x in Lysepuffer gewaschen, mit 2 ml PMN−Membranextrakt 30 min bei 4°C inkubiert, 4x in 10 ml Lysepuffer gewaschen und die gebundenen Proteine 5 min bei Raumtemperatur mit 5 ml Elutionspuffer von der Sepharose eluiert. Die Regeneration der Sepharose erfolgte durch 2x waschen mit PBS. Diese kann in PBS mit 0,01% (w/v) NaN_3 aufbewahrt werden. Das Eluat wurde mit Neutralisationspuffer neutralisiert und bei 4°C gegen PBS umgepuffert, auf 1 ml eingeengt und die Konzentration mittels OD_{280} bestimmt.

5.3.9.2 Bindungststudien an isoliertem CR3

Pro well wurden 100 µg CR3 über Nacht bei 4°C an eine ELISA−Platte gekoppelt. Nachdem die Platte 2x mit PBS gewaschen war, wurden freie Bindungsstellen mit je 200 µl/well 5% (w/v) BSA in PBS 1 h bei 37°C abgeblockt. Nach 2x waschen der Platte mit PBS/1 mM Ca^{2+} wurden die wells mit verschiedenen Antikörpern (Maus IgG, α

–CD11a, α–CD11b, α–CD11c, α–CD18; je 0,04 µg/well) in 100 µl PBS/1 mM Ca^{2+} 30 min vorinkubiert. HNE bzw. Cathepsin G (je 0,2 pmol/well) wurden anschließend zupippetiert und 30 min bei RT an CR3 gebunden. Nach zweimaligem waschen mit PBS/1 mM Ca^{2+} erfolgte die Substratzugabe (MeOSuc–Ala–Ala–Pro–Val–pNA für HNE, bzw. Suc–Ala–Ala–Pro–Phe–pNA für Cathepsin G; je 0,5 pmol/well). Die Far–breaktion mußte nach 30 min bei 37°C mit 1 mM PMSF (Endkonzentration) abgestoppt und bei 405 nm gemessen werden.

5.3.10 Einfluß der oberflächengebundenen Elastase auf die CD11b–C3bi–Wechselwirkung

5.3.10.1 Kopplung des Komplementfragments C3bi an Schafserythrozyten

Humanes, inaktivieres Serum (30 min bei 56°C) eines gesunden Spenders wurde 3x mit je 10^9 Schafserythrozyten präabsorbiert, jeweils gefolgt von einer Zentrifugation (3 min, 3000 g).

200 mg C3 wurden mit 10^9 gewaschenen Schafserythrozyten 4 min bei RT in VBS inkubiert. Die Zellen wurden 1x in 1 ml VBS mit 1 mg/ml Trypsininhibitor gewaschen und in 150 ml VBS/1 mM $NiCl_2$ aufgenommen. Der Inkubation mit 50 mg Komple–mentfaktor B und 125 ng Komplementfaktor D (5 min, 37°C) folgte die Zugabe von 500 mg C3. Nach 30 min bei 37°C wurden die Zellen 2x in VBS gewaschen, mit 100 ml inaktiviertem Serum versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die mit C3bi beladenen Zellen (EC3bi) wurden 2x in VBS gewaschen.

Die EC3bi wurden auf 1,5 x10^8 Zellen/ml VBS^{2+} eingestellt und pro Milliliter 2 ml 5(6)–FAM–SE (10 mg/ml) zugegeben. Nach 10 min auf Eis wurden die Zellen (FITC–EC3bi) 2x in VBS^{2+} gewaschen.

5.3.10.2 Rosettenbildung

10^7 PMN wurden in 5 ml VBS^{2+} 30 min mit HNE (8 nM) auf Eis inkubiert, 2x gewa–schen und in 5 ml VBS mit 1 mg/ml Trypsininhibitor und 2 mg/ml HSA aufgenommen. Der Komplementrezeptor 1 (CR1, CD35) mußte vor Zugabe von FITC–EC3bi 30 min

bei Raumtemperatur mit einem CD35−Antikörper abgeblockt (1 µg/ml, 30 min) wer−den. Anschließend wurden je 10^6 PMN in Gegenwart von Antikörpern gegen CD11b, CD18 bzw. Maus IgG (0,5 µg/ml) mit 2,25 x10^6 FITC−EC3bi 30 min bei 37°C inku−biert. Die Zellen wurden 3x in VBS gewaschen, 10 Minuten in 500 µl PBS mit 3% (w/v) PFA und 0,5% (v/v) Glutaraldehyd fixiert. Nach dreissigminütiges Färben mit PE−markiertem Ziege α−Maus (1:200) und 3x waschen konnten die Zellen am FACS−can analysiert werden.

5.3.11 Adhäsion auf Monolayer

5.3.11.1 Adhäsion auf Epithelzellmonolayer

A549−Zellen (siehe 5.3.3.1) wurden (2,5 x10^4/well) in 96−well Kulturplatten ausgesät. Sobald die Zellen zu konfluenten Monolayern gewachsen waren (3 − 4 Tage) wurden sie 72 h mit 100 U/ml INF−g in Medium stimuliert und 1x mit Medium gewaschen.
Frisch isolierte PMN wurden in HBSS mit 8 nM HNE 30 min auf Eis inkubiert (unbe−handelte Kontroll−PMN wurden in HBSS auf Eis aufbewahrt), 2x gewaschen, in Medium (10^6/ml) aufgenommen und je 10^5 Zellen/well auf die Epithelzellen pipettiert. Die PMN wurden 30 min bei 37°C auf dem Epithel gelassen. Das Medium wurde abge−saugt, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und 10 min mit PBS/1% PFA fixiert. Die wells wurden 1 h bei 37°C mit 5% BSA in PBS abgeblockt und mit Kaninchen a−PMN (1:500) 1 h inkubiert. Nach 3x waschen mit PBS, erfolgte die Inkubation mit Ziege HRP−a−Kaninchen (1:5000, 1 h, RT), dreimaliges waschen und der Umsatz des OPD−Substrates in Gegenwart von 0,025% (v/v) H_2O_2. Nach 30 min mußte die Reaktion mit 0,1% (v/v) H_2SO_4 abgestoppt werden um den Farbumschlag an einem ELISA−reader bei 450 nm zu detektieren.

5.3.11.2 Adhäsion auf Endothelzellmonolayer

Die HUVEC wurden 10^4/well in einer, mit Gelatine beladenen 96−well Platte ausgesät. Nach 4 Tagen erreichten die Zellen Konfluenz und wurden 4 h mit 10 U/ml IL−1ß sti−muliert. Die Zellen wurden mit Medium gewaschen und analog 5.3.11.1 wurden PMN zu dem Endothel gegeben.

6 Literaturverzeichnis

Altieri, D. C., Bader, R., Mannuci, P. M., Edgington, T. S. (1988a) Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac−1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen. J. Cell Biol. 107, 1893−1900.

Altieri, D. C., Edgington, T. S. (1988b) The saturable high affinity association of factor X to ADP−stimulated monocytes defines a novel function of the Mac−1 receptor. J. Biol. Chem. 263,7007−7015.

Altieri, D. C. (1991) Occupancy of CD11b/CD18 (Mac−1) divalent ion binding site(s) induces leukocyte adhesion. J. Immunol. 147, 1891−1898.

Altieri, D. C., Stammes, S. J., Gahmberg, C. G. (1992) Regulated Ca^{2+} signaling through leukocyte CD11b/CD18 integrin. Biochem. J. 288, 465−473.

Aman, M. J., Stockdreher, K., Thews, A., Kienast, K., Aulitzky, W. E., Färber, L., Haus, U., Koci, B., Huber, C., Peschel, C. (1996) Regulation of immunomodulatory functions by granulocyte−macrophage colony−stimulating factor and granulocyte colony−stimulating factor in vivo. Ann. Hematol. 73, 231−238.

Apenberg, S., Andrassy, K., Wörner, I., Hänsch, G. M., Roland, J., Morcos, M., Ritz, E. (1996) Antibodies to neutrophil elastase: A study in patients with vasculitis. Am. J. Kidney Dis. 28, 178−185.

Arii, N., Mizuguchi, M., Mori, K., Takashima, S. (1999) Development of telencephalin in the human cerebrum. Microsc. Res. Tech. 46, 18−23.

Arnaout, M. A. (1990a) Leukocyte adhesion molecules deficiency: its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response. In Immunol. Rev. 114 (Ed. G. Möller), 145−180.

Arnaout, M. A. (1990b) Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. Blood 75, 1037−1050.

Arnaout, M. A., Dana, N., Gupta, S. K., Tenen, D., Fathalla, D. (1990c) Point mutations impairing cell surface expression of the common ß subunit in a patient. J. Clin. Invest. 85, 977−981.

Baily, P., Hermand, P., Callebaut, I., Sonneborn, H. H., Khamlichi, S., Mornon, J. P., Cartron, J. P. (1994) The LW blood group glycoprotein is homologous to intercellular adhesion molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5306−5310.

Baily, P., Tontti, E., Hermand, P., Cartron, J. P. Gahmberg, C. G. (1995) The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. Eur. J. Immunol. 25, 3316−3320.

Baumheter, S., Singer, M. S., Henzel, W., Hemmerich, S., Renz, M., Rosen, D., Lasky, L. A. (1993) Binding of L−selectin to the vascular sialomucin CD34. Science 262, 436−438.

Bazil, V., Strominger, J. L. (1993) CD43, the major sialoglycoprotein of human leukocytes, is proteolytically cleaved from the surface of stimulated lymphocytes and granulocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3792–3796.

Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., Freeman, B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1620–1624.

Ben–Smith, A., Wakelam, M. J. O., Savage, C. O. S. (1999) Anti–neutrophil cytoplasmic autoantibodies activate primed neutrophils via distinct signaling pathways to those elicited by cross–linking Fcγ receptors with specific antibodies. J. Am. Soc. Neph. 10, 507A.

Berg, E. L., Magnani, J., Warnock, R. A., Robinson, M. K., Butcher, E. C. (1992) Comparison of L–selectin and E–selectin ligand specificities: the L–selectin ligands sialyl Le(x) and sialyl Le(a). Biochem. Biophsy. Res. Commun. 184, 1048–1055.

Bieth, J. G., Dirrig, S., Jung, M. L., Boudier, C., Papamichael, E., Sakarellos, C., Dimicoli, J. L. (1989) Investigation of the active center of rat pancreatic elastase. Biochim. Biophys. Acta 994, 64–74.

Blackford, J., Reid, H. W., Pappin, D. J., Bowers, F. S., Wilkinson, J. M. (1996) A monoclonal antibody 3/22 to rabbit CD11c which induces homotypic T cell aggregation: evidence that ICAM–1 is a ligand for CD11c/CD18. Eur. J. Immunol. 26, 525–531.

Blow, A. M. (1977a) Action of human lysosomal elastase on the oxidized B chain of insulin. Biochem. J. 161, 13–16.

Blow, A. M. (1977b) Action of human lysosomal cathepsin G on the oxidized B chain of insulin. Biochem. J. 161, 17–19.

Blow, D. M. (1976) Structure and mechanism of chymotrypsin. Acc. Chem. Res. 9, 145–152.

Blum, M. S., Toninelli, E., Anderson, J. M., Balda, M. S., Zhou, J., O'Donnell, L., Pardi, R., Bender, J. R. (1997) Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. Am. J. Physiol. 273, H286–H294.

Bode, W., Wei, A.–Z., Huber, R., Meyer, E., Travis, J., Neumann, S. (1986) X–ray crystal structure of the complex of human leukocyte elastase (PMN elastase) and the third domain of the turkey ovomucoid inhibitor. EMBO J. 5, 2453–2458.

Bokoch, G. M. (1995) Chemoattractant signaling and leukocyte activation. Blood 86, 1649–1660.

Borregaard, N., Lollike, K., Kjeldsen, L., Sengelov, H., Bastholm, L., Nielsen, M. H., Bainton, D. F. (1993) Human neutrophil granules and secretory vesicles. Eur. J. Haematol. 51, 187–198.

Boyden, S. (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med. 115, 453–466.

Browning, J., Ribolini, A. (1989) Studies on the differing effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin on the growth of several human tumor cell lines. J. Immunol. 143, 1859–1867.

Cai, T.–Q., Wright, S. D. (1996) Energetics of leukocyte integrin activation. J. Biol. Chem. 270, 14358–14365.

Campbell, E. J., Senior, R. M., McDonald, J. A., Cox, D. L., Greco, J. M., Landis, J. A. (1982) Proteolysis by neutrophils: realtive importance of cell–substrate contact and oxidative inactivation of proteinase inhibitors in vitro. J. Clin. Invest. 70, 845–852.

Campbell, C. H., Cunningham, D. D. (1987) Binding sites for elastase on cultured human fibroblasts that do not mediate internalization. J. Cell. Physiol. 130, 142–149.

Caughey, G. H., Schaumberg, T. H., Zerweck, E. H., Butterfield, J. H., Hanson, R. D., Silverman, G. A., Ley, T. J. (1993) The human mast cell chymase gene (MA1) mapping to the cathepsin G/granzyme gene cluster and lineage restricted expression. Genomics 15, 614–620.

Champagne, B., Tremblay, P., Cantin, A., Pierre, Y. St. (1998) Proteolytic cleavage of ICAM–1 by human neutrophil elastase. J. Immunol.161, 6389–6405.

Chatila, T. A., Geha, R. S., Arnaout, M. A. (1989) Constitutive and stimulus–induced phosphorylation of CD11/CD18 leukocyte adhesion molecules. J. Cell Biol. 109, 3435–3444.

Cline, M. J. (1975) The White Cell. Cambridge: Harvard University Press.

Colgan, S. P., Parkos, C. A., Delp, C., Arnaout, M. A., Madara, J. L. (1993) Neutrophil migration across cultured intestinal epithelial monolayers is modulated by epithelial exposure to IFN–gamma in a highly polarized fashion. J. Cell Biol. 120, 785–798.

Colombatti, A., Bonaldo, P. (1991) The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A–like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. Blood 77, 2305–2315.

Cox, G., Gauldie, J., Jordana, M. (1992) Bronchial epithelial cell–derived cytokines (G–CSF and GM–CSF) promote the survival of peripheral blood neutrophils in vitro. Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol. 7, 507–513.

Csernok, E., Ernst, M., Schmitt, W., Bainton, D. F., Gross, W. L. (1994) Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. Clin. Exp. Immunol. 95, 244–250.

Csernok, E., Gross, W. L. (1995) Antineutrophilic cytoplasmic antibodies (ANCA) in inflammatory rheumatic diseases: immunodiagnostic and immunpathogenic aspects. Z. Rheumatol. 54, 26–38.

Dana, N., Todd III, R. F., Pitt, J., Springer, J. T., Arnaout., M. A. (1984) Deficiency of surface membrane glycoprotein (Mo1) in man. J. Clin. Invest. 73, 155–159.

Danilenko, D. M., Rossitto, P. V., Van der Vieren, M., Le Trong, H., McDonough, S. P., Affolter, V. K., Moore, P. F. (1995) A novel canine leukointegrin, alpha d beta 2, is expressed by specific macrophage subpopulations in tissue and a minor $CD8^+$ lymphocyte subpopulation in peripheral blood. J. Immunol. 155, 35–44.

Dewald, B., Rindler–Ludwig, R., Bretz, U., Baggiolini, M. (1975) Subcellular localization and heterogeneity of neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med. 141, 709–723.

Diamond, M. S., Staunton, D. E., de Fougerolles, A. R., Stacker, S. A., Garcia–Aguilar, J., Hibbs, M. L., Springer, T. A. (1990) ICAM–1 (CD54): a counter–receptor for Mac–1 (CD11b/CD18). J. Cell Biol. 111, 3129–3139.

Diamond, M. S., Staunton, D. E., Marlin, S. D., Springer, T. A. (1991) Binding of integrin Mac–1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin–like domain of ICAM–1 (CD54) and its regulation by glycolisation. Cell 65, 961–971.

Diamond, M. S., Springer, T. A. (1993a) A subpopulation of Mac–1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM–1 and fibrinogen. J. Cell Biol. 120, 545–556.

Diamond, M. S., Garcia–Aguilar, J., Bickford, J. K., Corbi, A. L., Springer, T. A. (1993b) The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac–1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. J. Cell Biol. 120, 1031–1043.

Dransfield, I., Cabanas, C., Craig, A., Hogg, N. (1992a) Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA–1. J. Cell Biol. 116, 1527–1535.

Dransfield, I., Cabanas, C., Barret, J., Hogg, N. (1992b) Interaction of leukocyte integrins with ligand is necessary but not sufficient for function. J. Cell Biol. 116, 1527–1535.

Dowbenko, D., Andalibi, A., Young, P. E., Lusis, A. J., Lasky, L. A. (1993) Structure and chromosomal localization of the murine gene encoding GLYCAM–1. A mucin–like endothelial ligand for L–selectin. J. Biol. Chem. 268, 4525–4529.

Erdei, A., Melchers, F., Schulz, T., Dierich, M. (1985) The action of human C3 in soluble or cross–linked form with resting and activated murine B lymphocytes. Eur. J. Immunol. 15, 184–188.

Falk, R. J., Terrell, R. S., Charles, L. A., Jennette, J. C. Anti–neutrophil cytoplasmic antibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4115–4119.

Farber, H. W., Center, D. M., Rounds, S., Danilov, S. M. (1990) Components of the angiotensin system cause release of a neutrophil chemoattractant from cultured bovine and human endothelial cells. Eur. Heart J. 11, 100–107.

Fink, T. M., Lichter, P., Wekerle, H., Zimmer, M., Jenne, D. E. (1996) The human granzyme A (HFSP, CTAL 3) gene maps to 5q11–q12 and defines a new locus of the serine protease superfamily. Genomics 18, 401–403.

de Fougerolles, A. R., Stacker, S. A., Schwarting, R., Springer, T. A. (1991) Characterization of ICAM–2 and evidence for a third counter–receptor for LFA–1. J. Exp. Med. 174, 253–267.

de Fougerolles, A. R., Springer, T. A. (1992) Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter–receptor for lymphocyte function–associated molecule 1 on resting lymphocytes. J. Exp. Med. 175, 185–190.

Gallin, M. Y., Jacobi, A. B., Buttner, D. W., Schonberger, O., Marti, T., Eritman, K. D. (1995) Human autoantibody to defensin. Disease association with hyperreactive onchoceriasis (SOWDA) J. Exp. Med. 182, 41–47.

Gimbrone, M. A., Alexander, R. W. (1975) Angiotensin II stimulation of prostaglandin production in cultured human vascular endothelium. Science 189, 219–220.

Goetzl, E. J., Klickstein, L. B., Watt, K. W. K., Wintroub, B. U. (1980) The preferential human mononuclear leukocyte chemotactic activity of the substituent tetrapeptides of angiotensin II. Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 1097–1102.

Griggs, D. W., Schmidt, C. M., Carron, C. P. (1998) Characteristics of cation binding to the I domains of LFA–1 and Mac–1: the LFA–1 I domain contains a Ca^{2+} binding site. J. Biol. Chem. 273, 22113–22119.

Gross, W. L., Csernok, E., Helmchen, U. (1995) Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies, autoantigens, and systemic vasculitis. APMIS 103, 81–97.

Heusel, J. W., Hanson, R. D., Silverman, G. A., Ley, T. J. (1991) Structure and expression of a cluster of human hematopoietic serine protease genes found on chromosome 14q11.2. J. Biol. Chem. 266, 6152–6158.

Hopkins, P. C., Chang, W. S., Wardell, M. R., Stone, S. R. (1997) Inhibitory mechanism of serpins. Mobility of the C–terminal region of the reactive–site. J. Biol. Chem. 272, 3905–3909.

Huang, A. J., Manning, J. E., Bandak, T. M., Ratau, M. C., Hanser, K. R., Silverstein, S. C. (1993) Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. J. Cell Biol. 120, 1371–1380.

Huang, C., Springer, T. A. (1995) A binding interface on the I domain of lymphocyte function–associated antigen–1 (LFA–1) required for specific interaction with intercellular adhesion molecule 1 (ICAM–1). J. Biol. Chem. 270, 19008–19016.

Ingalls, R. R., Golenbock, D. T. (1995) CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. J. Exp. Med. 181, 1473–1479.

Ingalls, R. R., Arnaout, M. A., Golenbock, D. T. (1997) Outside–in signaling by lipopolysaccharide through a tailless integrin. J. Immunol. 159, 433–438.

Jochum, M., Duswald, K. H., Neumann, S., Witte, J., Fritz, H. (1984) Proteinases and their inhibitors in septicemia–basic concepts and clinical implications. Adv. Exp. Med. Biol. 167, 167391–167404.

Jones, S. L., Knaus, U. G., Bokoch, G. M., Brown, E. J. (1998) Two signaling mechanisms for activation of $\alpha_M ß_2$ avidity in polymorphonuclear neutrophils. J. Biol. Chem. 273, 10556–10566.

Johnson, P. A., Alexander, H. D., McMillan, S. A., Maxwell, A. P. (1997) Up–regulation of the granulocyte adhesion molecule Mac–1 by autoantibodies to autoimmune vasculitis. Clin. Exp. Immunol. 107, 513–519.

Kallenberg, C. G., Brouwer, E., Mulder, A. H., Stegeman, C. A., Weening, J. J., Tervaert, J. W. (1995) ANCA–pathophysiology revisted. Clin. Exp. Immunol. 100, 1–3.

Kishimoto, T. K., Larson, R. S., Corbi, A. L., Dustin, M. L., Staunton, D. E., Springer, T. A. (1989) The leukocyte integrins. Adv. Immunol. 46, 149–182.

Kubes, P., Suzuki, M., Granger, D. N. (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4651–4655.

Laouar, A., Villiers, C., Sanceau, J., Maison, C., Colomb, M., Wietzerbin, J., Bauvois, B. (1993) Inactivation of interleukin–6 *in vitro* by monoblastic U937 cell plasma membranes involves both protease and peptidyl–transferase activity. Eur. J. Biochem. 215, 825–831.

Larson, R. S., Corbi, A. L., Berman, L., Springer, T. (1989) Primary structure of the leukocyte function–associated molecule–1 alpha subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. J. Cell Biol. 108, 703–712.

Lasky, L. A. (1992) Selectins: interpreters of cell–specific carbohydrate information during inflammation. Science 258, 964–969.

Lawrence, D. A., Ginsburg, D., Day, D. E., Berkenpas, M. B., Verhamme, I. M., Kvassman, J. O., Shore, J. D. (1995) Serpin–protease complexes are trapped as stabel acyl–enzyme intermediates. J. Biol. Chem. 270, 25309–25312.

Lecoanet–Henchoz, S., Gauchat, J. F., Aubry, J. P., Garber, P., Life, P., Paul–Eugene, N., Ferrua, B., Dugas, B., Plater–Zyberg, C., (1995) CD23 regulates monocyte activation through a novel interaction with the adhesion molecules CD11b–CD18 and CD11c–CD18. Immunity 3, 119–125.

Liou, T. G., Campbell, E. J. (1996) Quantum proteolysis resulting from release of single granules by human neutrophils: a novel, nonoxidative mechanism of extracellular proteolytic actvity. J. Immunol 157, 2624–2631.

Liu, Q., Kishimoto, T. K., Mainolfi, E., Deleon, R. P., Myers, C., Moretz, R. C. (1998) Dynamic expression of L−selectin in cell−to−cell interactions between neutrophils and endothelial cells in vitro. Exp. Cell Res. 243, 87−93.

Loike, J. D., Sodeik, B., Cao, L., Leucona, S., Weitz, J. I., Detmers, P. A., Wright, S. D., Silverstein, S. C. (1991) CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N terminus of the alpha chain of fibrinogen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1044−1048.

Maison, C. M., Villiers, C. L., Colomb, M. G. (1991) Proteolysis of C3 on U937 cell plasma membranes: Purification of cathepsin G. J. Immunol. 147, 921−926.

Malech, H. L., Gallin, J. I. (1987) Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. N. Engl. J. Med. 317, 687−694.

Marlin, S. D., Springer, T. A. (1987) Purified intercellular adhesion molecule−1 (ICAM−1) is a ligand for lymphocyte function−associated antigen 1 (LFA−1). Cell 51, 813−819.

Matheson, N. R., van Halbeek, H., Travis, J. (1991) Evidence for a tetrahedral intermediate complex during serpin−proteinase interactions. J. Biol. Chem. 266, 13489−13491.

Melchers, F., Erdei, A., Schulz, T., Dierich, M. P. (1985) Growth control of activated, synchronized murine B cells by the C3d fragment of human complement. Nature 317, 264−267.

Mellet, P., Boudier, C., Mely, Y., Bieth, J. G. (1998) Stopped flow fluorescence energy transfer measurement of the rate constants describing the reversible formation and the irreversible rearrangement of the elastase−alpha1−proteinase inhibitor complex. J. Biol. Chem. 273, 9119−9123.

Menger, M. D., Vollmar, B. (1996) Adhesion molecules as determinants of disease: from molecular biology to surgical research. Br. J. Surg. 83, 588−601.

Michishita, M., Videm, V., Arnaout, M. A. (1993) A novel divalent binding site in the A domain of the ß2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding. Cell 72, 857−867.

Monboisse, J. C., Garnotel, R., Randoux, A., Dufer, J., Borel, J. P. (1991) Adhesion of human neutrophils to and activation by type−I collagen involving a beta 2 integrin. J. Leukoc. Biol. 50, 373−380.

Morcos, M., Zimmermann, F., Radsak, M., Wörner, I., Kramer, M. D., Roland, J., Hänsch, G. M., Andrassy, K. (1998) Autoantibodies to polymorphonuclear neutrophil elastase do not inhibit but enhance elastase activity. Am. J. Kidney Dis. 31, 978−985.

Morzycki, W., Sadowska, J., Issekutz, A. C. (1990) Interleukin−1 and tumor necrosis factor α induced polymorphonuclear leukocyte−endothelial cell adhesion and transendothelial migration in vitro: the effect of apical versus basal monolayer stimulation. Immunol. Lett. 25, 331−340.

Mrowka, C., Csernok, E., Gross, W. L., Feucht, H. E., Bechtel, U., Thoenes, G. H. Distribution of granulocyte serine proteinases proteinase 3 and elastase in human glomerulonephritis. Am. J. Kidney Dis. 25, 253–261.

Muchowski, P. J., Zhang, L., Chang, E. R., Soule, H. R., Plow, E. F., Moyle, M. (1994) Functional interaction between the integrin antagonist neutrophil inhibitory factor and the I domain of CD11b/CD18. J. Biol. Chem. 269, 26419–26423.

Myones, B. L., Dalzell, J. G., Hogg, N., Ross, G. D. (1988) Neurophil and monocyte cell surface p150,95 has iC3b–receptor (CR4) activity resembling CR3. J. Clin. Invest. 82, 640–651.

Naccache, P. H., Jean, N., Liao, N. W., Bator, J. M., McColl, S. R., Kubes, P. (1994) Regulation of stimulated integrin expression in human neutrophils by tyrosine phosphorylation. Blood 84, 616–626.

Neurath, H. (1984) Evolution of proteolytic enzymes. Science 224, 350–357.

Ng–Sikorski, J., Andersson, R., Patarroyo, M., Andersson, T. (1991) Calcium signaling capacity of the CD11b/CD18 integrin on human neutrophils. Exp. Cell Res. 195, 504–508.

Noronha, I. L., Kruger, C., Andrassy, K., Ritz, E., Waldherr, R. (1993) In situ production of TNF–alpha, IL–1 beta and IL–2R in ANCA–positive glomerulonephritis. Kidney Int. 43, 682–692.

Nussler, A. K., Billiar, T. R. (1993) Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. J. Leukoc. Biol. 54, 171–178.

Owen, C. A., Campbell, M. A., Sannes, P. L., Campbell, E. J. (1995a) Cell surface–bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: A novel, non–oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteases. J. Cell Biol. 131, 775–789.

Owen, C. A., Campbell, M. A., Boukedes, S. S., Campbell, E. J. (1995b) Inducible binding of bioactive cathepsin G to the cell surface of neutrophils. A novel mechanism for mediating extracellular catalytic activity of cathepsin G. J. Immunol. 155, 5803–5810.

Owen, C. A., Campbell, M. A., Boukedes, S. S., Campbell, E. J. (1997) Cytokines regulate membrane–bound leukocyte elastase on neutrophils: a novel mechanism for effector activity. Am. J. Physiol. 272, L385–L393.

Owen, C. A., Campbell, E. J. (1998) Angiotensin II generation at the cell surface of activated neutrophils: Novel cathepsin G–mediated catalytic activity that is resistant to inhibition. J. Immunol. 160, 1436–1443.

Oxvig, C., Lu, C., Springer, T. A. (1999) Conformational changes in tertiary structure near the ligand binding site of an integrin I domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 2215–2220.

Parkos, C. A., Colgan, S. P., Liang, T. W., Nusrat, A., Bacarra, A. E., Carnes, D. K., Madara, J. L. (1996) CD47 mediates post−adhesive events required for neutrophil migration across polarized intestinal epithelia. J. Cell Biol. 132, 437−450.

Perlmutter, D. H., Glover, G. I., Rivetna, M., Schasteen, C. S., Fallon, R. J. (1990) Identification of a serpin−enzyme complex receptor on human hepatoma cells and human monocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3753−3757.

Picker, L. J., Warnock, R. A., Burns, A. R., Doerschuck, C. M., Berg, E. L., Butcher, E. C. (1991) The neutrophil selectin ELAM−1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins EMLA−1 and GMP−140. Cell 66, 921−933.

Porges, A. J., Redecha, P. B., Kimberly, W. T., Csernok, E., Gross, W. L., Kimberly, R. P. (1994) Anti−neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via Fc gamma RIIa. J. Immunol. 153, 1271−1280.

Rao, N. V., Wehner, N. G., Marshall, B. C., Gray, W. R., Bray, B. H., Hoidal, J. R. (1991) Characterization of proteinase−3 (PR−3), a novel serine proteinase. Structural and functional properties. J. Biol. Chem. 266, 9540−9548.

Reilly, C. F., Tewksbury, D. A., Schechter, N. M., Travis, J. (1982) Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. J. Biol. Chem 257, 8619−8622.

Remold−O´Donnel, E., Parent, D. (1994) Two proteolytic pathways for down−regulation of the barrier molecule CD43 of human neutrophils. J. Immunol. 152, 3595−3605.

Remold−O´Donnel, E., Parent, D. (1995a) Specific sensitivity of CD43 to neutrophil elastase. Blood 86, 2395−2402.

Remold−O´Donnell, E., Parent, D. (1995b) Downregulation of neutrophil CD43 by opsonized zymosan. Blood 85, 337−342.

Renesto, P., Halbwachs−Mecarelli, L., Bessou, G., Balloy, V., Chignard, M. (1996) Inhibition of neutrophil−endothelial adhesion by a neutrophil product, cathepsin G. J. Leukoc. Biol. 59, 855−9−863.

Reumaux, D., Vossebeld, P. J., Roos, D., Verhoeven, A. J. (1995) Effect of tumor necrosis factor−induced integrin activation on Fc gamma receptor II−mediated signal transduction: relevance for activation of neutrophils by anti−proteinase 3 or anti−myeloperoxidase antibodies. Blood 86, 3189−3195.

Rieu, P., Porteu, F., Bessou, G., Lesavre, P., Halbwachs−Mecarelli, L. (1992) Human neutrophils release their major membrane sialoprotein, leukosialin (CD43), during cell activation. Eur. J. Immunol. 22, 3021−3026.

Robertson, A. L., Khairallah, P. A. (1975) Effects of angiotensin II on the permeability of the vascular wall. In *Angiotensin.* (Ed. I. H. Page, F. M. Bumpus), Springer−Verlag, 500.

Rothlein, R., Dustin, M. L., Marlin, S. D., Springer, T. A. (1986) A human intercellular

adhesion molecule (ICAM−1) distinct from LFA−1. J. Immunol. 137, 1270−1274.

Rubin, H., Wang, Z. M., Nickbarg, E. B., McLarney, S., Naidoo, N., Schoenberger, O. L., Johnson, J. L., Cooperman, B. S. (1990) Cloning, expression, purification, and biological activity of recombinant native and variant human alpha 1−antichymotrypsins. J. Biol. Chem. 265, 1199−1207.

Sako, D., Chang, X. J., Barone, K. M., Vachino, G., White, H. M., Shwa, G., Veldman, G. M., Bean, K. M., Ahern, T. J., Furie, B., Cumming, D. A., Larsen, G. R. (1993) Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P−selectin. Cell 75, 1179−1186.

Sanchez−Madrid F., Nagy J. A., Robbins E., Simon P., Springer T. A. (1983) A human leukocyte differentation antigen family with distinct alpha−subunits and a common beta−subunit: the lymphocyte function−associated antigen (LFA−1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac−1), and the p150,95 molecule. J. Exp. Med. 158, 1785−1803.

Sengelov, H., Kjeldsen, L., Diamond, M. S., Springer, T. A., Borregaard, N. (1993) Subcellular localization and dynamics of Mac−1 (αmß2) in human neutrophils. J. Clin. Invest. 92, 1467−1476.

Sengelov, H., Follin, P., Kjeldsen, L., Lolloke, K., Dahlgren, C., Borregaard, N. (1995) Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. J. Immunol. 154, 4157−4165.

Simon, M. R., Engle, D. E., Weinstock, J. V., Roi, L. D. (1985) The effect of angiotensin II on human mononuclear cell reactivity: suppression of PHA−P−induced thymidine incorporation. Immunol. Invest. 14, 389−400.

Sinha, S., Watorek, W., Karr, S., Giles, J., Bode, W., Travis, J. (1987) Primary structure of human neutrophil elastase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2228−2232.

Smyth, M., Wiltrout, P. J., Trapani, J. (1993) Met−ase: cloning and distinct chromosomal location of a serine protease preferentially expressed in human natural killer cells. J. Immunol. 151, 6195−6205.

Solomon, A., Gramse, M., Havemann, K. (1978) Proteolytic cleavage of human IgG molecules by neutral proteases of plomorphonuclear leukocytes. Eur. J. Immunol. 8, 782−785.

Springer, T. A. (1990) Adhesion receptors of the immune system. Nature 346, 425−434.

Starkey, P. M., Barret, A. J. (1976a) Human lysosomal elastase. Catalytic and immunological properties. Biochem. J. 155, 265−271.

Starkey, P. M., Barret, A. J. (1976b) Human cathepsin G. Catalytic and immunological properties. Biochem. J. 155, 273−278.

Staunton, D. E., Dustin, M. L., Springer, T. A. (1989) Functional cloning of ICAM−2, a cell adhesion ligand for LFA−1 homologous to ICAM−1. Nature 339, 61−64.

Stegeman, C. A., Tervaert, J. W., Sluter, W. J., Manson, W. L., De Jong, P. E., Kallenberg, C. G. M. (1994) Association of chronic nasal carriage of *Staphylococchus aureus* and higher relapse rates in Wegener´s granulomatosis. Ann. Intern. Med. 120, 12−17.

Szebeny, D. M. E., Obendorf, S. K., Moffat, K. (1981) Structure of vitamin D−dependent calcium binding protein from bovine intestine. Nature 294, 327−332.

Takahashi, H., Nukiwa, T., Basset, P., Crystal, R. G. (1988) Myelomonocytic cell lineage expression of the neutrophil elastase gene. J. Biol. Chem. 263, 2543−2547.

Thomas, E. L., Lehrer, R. I., Rest, R. F. (1988) Human neutrophil antimicrobial activity. Rev. Infect. Dis. 10 Suppl 2, S450−S456.

Tian, L., Yoshihara, Y., Mizuno, T., Mori, K., Gahmberg, C. G. (1997) The neuronal glycoprotein telencephalin is a cellular ligand for the CD11a/CD18 leukocyte integrin. J. Immunol. 158, 928−936.

Tiemeyer, M., Swiedler, S. J., Ishihara, M., Moreland, M., Schweingruber, H., Hirtzer, P., Brandley, B. K. (1991) Carbohydrate ligands for endothelial−leukocyte adhesion molecule 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1138−1142.

Tosi, M. F., Berger, M. (1988) Functional differences between the 40 kDa and 50 to 70 kDa IgG Fc receptors on human neutrophils revealed by elastase treatment and antireceptor antibodies. J. Immunol. 141, 2097−2103.

Ueda, T., Rieu, P., Brayer, J., Arnaout, M. A. (1994) Identification of the complement iC3b binding site in the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 10680−10684.

Van Snick, J. (1990) Interleukin−6: an overview. Annu. Rev. Immunol. 8, 253−278.

Van Strijp, J. A. G., Russel, D. G., Tuomanen, E., Brown, E. J., Wright, S. D. (1993) Ligand specificity of purified complement receptor type three (CD11b/CD18, $\alpha_M ß_2$, Mac−1). Indirect effects of an ARG−GLY−ASP (RGD) sequence. J. Immunol. 151, 3324−3336.

Vetvicka, V., Thornton, B. P., Ross, G. D. (1996) Soluble ß−glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b−opsonized target cells. J. Clin. Invest. 98, 50−61.

Violette, S. M., Rusche, J. R., Purdy, S. R., Boyd, J. G., Cos, J., Silver, S. Differences in the binding of blocking anti−CD11b monoclonal antibodies to the A−domain of CD11b. J. Immunol. 155, 3092−3101.

Wakelin, M. W., Sanz, M. J., Dewar, A., Albelda, S. M., Larkin, S. W., Boughton−Smith, N., Williams, T. J., Nourshargh, S. (1996) An anti−platelet−endothelial

cell adhesion molecule−1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through the basement membrane. J. Exp. Med. 184, 229−239.

Walzog, B., Seifert, R., Zakrzewicz, A., Gaehtgens, P., Ley, K. (1994) Cross−linking of CD18 in human neutrophils induces an increase of intracellular free Ca2+, exocytosis of azurophilic granules, quantitative up−regulation of CD18, shedding of L−selectin, and actin polymerization. J. Leukoc. Biol. 56, 625−635.

Walzog, B., Schuppan, D., Heimpel, C., Hafezi−Moghadam, A., Gaehtgens, P., Ley, K. (1995) The leukocyte integrin Mac−1 (CD11b/CD18) contributes to binding of human granulocytes to collagen. Exp. Cell Res. 218, 28−38.

Weiss, S. J., Regiani, S. (1984) Neutrophils degrade subendothelial matrices in the presence of alpha−1−proteinase inhibitor. J. Clin. Invest. 73, 1297−1303.

Weiss, S. J. (1989) Tissue destruction by neutrophils. N. Engl. J. Med. 320, 365−376.

Wong, D. A., Davis, E. M., LeBeau, M., Springer, T. A. (1996) Cloning and chromosomal localization of a novel gene−encoding a human beta 2−integrin alpha subunit. Gene 171, 291−294.

Wright, S. D., Reddy, P. A., Jong, M. T. C., Erickson, B. W. (1987) C3bi receptor (complement receptor type 3) recognizes a region of complement protein C3 containing the sequence Arg−Gly−Asp. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1965−1968.

Wright, S. D., Weitz, J. I., Huang, A. J., Levin, S. M., Silverstein, S. C., Loike, J. D. (1988) Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7734−7738.

Xie, J., Li, R., Kotovuori, P., Vermot−Desroches, C., Wijdenes, J., Arnaout, M. A., Nortamo, P., Gahmberg, C. G. (1995) Intercellular adhesion molecule−2 (CD102) binds to the leukocyte integrin CD11b/CD18 through the A domain. J. Immunol. 155, 3619−3628.

Zhang, L., Plow, E. F. (1996) Overlapping, but not identical, sites are involved in the recognition of C3bi, neutrophil inhibitory factor, and adhesive ligands by the $\alpha_M ß_2$ integrin. J. Biol. Chem. 271, 18211−18216.

Zhang, L., Plow, E. F. (1997) Identification and reconstruction of the binding site within alphaMbeta2 for a specific and high affinity ligand, NIF. J. Biol. Chem. 272, 17558−17564.

Zhang L., Plow E. F. (1999) Amino acid sequence within the alpha subunit of integrin alphaM beta2 (Mac−1) critical for specific recognition of C3bi. Biochemistry 38, 8064−8071.

Zimmer, M., Medcalf, R. L., Fink, T. M., Mattmann, C., Lichter, P., Jenne, D. E. (1992) Three human elastase−like genes coordinately expressed in the myelomonocyte lineage are organized as a single genetic locus on 19pter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 8215−8219.

Besonderen Dank gilt Frau Christiane Meyer, die mir unermüdlich zur Seite stand und in zahlreichen Diskussionen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, für ihr Verständnis und die liebvolle Unterstützung

Herrn Markus Radsak danke ich für die fruchtbaren Gespräche und die stete Diskusionsbereitschaft.

Frau Friderike Hug, Frau Birgit Denefleh und Frau Sabine Stegmeier danke ich für Ihre stete Hilsfbereitschaft und praktischen Ratschläge.

Matthias Tremmel für die unerläßlichen Motivationsstunden im Cafe Botanik.

Allen anderen Mitarbeitern des Instituts danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die freundlichen Hilfestellungen.

Und meinen Eltern, die mir durch Ihre Unterstützung dies erst ermöglichten.

Lebenslauf

Frank Zimmermann

Angaben zur Person

Geburtsdatum und –ort	03.06.1968, Hochheim/Main
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

1974	Einschulung an der Löwenschule Alzey
1986	Realschule mit Abschluß Mittlere Reife, Realschule Alzey
1986–1988	Ausbildung zum chemisch technischen Assistenten an der Kerschensteinerschule Wiesbaden
1986–1988	Friedrich–List–Gymnasium, Wiesbaden mit Abschluß Allgemeine Hochschulreife
1989–1996	Studium der Chemie an der Universität Kaiserslautern mit Abschluß Diplom; Diplomarbeit mit dem Thema „Charakterisierung eines neuartigen Autoantigens mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz“ an der Medizinischen Klinik I, Klinikum der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Beruflicher Werdegang

seit 1996	Promotion am Institut für Immunologie und Serologie der Universität Heidelberg unter der Leitung von Frau Prof. Dr. G. M. Hänsch mit dem Thema „Humane neutrophile Elastase: Identifizierung der $ß_2$–Integrine als Bindungsstellen auf humanen neutrophilen Granulozyten“.