

**Untersuchungen zur Relevanz von Mutationen
der Humanen Neutrophilen Elastase bei kongenitalen
Neutropenien**

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Inga Köllner

geboren am 30.05.1976,
in Danzig

2006

Referent: Prof. Dr. W. Müller
Koreferentin: Prof. Dr. B. Schlegelberger
Tag der Promotion: 27. März 2006

„Es gibt Gedanken, die einen nicht in Ruhe lassen - sie zwingen zum Handeln.“

Peter Ebeling

für Maik, mit dem ich die Musik des Lebens höre

Zusammenfassung

Zur Gruppe der chronischen vererbaren Neutropenien gehören sowohl die schwere kongenitale (SCN) als auch die zyklische Neutropenie (CyN). Diese Störungen der Myelopoese zeichnen sich durch eine konstante beziehungsweise zyklische Verminderung der absoluten Zahl an neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut der Patienten aus. Bedingt durch diesen Defekt, weisen die Patienten häufige, teilweise lebensbedrohliche Infektionen auf. In beiden Erkrankungsbildern wurden heterozygote Mutationen im Gen der Neutrophilen Elastase identifiziert und werden als die Ursache dieser Krankheiten angesehen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Relevanz von Mutationen der Humanen Neutrophilen Elastase bei kongenitalen Neutropenien untersucht werden. Im Vordergrund stand dabei die Untersuchung des Transportes und der Lokalisation der mutanten Neutrophilen Elastase. Zur differenzierten Analyse wurde ein induzierbares System auf Basis der U937T Zelllinie generiert, mit dessen Hilfe die Auswirkungen der Expression unterschiedlicher mutanter Varianten der Neutrophilen Elastase charakterisiert werden konnten.

Mittels diesen experimentellen Systems konnte eine Veränderung des intrazellulären Transportes und der Prozessierung der mutanten Proteine identifiziert werden. Die Störung bedingte eine Mislokalisierung der Neutrophilen Elastase, die in einer zytoplasmatischen Akkumulation der mutanten Proteine resultierte. Des Weiteren war diese Modifikation mit der Suppression der proteolytischen Aktivität und sekretorischen Kapazität der mutanten Elastase assoziiert.

Die Analyse primärer Granulozyten von SCN und CyN Patienten mit Mutationen im *ELA2*-Gen ergab eine identische Akkumulation der mutanten Neutrophilen Elastase im Zytoplasma der Zelle. Diese Beobachtung bestätigte zum ersten Mal die Relevanz der intrazellulären Mislokalisierung der mutanten Neutrophilen Elastase in primären Granulozyten erkrankter Patienten für die Pathogenese der chronischen Neutropenien.

Die Akkumulation mutanter Proteine im Zellmodell resultierte in einem signifikanten Anstieg der Apoptose. Diese Charakteristika stellen Regulationsmechanismen dar, welche in die *Unfolded Protein Response* involviert sind. Im weiteren konnte die Induktion des Chaperones BiP demonstriert werden, welcher als Hauptregulator der *Unfolded Protein Response* beschrieben wird. Zusammen ergeben diese Daten einen bedeutsamen Hinweis, dass die Störung des intrazellulären Transportes der mutanten Neutrophilen Elastase eine Aktivierung der *Unfolded Protein Response* bedingt.

Die Identifizierung diesen Mechanismus trägt zum Verständnis der Bedeutung der Neutrophilen Elastase bei chronischer Neutropenien bei und könnte die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze ermöglichen.

Schlagwörter: chronische Neutropenie, Humane Neutrophile Elastase, *Unfolded Protein Response*

Summary

The group of chronic hereditary neutropenia includes severe congenital (SCN) as well as cyclic neutropenia (CyN). These disturbances of myelopoiesis are characterized by a constant or cyclic reduction of absolute neutrophil granulocyte count in the blood of the patients. This defect is associated with recurrent life-threatening infections. In both diseases mutations have been identified in the gene encoding neutrophil elastase, the cause of the disorders.

This study analyzed the relevance of human neutrophil elastase mutations in congenital neutropenia. The main goal was the analysis of transport and localization of the mutant neutrophil elastase. For this purpose, an *ELA2*-inducible expression system was generated based on the monoblast-like cell line U937, enabling control of the expression of the transgene to study the influence of specific mutations of *ELA2*.

Using this experimental system, an alteration in the intracellular transport and processing of the mutant proteins could be identified. The disruption caused a mislocalization of neutrophil elastase resulting in cytoplasmic accumulation of mutant proteins. Furthermore, the modifications were associated with suppression of proteolytic activity and secretory capacity.

The analysis of primary granulocytes from SCN and CyN patients carrying *ELA2* mutations showed an identical pattern of intracellular accumulation of mutant HNE protein in the cytoplasm. This study confirms for the first time the relevance of intracellular mistrafficking of the mutant neutrophil elastase for the pathogenesis of chronic neutropenia in primary granulocytes.

The accumulation of mutant proteins in the cell model resulted in a significant increase of apoptosis. These characteristics demonstrate regulatory mechanisms involved in the unfolded protein response. In addition, the induction of the chaperone BiP, a master regulator of the UPR, was demonstrated. These data give an important indication that the disturbance of intracellular transport of mutant neutrophil elastase results in an activation of the unfolded protein response.

The identification of this mechanism contributes to understanding the significance of neutrophil elastase in chronic neutropenia and may allow the development of new therapeutic approaches.

Key words: chronic neutropenia, human neutrophil elastase, unfolded protein response

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Schwere chronische Neutropenien | 1 |
| 1.2 | Granula der neutrophilen Granulozyten | 2 |
| 1.3 | Humane Neutrophile Elastase: Prozessierung, Lokalisation und Struktur | 5 |
| 1.4 | Funktion der Humanen Neutrophilen Elastase | 9 |
| 1.5 | Zusammenhang zwischen Mutationen der Neutrophilen Elastase und kongenitalen Neutropenien | 10 |
| 1.6 | Zielsetzung | 16 |
| 2. | Material und Methoden | 18 |
| 2.1 | Molekularbiologische Methoden | 18 |
| 2.1.1 | Klonierungsstrategie | 18 |
| 2.1.2 | Zielgerichtete Mutagenese | 19 |
| 2.1.3 | Isolierung von Plasmid-DNA | 21 |
| 2.1.4 | Restriktionsanalyse von DNA | 21 |
| 2.1.5 | Agarosegel-Elektrophorese | 21 |
| 2.1.6 | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 22 |
| 2.1.7 | Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten | 22 |
| 2.1.8 | Ligation | 22 |
| 2.1.9 | Transformation | 23 |
| 2.1.10 | Isolierung von RNA | 24 |
| 2.1.11 | cDNA-Synthese | 24 |
| 2.1.12 | Quantitative <i>Real-Time</i> RT-PCR | 25 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.2 | Zellbiologische Methoden | 26 |
| 2.2.1 | Kultivierung von Zelllinien | 26 |
| 2.2.2 | Viruspartikelproduktion und retrovirale Transduktion | 27 |
| 2.2.3 | Bestimmung des Virus-Titers | 28 |
| 2.2.4 | Isolierung von Einzelzellklonen | 28 |
| 2.2.5 | Induktion der HNE-Expression | 29 |
| 2.2.6 | Transiente Transfektion | 29 |
| 2.2.7 | Isolierung von mononukleären und polymorphnukleären Zellen aus peripherem Blut | 29 |
| 2.2.8 | Herstellung mikroskopischer Präparate aus Granulozyten | 30 |
| 2.3 | Biochemische Methoden | 31 |
| 2.3.1 | Isolierung von Proteinen | 31 |
| 2.3.2 | Bestimmung der Proteinkonzentration | 31 |
| 2.3.3 | Aceton-Fällung von Proteinen | 32 |
| 2.3.4 | Immunpräzipitation | 32 |
| 2.3.5 | Subzelluläre Fraktionierung | 33 |
| 2.3.6 | Endoglykosidase-H/F-Sensitivität | 34 |
| 2.3.7 | Proteinase K-Sensitivität | 34 |
| 2.3.8 | Peptid-Blockierung des Antikörpers | 35 |
| 2.3.9 | SDS-PAGE und Western Blot | 35 |
| 2.3.10 | Bestimmung der proteolytischen Aktivität | 37 |
| 2.3.11 | HNE-ELISA | 38 |
| 2.3.12 | FACS-Analyse von HNE an der Zelloberfläche | 39 |
| 2.3.13 | Annexin V-Markierung | 40 |
| 2.3.14 | Induktion von ER-Stress | 40 |
| 2.3.15 | Immunfluoreszenz-Färbung und konfokale Lasermikroskopie | 40 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3. | Ergebnisse | 42 |
| 3.1 | Generierung und Charakterisierung des U937T Zellmodells | 42 |
| 3.1.1 | Generierung des Tetrazyklin-abhängigen Genexpressionsystems | 42 |
| 3.1.2 | Charakterisierung des HNE-spezifischen Antikörpers | 46 |
| 3.1.3 | Charakterisierung der Induktion der HNE-Genexpression auf RNA- und Protein-Ebene | 47 |
| 3.2 | Analyse der Lokalisation und Funktion von HNE in Zelllinien | 51 |
| 3.2.1 | Analyse des Glykosylierungsmusters der HNE in U937T | 51 |
| 3.2.2 | Analyse der Lokalisation der HNE in U937T mittels differentieller Zentrifugation | 54 |
| 3.2.3 | Analyse der Lokalisation der HNE mittels konfokaler Lasermikroskopie in HeLa | 56 |
| 3.2.4 | Analyse der Sekretion von HNE in U937T | 59 |
| 3.2.5 | Analyse der proteolytischen Aktivität von HNE in U937T | 60 |
| 3.2.6 | Analyse der CPT-abhängigen Apoptose in U937T | 62 |
| 3.2.7 | Analyse der Induktion von ER-Stress in HeLa | 65 |
| 3.2.8 | Analyse der BiP-Expression in U937T | 66 |
| 3.3 | Analyse der Lokalisation von HNE in primären Zellen | 69 |
| 3.3.1 | Analyse der Lokalisation der HNE mittels differentieller Zentrifugation | 69 |
| 3.3.2 | Analyse der Lokalisation der HNE mittels konfokaler Lasermikroskopie | 71 |
| 3.4 | Topologie der Humanen Neutrophilen Elastase | 73 |
| 3.4.1 | Analyse der Lokalisation der HNE in U937T mittels FACS | 73 |
| 3.4.2 | Analyse der Topologie der HNE in U937T mittels Proteinase K-Behandlung | 75 |
| 3.4.3 | Analyse der sezernierten Form der HNE in U937T | 77 |
| 3.4.4 | Analyse der Interaktion zwischen AP3 und der HNE | 78 |
| 3.4.5 | Lokalisation der HNE nach Mutation des Tyrosin-basierenden Signals | 79 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4. | Diskussion | 81 |
| 4.1 | Generierung des Tetrazyklin-abhängigen Genexpressionsystems | 82 |
| 4.2 | Mutationen der Neutrophilen Elastase führen zu einem Transportdefekt des Proteins in U937T | 84 |
| 4.3 | Mutationen der Neutrophilen Elastase resultieren in einer zytoplasmatischen Akkumulation des Proteins in U937T | 88 |
| 4.4 | Mutationen der Neutrophilen Elastase führen zu einem Transportdefekt und zytoplasmatischer Akkumulation des Proteins bei Patienten mit SCN und CyN | 90 |
| 4.5 | Mutationen der Neutrophilen Elastase rufen Stressantworten der Zellen hervor | 91 |
| 4.6 | Die Neutrophile Elastase stellt ein membran-assoziiertes, aber kein Transmembranprotein dar | 99 |
| 4.7 | Ausblick | 109 |
| 5. | Anhang | 111 |
| 5.1 | Literaturverzeichnis | 111 |
| 5.2 | Abkürzungsverzeichnis | 122 |
| 5.3 | Curriculum Vitae | 124 |
| 5.4 | Danksagung | 125 |
| 5.5 | Eidesstattliche Erklärung | 127 |

1. Einleitung

1.1 Schwere chronische Neutropenien

Schwere chronische Neutropenien sind seltene, hämatologische Erkrankungen, die durch eine Störung der Blutbildung gekennzeichnet sind. 1956 beschrieb R.R.O. Kostmann erstmals ein Krankheitsbild, das durch einen Ausreifungsstopp der myeloischen Vorläuferzellen auf Stufe der Promyelozyten/Myelozyten charakterisiert war (Kostmann, 1956). Er bezeichnete diesen angeborenen Defekt in der Myelopoese als „kongenitale Agranulozytose“. Heute ist dieser Defekt unter der Definition „schwere kongenitale Neutropenie“ (SCN) bekannt und stellt eine Form der chronischen Neutropenien dar. Diese Erkrankung tritt sowohl sporadisch, autosomal-rezessiv als auch autosomal-dominant auf. Die Symptomatik der kongenitalen Neutropenie zeichnet sich durch eine signifikante Verminderung der Zahl neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut der Patienten aus. Daraus resultieren sehr schwere, rezidivierende, häufig lebensbedrohliche Infektionen (Kostmann, 1975).

Neben der schweren kongenitalen gehört auch die zyklische Neutropenie (CyN) zur Gruppe der chronischen Neutropenien. Sie zeichnet sich durch eine periodisch auftretende Verminderung der Zahl der neutrophilen Granulozyten aus. Die Zyklusdauer beträgt durchschnittlich 21 Tage, kann aber zwischen 15 und 35 Tagen variieren. Neben den Granulozyten kann man auch die Oszillation der Monozyten und der Lymphozyten beobachten (Dale *et al.*, 1988). Aus diesem Grund wird die zyklische Neutropenie häufig auch als zyklische Hämatopoese bezeichnet. Die Häufigkeit dieser Erkrankung, die autosomal-dominant vererbt wird, aber auch sporadisch auftreten kann, liegt bei circa 0,5- 1 Erkrankungen pro 1 Million Einwohner (Schiller *et al.*, 2001).

Die Prognose der Mehrzahl der Patienten mit kongenitaler Neutropenie verbesserte sich entscheidend, als Ende der achtziger Jahre der rekombinante humane Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (r-HuG-CSF) zum klinischen Einsatz kam (Bonilla *et al.*, 1989; Welte *et al.*, 1990). Über 90 % der Patienten sprachen auf eine G-CSF Behandlung mit einer Erhöhung der Granulozytenzahlen und einer damit assoziierten Reduktion der

Infektionen an (Bonilla *et al.*, 1994). Eine Knochenmarktransplantation, die früher die einzige Heilungsmöglichkeit darstellte, war damit nicht mehr notwendig (Rappeport *et al.*, 1980).

Dessen ungeachtet kann bei Patienten mit schwerer kongenitaler Neutropenie ein Auftreten leukämischer Transformationen registriert werden (Gilman *et al.*, 1970). Infolge eines mit circa 13 % erhöhten Leukämie- oder Myelodysplasierisikos wird bei diesen Patienten eine jährliche Untersuchung des Knochenmarkes empfohlen (Dale *et al.*, 2003). Beobachtungen zeigen, dass bei den malignen Transformationen G-CSF-Rezeptor-Mutationen auftreten, die zusätzlich mit weiteren genetischen Aberrationen, wie Monosomie 7 oder Mutationen des Onkogens *Ras*, verbunden sind (Freedmann *et al.*, 2000; Kalra *et al.*, 1995). Über ein gehäuftes Vorkommen von Transformationen wird bei Patienten mit zyklischer Neutropenie nicht berichtet. Inwieweit Leukämien ein charakteristisches Merkmal des Krankheitsbildes der schweren kongenitalen Neutropenie darstellen, ist weitgehend unbekannt.

1.2 Granula der neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind spezialisierte phagozytisch aktive Zellen, die unterschiedliche Granula für die regulierte Sekretion beinhalten. Die Bildung der Granula beginnt durch das Ablösen von Transportvesikeln aus dem Golgi-Apparat und der Fusion mehrerer dieser Vesikel auf der Stufe der Myeloblast/Promyelozytbildung (Bainton *et al.*, 1966). Die verschiedenartigen neutrophilen Granula unterscheiden sich in ihrer Größe, Dichte sowie Zusammensetzung der Proteine und reflektieren so die unterschiedlichen Stadien der myeloischen Differenzierung, während der sie gebildet werden (**Abbildung 1**) (Bainton *et al.*, 1971). Die Granula werden als azurophile (primäre), spezifische (sekundäre) und Gelatinase- (tertiäre) Granula sowie sekretorische Vesikel klassifiziert (Borregaard und Cowland, 1997). Als spezifische Marker der einzelnen Granula werden hierbei Myeloperoxidase, Lactoferrin, Gelatinase sowie Albumin beschrieben. Obwohl einige Proteine wie beispielsweise das Lysozym als ein Protein aller drei Granulatypen beschrieben werden, ist die Proteinzusammensetzung der Granula sehr heterogen (Leffell *et al.*, 1972, Lollike *et al.*, 1995). Diese heterogenen Inhalte der Granula resultieren aus der

variierenden Biosynthese der Proteine im Laufe der Reifung der Granulozyten. Die Kontrolle der Proteinbiosynthese wird vorwiegend von phasen-spezifischen Transkriptionsfaktoren übernommen, welche die Genexpression dieser granulären Proteine regulieren (Borregaard und Cowland, 1997).

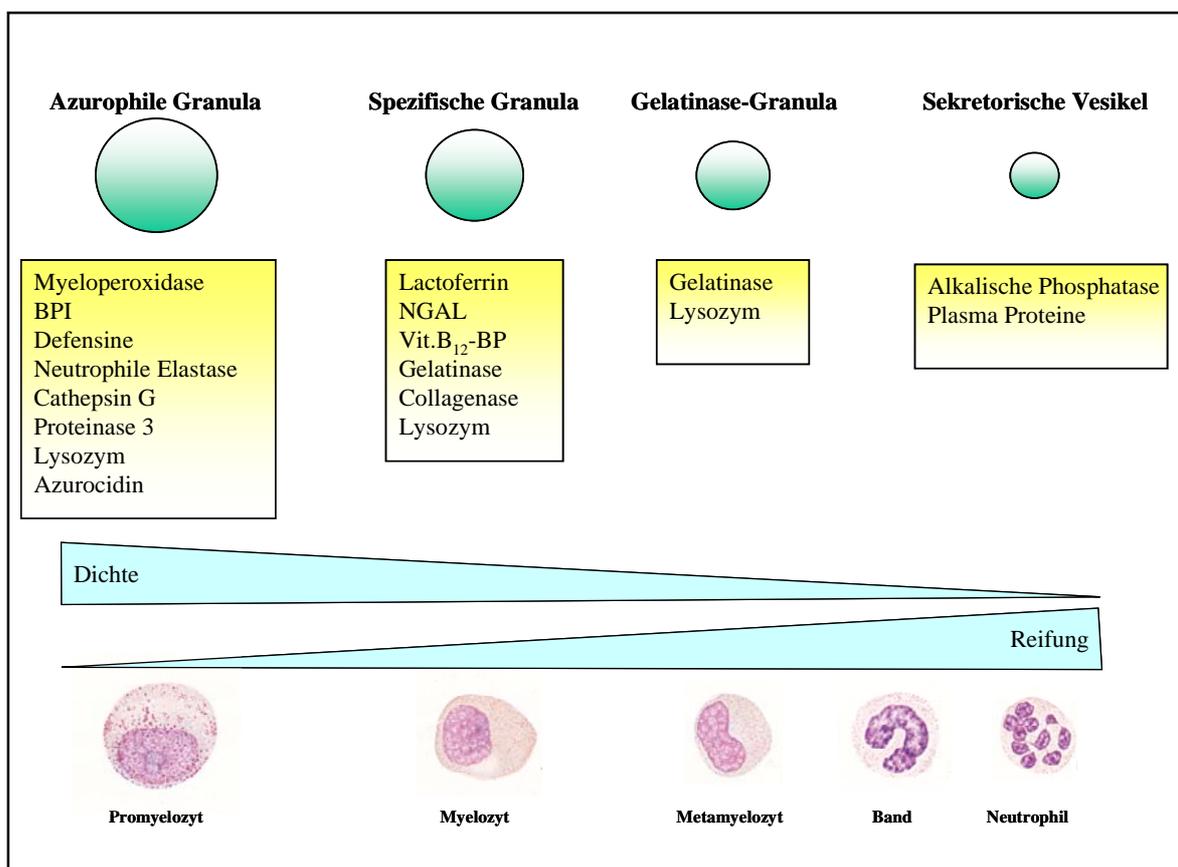


Abb. 1 Neutrophile Granula. Die azurophilen, spezifischen und Gelatinase-Granula sowie die sekretorischen Vesikel unterscheiden sich in Größe, Dichte und Proteingehalt und reflektieren so die unterschiedlichen Stadien der myeloischen Differenzierung, während der sie gebildet werden (modifiziert nach Gullberg *et al.*, Journal of Immunological Methods 1999).

Die azurophilen Granula werden während der promyelozytären Phase der Differenzierung gebildet. Sie beinhalten proteolytische Proteine wie die Neutrophile Elastase und Myeloperoxidase, die von großer Wichtigkeit bei der Phagozytose sind (Baggiolini *et al.*, 1972). Die spezifischen Granula werden über Lactoferrin und Vitamin B₁₂-Bindungsprotein definiert. Im Gegensatz zu den Membranen der azurophilen Granula, welche nur geringfügig Proteine aufweisen, beinhalten die Membranen dieser Granula eine Vielzahl an unterschiedlichen Proteinen. Neben der phagozytierenden Funktion sind einige dieser Proteine in die Adhärenz der Neutrophilen involviert (Gallin *et al.*, 1984; Bainton *et*

al., 1987). Die dritte Fraktion der Granula, die Gelatinase-Granula, besitzen eine ähnliche Membranstruktur wie die spezifischen Granula. Sie enthalten eine beträchtliche Menge an Gelatinase und sind insbesondere an der Migration der Neutrophilen Granulozyten beteiligt (Delclaux *et al.*, 1996). Die Klasse der sekretorischen Vesikel zeigt eine sehr hohe Sensitivität gegenüber Entzündungsmediatoren (Sengeløv *et al.*, 1993). Diese Vesikel können aufgrund ihrer kleinen Größe und Dichte, im Gegensatz zu den relativ großen azurophilen Granula, schnell mobilisiert werden. Funktionell teilen sich die unterschiedlichen Subtypen der Granula einige Aufgabenbereiche, weisen aber auch spezifische Funktionen auf, die von der Proteinzusammenstellung abhängig sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Granula ebenfalls miteinander interagieren. Beispielsweise wird das Protein Cathelicidin, das in den spezifischen Granula lokalisiert ist, durch eine proteolytische Prozessierung des N-Terminus durch die azurophilen Proteasen aktiviert (Peppin *et al.*, 1986).

Die unterschiedlichen Zusammensetzungen der granulären Proteine erfordern eine grundsätzliche Steuerung des intrazellulären Transportes in das gewünschte granuläre Kompartiment. Es konnte gezeigt werden, dass Oligosaccharide nicht als Sortiersignale fungieren, da auch mutante Formen von Cathepsin G mit fehlender Glykosylierung ein normales Transportverhalten aufweisen (Garwicz *et al.*, 1995). Aufgrund der Gemeinsamkeiten der Granula der neutrophilen Granulozyten zu den Lysosomen wurde vermutet, dass die granulären Proteine gleichermaßen wie die lysosomalen Proteine über den Mannose-6-Phosphat-Weg zu ihrem Zielort sortiert werden könnten. Dies konnte jedoch ebenfalls nicht bestätigt werden und die Frage nach dem Sortierungsmechanismus bleibt daher weiterhin ungeklärt (Nauseef *et al.*, 1992). Da bisher noch keine molekulare Adresse in der Proteinsequenz der granulären Proteine gefunden wurde, wird von Le Cabec *et al.* ein passiver Transportmechanismus postuliert (Le Cabec *et al.*, 1996). Er nimmt an, dass keine spezifische Zielsteuerung der Proteine zu den individuellen Granula erforderlich ist, da alle zeitgleich synthetisierten Proteine in den gleichen Granula lokalisiert sind. Da die Aktivierung der Gene der granulären Proteine mit der sequentiellen Formation der Granula synchronisiert ist, scheint deren Inhalt von dem bestehenden Angebot abhängig zu sein (Borregaard *et al.*, 1995).

Für viele Proteine der azurophilen Granula konnte nicht nur die regulierte Sekretion, welche nach einem Stimulus eingeleitet wird, gezeigt werden, sondern wurden inzwischen auch konstitutiv sezernierte Formen identifiziert (Garwicz *et al.*, 2005). Jedoch bestehen Unklarheiten über den Mechanismus, der zwischen der regulierten und der konstitutiven Sekretion der granulären Proteine unterscheidet. Es wird angenommen, dass Proteine, die für eine Speicherung in den Granula bestimmt sind, eine spezifische Proteinaggregation erfahren (Chanat *et al.*, 1991). Alle Proteine, denen die Fähigkeit zur Aggregatbildung fehlt, würden automatisch konstitutiv sezerniert. Sowohl bei den lysosomalen als auch bei den azurophilen Proteinen wurden konstitutiv sezernierte Proteine in der unprozessierten Proform gefunden. Es wird vermutet, dass diese Proform eine andere Konformation als das reife Protein annimmt und auf diese Weise eine konstitutive Sekretion möglich wird (Gullberg *et al.*, 1997). Es bleibt weiterhin ein relevanter Gegenstand der Forschung, ob Motive in der Proteinsequenz existieren, die für die Sortierung granulärer Proteine entscheidend sind.

1.3 Humane Neutrophile Elastase: Prozessierung, Lokalisation und Struktur

Die azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten beinhalten vorwiegend Proteine aus der Familie der Serinproteasen. Dazu gehören Cathepsin G, Neutrophile Elastase, Proteinase 3 und Azurocidin. Zusammen mit den Serinproteasen Proteinase 3 und Azurocidin ist das Gen für die Neutrophile Elastase (*ELA2*) in einer Region auf Chromosom 19p13.3 organisiert (Zimmer *et al.*, 1992). Das Gen für *ELA2* umfasst fünf kodierende Exons und vier Introns, wobei das reife Protein in den Exons zwei bis fünf kodiert wird (Takahashi *et al.*, 1988).

Die Neutrophile Elastase wird als ein inaktives Zymogen synthetisiert und ist aus 267 Aminosäuren aufgebaut (**Abbildung 2**) (Takahashi *et al.*, 1988). Der N-Terminus besteht aus 27 Aminosäuren und umfasst vermehrt hydrophobe Aminosäuren, die eine Signalsequenz für den Transport in das endoplasmatische Retikulum darstellen und bereits ko-translationell entfernt werden. Dieses sogenannte Pre-Signalpeptid wird von einem

Pro_N-Dipeptid gefolgt, das durch die Aminosäuren Serin-2 und Glutamin-1 kodiert wird und der Inhibierung einer vorzeitigen Aktivierung der Protease dient.

Über „pulse chase“-Experimente sowie subzelluläre Fraktionierung konnte der Transport und die Prozessierung der Neutrophilen Elastase in der Arbeitsgruppe von Inge Olsson charakterisiert werden (Gullberg *et al.*, 1995). Das erste Translationsprodukt der HNE, das gefunden wurde, beträgt 32 kD. Im ER werden mannosereiche Oligosaccharide an die beiden Glykosylierungsstellen Asparagin-95 und Asparagin-144 angefügt, die in den *cis*-Golgi Zisternen in komplexe Oligosaccharide konvertiert werden. Dieser Prozess entspricht der Modifikation in eine 34 kD-Form. Sowohl die 32 kD- als auch die 34 kD Variante wurden in Fraktionen, welche den ER/Golgi-Kompartimenten entsprechen, gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass zunächst das C-terminale Ende des Proteins entfernt wird, und erst dann die Aktivierung der Protease durch die Abspaltung des Dipeptides am Aminoterminus stattfindet. Diese Reaktion wird durch das Enzym Dipeptidyl Peptidase I (DPP I) katalysiert und findet vermutlich während oder erst nach dem Transfer in die Granula statt. Welches Protein an der Prozessierung des C-Terminus beteiligt ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Dieses 20 Aminosäuren umfassende Pro_C-Peptid besteht aus hydrophoben, sauren und basischen Aminosäuren und besitzt eine bisher unbekannt Funktion. Untersuchungen mit einer carboxy-terminal deletierten Elastase wiesen eine korrekte Prozessierung und enzymatische Aktivierung in RBL-Zellen auf (Gullberg *et al.*, 1995).

Der Transport der Neutrophilen Elastase zu ihrem Bestimmungsort nimmt etwa zwei Stunden in Anspruch. Das prozessierte, biologisch aktive Protein besteht aus 218 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 31 kD. Es ist für mindestens fünf Stunden stabil, wobei ein geringfügiger Teil an Elastase langsam in eine 29 kD-Form prozessiert wird (Gullberg *et al.*, 1995).

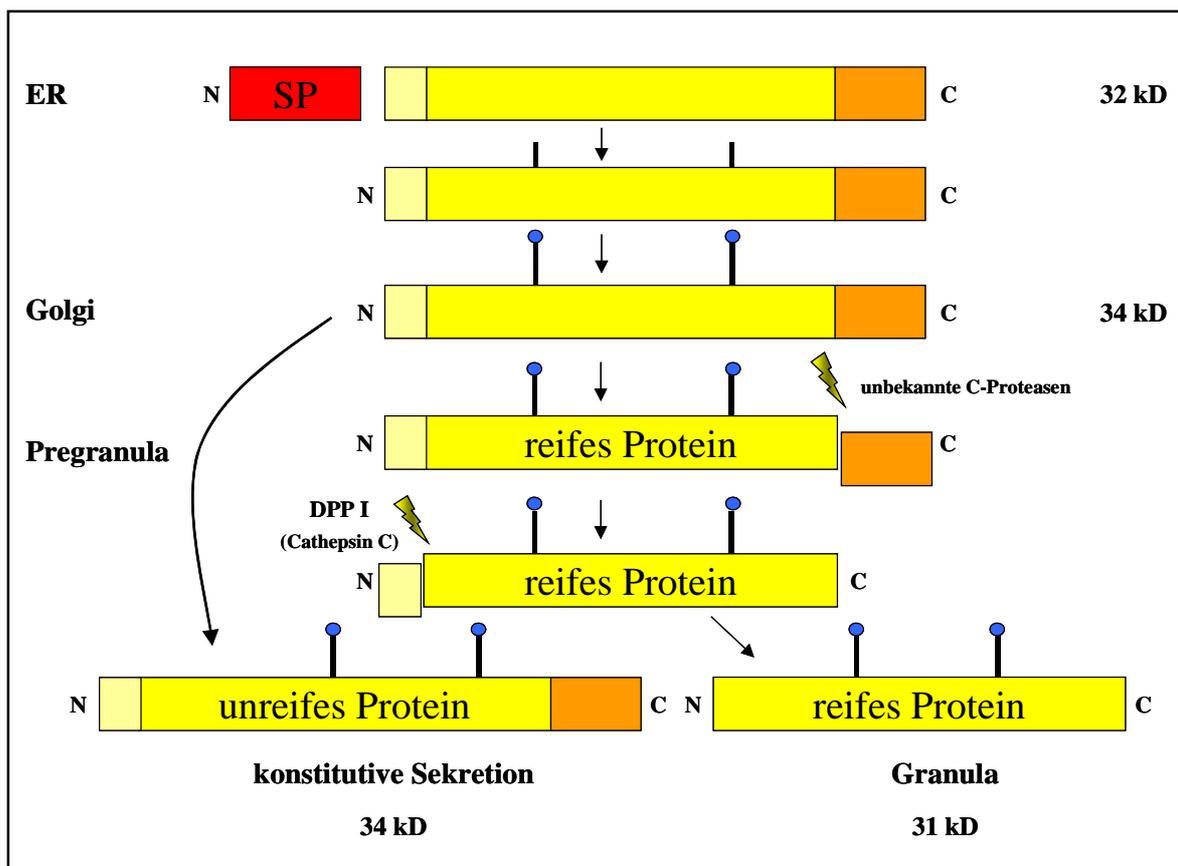


Abb. 2 Schematische Darstellung der Prozessierung der Humanen Neutrophilen Elastase. Bereits ko-translationell wird das Signalpeptid der Elastase entfernt. Im ER erfolgt die mannosereiche Glykosylierung des Proteins, die im Golgi-Kompartiment in komplexe Oligosaccharide konvertiert wird. Sekundär erfolgt die Abspaltung des C-terminalen Peptides sowie die Aktivierung der Protease durch das Entfernen des amino-terminalen Dipeptides durch DPP I. Eine vermutlich unprozessierte Proform (mit C- und N-Terminus) wird über die konstitutive Sekretion aus der Zelle ausgeschleust.

Während die Konzentration von Proteinase 3 bei 13,4 mM liegt (Campbell *et al.*, 2000), beträgt die Konzentration der Neutrophilen Elastase in den neutrophilen Granulozyten circa 5 mM (Liou *et al.*, 1995). Jeder neutrophile Granulozyt beinhaltet etwa 400 HNE-positive Granula, womit sich die zelluläre Gesamtmenge an Elastase auf 1 bis 2 Picogramm beläuft (Vender, 1996). Außer in den neutrophilen Granulozyten wird die Elastase ebenfalls in geringfügigen Mengen in Monozyten detektiert (Gullberg *et al.*, 1997). Die Elastase ist insbesondere im Lumen der azurophilen Granula lokalisiert, konnte aber ebenfalls an der Plasmamembran der neutrophilen Granulozyten, der granulären Membran, in der Kernhülle sowie den Golgi-Membranen nachgewiesen werden (Owen *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1980a; Clark *et al.*, 1980b). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Protease an der Plasmamembran der Monozyten lokalisiert ist (Allen *et al.*, 1995). Des weiteren konnte eine unprozessierte Form (34 kD) der Neutrophilen Elastase als

sezernierte Form im Kulturmedium identifiziert werden, die eine nur minimale proteolytische Aktivität aufwies (Senior *et al.*, 1982).

Die Neutrophile Elastase enthält eine konservierte katalytische Domäne, die aus drei Aminosäuren zusammengesetzt ist (Bode *et al.*, 1989). Die Struktur der Neutrophilen Elastase wird durch vier Disulfidbrücken stabilisiert. Ein weiteres mutmaßliches Motiv stellt das Tyrosin-basierende Sortierungssignal mit der Proteinsequenz LYPDA an Position 198 dar (Benson *et al.*, 2003). Von Horwitz und Kollegen wird postuliert, dass diese Sequenz durch den Adaptorprotein-Komplex 3 (AP3) erkannt wird, und somit für den Transport des Proteins über das *trans*-Golgi-Netzwerk in die Granula verantwortlich sein soll. Jedoch wäre hierzu eine transmembrane Konformation der Neutrophilen Elastase erforderlich, da nur Transmembranproteine von AP3 erkannt werden. Interessanterweise weist die Proteinsequenz tatsächlich zwei potentielle Transmembrandomänen auf. Diese befinden sich sowohl am N- als auch am C-terminalen Ende des Proteins und umspannen teilweise Aminosäuren des aktiven Zentrums der Neutrophilen Elastase. Die schematische Struktur der Humanen Neutrophilen Elastase ist in **Abbildung 3** dargestellt.

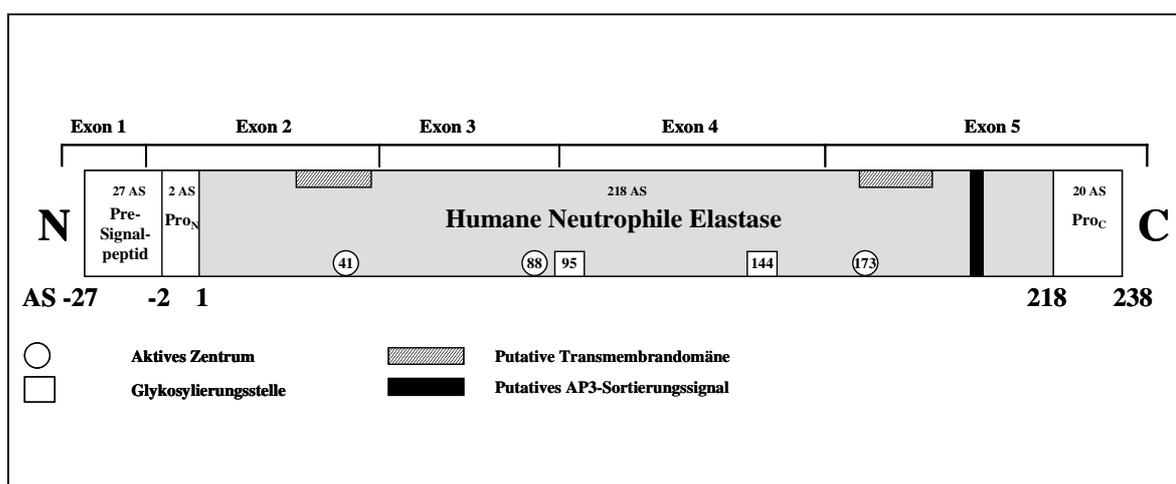


Abb. 3 Schematische Darstellung der Struktur der Humanen Neutrophilen Elastase. Die reife Neutrophile Elastase ist ein Protein mit 218 AS. N-terminal befindet sich in der Proform zusätzlich ein Signalpeptid, das ko-translationell entfernt wird. Während des Transportes der Neutrophilen Elastase werden der C- und der N-Terminus prozessiert und das Protein durch zwei komplexe N-Glykosylierungen (Asn-95 und Asn-144) modifiziert. An Position 198 findet man ein Tyrosin-basierendes Signal, das für den Transport dieses Proteins wichtig sein könnte. Das aktive Zentrum der HNE bilden die AS His-41, Asp-88 und Ser-173. Die Proteinsequenz enthält außerdem hypothetische Transmembrandomänen.

1.4 Funktion der Humanen Neutrophilen Elastase

Die Hauptfunktion der Neutrophilen Elastase besteht in der Abwehr gramnegativer Bakterien (Belaajouaj *et al.*, 1998). Diese Protease zeichnet sich durch eine konservierte katalytische Domäne aus, die aus den drei Aminosäuren Histidin-41, Asparagin-88 und Serin-173 besteht (Bode *et al.*, 1989). HNE ist in der Lage, eine sehr große Vielfalt an Proteinen, unter anderem Fibronectin, Kollagen, Elastin, Fibrin und Zytokine, zu degradieren (Lee *et al.*, 2001). Außerdem kann die Elastase auch lösliche Proteine, wie Immunglobuline und Koagulationsfaktoren, katalytisch spalten. Es gibt auch eine Vielzahl synthetischer Substrate, die von der Elastase erkannt werden und häufig eingesetzt werden, um die Aktivität und Spezifität des Enzyms zu überprüfen (Barrett, 1981). Bekannte, physiologisch vorkommende Elastase-Inhibitoren sind α 1-Proteinaseinhibitor, SLPI, α 2-Macroglobulin und Eglin (Sallenave *et al.*, 1999; Wewers *et al.*, 1988). Auch spezifische synthetische HNE-Inhibitoren werden vielfach in Analysen verwendet.

Zu den potentiellen Substraten der Neutrophilen Elastase gehört auch G-CSF, ein Wachstumsfaktor, der für die neutrophile Granulopoese benötigt wird. Er stimuliert die Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen der neutrophilen Granulozyten und der Monozyten. Kürzlich konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die Neutrophile Elastase *in vitro* die Aktivität von G-CSF blockiert, indem die Protease dieses Zytokin enzymatisch spaltet (Hunter *et al.*, 2003; Carter *et al.*, 2004, El Ouriaghli *et al.*, 2003). Interessanterweise stellten Carter *et al.* (2004) jedoch fest, dass das natürlich vorkommende, glykosylierte G-CSF eine Resistenz gegenüber der Degradation durch die Elastase aufweist. Erst nach einer längeren Exposition mit der Neutrophilen Elastase wurde auch glykosyliertes G-CSF von der Protease gespalten.

Die Elastase fungiert zusätzlich als ein negativer Regulator der Entzündungsreaktion. *In vitro* Studien zeigten den Abbau von Il-2 und Il-6. Über die Spaltung von Il-2 durch die Protease, welches normalerweise die T-Zell-Chemotaxis induziert, konnte eine Beeinträchtigung der T-Zell-Migration und somit eine Modulation der Inflammation nachgewiesen werden (Ariel *et al.*, 1998). Weitere *in vitro* Studien weisen darauf hin, dass die Elastase auch in die Adhäsion der neutrophilen Granulozyten involviert ist. Durch die Bindung an das Integrin CR3 (Mac-1) inhibiert die Elastase die Interaktion zwischen CR3 und dessen Liganden und beeinflusst auf diese Weise die Adhäsion und Migration der

neutrophilen Granulozyten (Cai *et al.*, 1996). Doch konnte nicht nur die Suppression der Entzündungsreaktion durch die Elastase nachgewiesen werden, sondern auch eine potentielle proinflammatorische Wirkung dieses Proteins. Durch die Spaltung von α 1-Proteinaseinhibitor entsteht ein Fragment, das chemotaktisch auf die neutrophilen Granulozyten wirkt (Banda *et al.*, 1988). Außerdem induziert die Protease auch die Sekretion von Il-8 und verstärkt dadurch die Migration der neutrophilen Granulozyten (Nakamura *et al.*, 1992).

Aufgrund ihrer degradierenden Eigenschaften wird die Neutrophile Elastase mit einer Vielzahl an gewebezerstörender Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Ihre Rolle wird beispielsweise immer wieder bei der Pathogenese der zystischen Fibrose (Stromatt, 1993; Doring, 1994) sowie auch bei der akuten Lungenentzündung beschrieben (Kawabata *et al.*, 2002).

1.5 Zusammenhang zwischen Mutationen der Neutrophilen Elastase und kongenitalen Neutropenien

Mittels positioneller Klonierungsverfahren konnte von Horwitz und Mitarbeitern der genetische Locus für die autosomal-dominante Form der zyklischen Neutropenie auf Chromosom 19p13.3 identifiziert werden (Horwitz *et al.*, 1999). Sequenzanalysen an Patienten mit zyklischer Neutropenie ergaben heterozygote Mutationen im Gen der Neutrophilen Elastase, welches innerhalb dieser Region lokalisiert ist. Später konnte bestätigt werden, dass Mutationen im Gen der Neutrophilen Elastase vermutlich die häufigste Ursache nicht nur von sporadischer sowie autosomal-dominanter Formen der zyklischen Neutropenie, sondern auch der schweren kongenitalen Neutropenie darstellen (Dale *et al.*, 2000). Mutationen der Neutrophilen Elastase sind über die gesamte Sequenz des Gens verteilt. Die inzwischen mehr als 40 identifizierten unterschiedlichen Mutationen im *ELA2*-Gen betreffen nicht nur das reife Protein, sondern sind auch in der Promotorregion sowie der Prodomäne zu finden (Bellanné-Chantelot *et al.*, 2004). Eine bislang vollständige Zusammenstellung der bisher gefundenen Mutationen im *ELA2*-Gen präsentierte Bellanné-Chantelot und Kollegen, die auch eine Korrelation zwischen den Mutationen der Elastase und dem Schweregrad der Erkrankung herstellten (**Tabelle 1**). Sie

berichteten über heterozygote Mutationen im *ELA2*-Gen bei 35 % der Patienten mit SCN und 44 % der Patienten mit CyN.

Tab. 1 Identifizierte Mutationen im *ELA2*-Gen

| Nr. | Lokalisation | DNA-Ebene | Protein-Ebene | Mutationstyp | Phänotyp |
|-----|--------------|----------------|---------------|---|----------|
| 1 | Promotor | 1246C>A | - | Expressionsabnormalität ? | 1 |
| 2 | Promotor | -199C>A | - | Expressionsabnormalität ? | 1 |
| 3 | Exon 1 | 1287A>G | II-29A>G | Expressionsabnormalität ? | 1 |
| 4 | Exon 2 | 1843C>T | P13L | Missense | 1 |
| 5 | Exon 2 | 1847C>A | F14L | Missense | 2 |
| 6 | Exon 2 | 1855C>T | S17F | Missense | 2 |
| 7 | Exon 2 | 1858T>C | L18P | Missense | 1 |
| 8 | Exon 2 | 1876A>T | H24L | Missense | 1 |
| 9 | Exon 2 | 1882G>A | C26Y | Missense | 1 |
| 10 | Exon 2 | 1887G>A | A28T | Missense | 1 |
| 11 | Exon 2 | 1897T>C | I31T | Missense | 1 |
| 12 | Exon 2 | 1900C>T | A32V | Missense | 2 |
| 13 | Exon 2 | 1912T>A | V36D | Missense | 1 |
| 14 | Exon 2 | 1929T>C | C42R | Missense | 1 |
| 15 | Exon 2 | 1929T>A | C42S | Missense | 1 |
| 16 | Exon 3 | 2190G>C | R52P | Missense | 1 |
| 17 | Exon 3 | 2192G>A | V53M | Missense | 2 |
| 18 | Exon 3 | 2199T>C | L55P | Missense | 1 |
| 19 | Exon 3 | 2202G>A | G56E | Missense | 1 |
| 20 | Exon 3 | 2249G>A | V72M | Missense | 1 |
| 21 | Exon 3 | 2310T>C | L92P | Missense | 1 |
| 22 | Intron 3 | IVS3-8C>A | InsPQ94 | Splicing Defekt | 1 |
| 23 | Exon 4 | 4495C>T | S97L | Missense | 1, 2 |
| 24 | Exon 4 | 4496G>C | A98P | Missense | 1 |
| 25 | Exon 4 | 4534C>T | P110L | Missense | 1, 2 |
| 26 | Exon 4 | 4569T>A | C122S | Missense | 1 |
| 27 | Exon 4 | 4570G>A | C122Y | Missense | 1 |
| 28 | Exon 4 | 4573T>C | L123P | Missense | 1 |
| 29 | Exon 4 | Δ4638-4661 | ΔV145-C152 | In-frame Deletion | 1 |
| 30 | Exon 4 | Δ4675-4715 | ΔV157-F170 | In-frame Deletion | 2 |
| 31 | Exon 4 | 4708-4709ins5T | V168fsX184 | Nonsense | 1 |
| 32 | Intron 4 | IVS4+1G>A | ΔV161-F170 | In-frame Deletion | 1, 2 |
| 33 | Intron 4 | IVS4+3A>T | - | Splicing Defekt | 2 |
| 34 | Intron 4 | IVS4+5G>A | - | Splicing Defekt | 1 |
| 35 | Exon 5 | 4898C>G | P176R | Missense | 2 |
| 36 | Exon 5 | 4902T>C | L177F | Missense | 1 |
| 37 | Exon 5 | 4913G>T | G181V | Missense | 1 |
| 38 | Exon 5 | 4924G>A | G185R | Missense | 1 |
| 39 | Exon 5 | 4939G>A | V190I | Missense | 2 |
| 40 | Exon 5 | 4943G>A | R191Q | Missense | 1, 2 |
| 41 | Exon 5 | 4945G>T | G192Stop | Nonsense | 1 |
| 42 | Exon 5 | 4953C>A | C194Stop | Nonsense | 1 |
| 43 | Exon 5 | 4958C>A | S196Stop | Nonsense | 1 |
| 44 | Exon 5 | 4968C>A | Y199Stop | Nonsense | 1 |
| 45 | Exon 5 | 4971ΔC | P200fsX210 | Nonsense | 1 |
| 46 | Exon 5 | 4972ΔG | D201fsX210 | Nonsense | 1 |
| 47 | Exon 5 | 4986ΔC | P205fsX210 | Nonsense | 1 |
| 48 | Exon 5 | 5054C>T | P228L | Seltener Polymorphismus | 1 |
| 49 | Exon 5 | 5069C>T | P233L | Missense oder seltener Polymorphismus ? | 2 |

Übersicht über die bislang identifizierten Mutationen des *ELA2*-Gens. Die Nukleotidnomenklatur ist angegeben laut GenBank Nummer Y00477; die Proteinnomenklatur bezieht sich auf die reife HNE von 218 AS; - verweist auf unbekannte Mutationseffekte; 1 bezeichnet Mutationen bei SCN, 2 bezeichnet Mutationen bei CyN (modifiziert nach Bellané-Chantelot *et al.*, Blood 103, 2003).

Über die Konsequenzen solcher derartig heterogener Mutationen wird vielfach diskutiert. Zunächst wurde ein Funktionsverlust der Serinprotease angenommen, da ihre wichtigste Rolle in der Abwehr gramnegativer Bakterien liegt (Belaajouaj *et al.*, 1998). Allerdings wiesen weder homozygote noch heterozygote *ELA2*-knockout-Mäuse eine Neutropenie-ähnliche Symptomatik auf. Diese Mäuse zeigten lediglich ein erhöhtes Infektionsrisiko bei einem ansonsten unauffälligem Phänotyp. Bei einer von Grenda und Kollegen generierten transgenen Maus, welche die *ELA2*-Mutation V72M trägt, konnten ebenfalls keine in diese Richtung weisenden phänotypischen Veränderungen beobachtet werden (Grenda *et al.*, 2002).

Weiterhin wurden Faktoren identifiziert, die ebenfalls bei der Auslösung der Neutropenien eine Rolle spielen könnten. Person und Kollegen weisen auf den transkriptionellen Repressor Gfi1 hin, dessen Abwesenheit bei Mäusen zu Neutropenie führt (Karsunky *et al.*, 2002). Gfi1 reguliert eine Reihe von Genen, welche in die myeloide Differenzierung von Vorläuferzellen in Granulozyten involviert sind. Sie fanden in der *ELA2*-Promotorregion mehrere potentielle Gfi1-Bindungsseiten (Person *et al.*, 2003). Bei der Untersuchung von Patienten mit Mutationen des Gfi1 wiesen diese im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen eine Überexpression von HNE auf. Deshalb gehen die Autoren davon aus, dass die von ihnen gefundenen Mutationen im Gfi1 Gen zur Überexpression von HNE führen. Dies wiederum verursacht eine Akkumulation des mutierten HNE-Proteins und stört auf diese Weise den korrekten Transport des Proteins. Von Li und Kollegen wurde ein neues potentielles Motiv für LEF-1 (*Lymphoid enhancer Factor-1*) in der Promotorregion der Elastase beschrieben (Li *et al.*, 2004). Sie konnten zeigen, dass die beiden transkriptionellen Regulatoren LEF-1 und CBF α (*Core-binding Factor α*) mit der Elastase interagieren und deren Expression regulieren können. Mutationen in den entsprechenden Bindungsdomänen des *ELA2*-Promotors könnten zur Veränderung der Transkription führen. Inwieweit eine veränderte Transkription des *ELA2*-Gens jedoch tatsächlich zur Pathogenese der Neutropenien beiträgt, bleibt weitgehend ungeklärt.

Neben den beschriebenen Kandidaten, die eine wichtige Rolle bei der Genregulation der Elastase aufweisen könnten, wurden die Auswirkungen der Mutationen auf die Proteinstruktur und damit assoziierte Effekte diskutiert. Basierend auf der Kristallstruktur der Neutrophilen Elastase stellten Bellanné-Chantelot *et al.* anhand bioinformatischer

Analysen fest, dass die meisten der Missense-Mutationen einen Ladungs- und/oder einen Polaritätswechsel zur Folge haben (Bellanné-Chantelot *et al.*, 2004). Da die Missense-Mutationen meistens eine in anderen Spezies hochkonservierte Aminosäure betreffen, könnte dieser Wechsel durch eine Veränderung der Sekundärstruktur beispielsweise zur Instabilität des Proteins oder Verminderung der Ligandeninteraktionen führen.

Diese Hypothese weiterverfolgend wird erwogen, dass die Protease aufgrund der Mutationen eine Änderung ihrer proteolytischen Aktivität erfährt oder aber eine Änderung der Substratspezifität der Elastase stattfindet. Zu diesen Fragestellungen wurden einige Untersuchungen durchgeführt, die jedoch keine klaren Antworten liefern konnten. Li und Horwitz analysierten die biochemischen Eigenschaften verschiedener Mutanten in einer transient transfizierten RBL-Zelllinie (Li & Horwitz, 2001). Sie konnten bei der Mehrzahl der Mutanten eine reduzierte proteolytische Aktivität gegenüber drei differenten Substraten feststellen, aber dennoch keine eindeutigen Korrelationen festhalten. Ferner war die Substratspezifität der Mutanten keinen Änderungen unterworfen. Gegensätzliche Ergebnisse erbrachten die Analysen von Duan und Kollegen (Duan *et al.*, 2004). Sie identifizierten N2N und Notch2, zwei Proteine der Notch-Familie, die in die myeloische Differenzierung involviert sind, als neue Substrate der Neutrophilen Elastase. Sie konnten zeigen, dass eine Proteolyse des N2N und Notch2-Proteins durch die WT-HNE sowohl *in vitro* als auch *in vivo* stattfindet, die Mutanten R191Q und Δ V161-F170 jedoch ein unterschiedliches proteolytisches Verhalten im Vergleich zur WT-HNE aufweisen. *In vitro* war die Mutante R191Q fähig, N2N proteolytisch zu spalten, während Δ V161-F170 nicht mit dem N2N-Protein interagiert. Beide Mutanten wiesen einen Verlust der proteolytischen Aktivität gegenüber Notch2 auf. Ob die veränderte Proteolyse der Notch-Proteine durch die mutante Elastase ursächlich für die Erkrankung sein könnte, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Es wird ebenfalls diskutiert, inwieweit HNE-Mutationen einen Einfluss auf die Interaktion des Proteins mit seinen physiologischen Inhibitoren nehmen können. Hierzu untersuchten Li *et al.* eine Vielzahl unterschiedlicher Mutanten auf ihre Zugänglichkeit für das Serpin α 1-Antitrypsin (Li & Horwitz, 2001). Bei den mutanten Formen der Elastase konnte keine Beeinträchtigung ihrer Inhibitionskapazität durch das Serpin beobachtet werden. Untersuchungen mit einem breiteren Spektrum an Inhibitoren wurden bisher nur mit der Wildtyp-Elastase durchgeführt, so dass das Verhalten der mutanten Formen der

Neutrophilen Elastase gegenüber ihren physiologischen Inhibitoren fraglich bleibt (Owen *et al.*, 1995).

Als weitere mögliche Folge der Mutationen wird außerdem eine fehlerhafte Prozessierung, assoziiert mit einer inkorrekten Faltung vermutet. Damit zusammenhängende Konsequenzen reichen von einem Transportdefekt, der zu einer Mislokalisierung des Proteins führen könnte, fehlenden post-translationellen Modifikationen bis hin zu Veränderung von Protein-Protein-Interaktionen. Um diese Möglichkeiten zu überprüfen, untersuchten Li *et al.* zunächst C-terminal deletierte Varianten von mutanter Neutrophiler Elastase (Li & Horwitz, 2001). Die Expression der deletierten Formen resultierte in einem korrekten Transport zu den Granula sowie biologisch aktiven Proteinen. Zuvor konnten Gullberg *et al.* ebenfalls über eine einwandfreie Prozessierung der carboxy-terminalen Deletionsvariante der Wildtyp-Elastase berichten (Gullberg *et al.*, 1995).

Die Analyse der intrazellulären Lokalisation der mutanten HNE-Proteine war letztendlich ein wegweisender Schritt in Hinblick auf die Rolle der Neutrophilen Elastase bei kongenitalen Neutropenien. Benson *et al.* zeigten, dass einige Mutationen der Neutrophilen Elastase zu einer Mislokalisierung des Proteins führen (Benson *et al.*, 2003). Es existieren Ähnlichkeiten zwischen dem humanen Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 2 (HPS2), welcher durch Mutationen des AP3B1-Gen verursacht wird, und der bei Hunden bekannten Form der zyklischen Hämatopoiese. Aufgrund dieser Analogien schlussfolgerten die Autoren, dass das AP3B1-Gen ein Kandidatengen für die CyN beim Hund darstellen könnte. Sequenzanalysen bestätigten, dass Mutationen im AP3B1-Gen vermutlich für die zyklische Neutropenie des Hundes verantwortlich sind. AP3B1 stellt eine Untereinheit des AP3-Komplexes dar, welcher den Transport von transmembranen Glykoproteinen vom *trans*-Golgi zu den Lysosomen vermittelt (Rohn *et al.*, 2000). Hierbei ist in der zytoplasmatischen Domäne der Transmembranproteine ein Tyrosin-basierendes Signal lokalisiert, über welches die Interaktion mit AP3 eingegangen werden kann (Dell'Angelica *et al.*, 1997). Auch in der Proteinstruktur der Neutrophilen Elastase konnte ein solches Motiv identifiziert werden. Über *yeast two-hybrid* Experimente ist es Benson *et al.* gelungen, eine Interaktion zwischen der Neutrophilen Elastase und dem AP3-Komplex nachzuweisen (Benson *et al.*, 2003). Hierbei ist allerdings zu erwähnen, dass diese Interaktion nur für eine prozessierte, das heißt carboxy-terminal deletierte Variante

dargestellt werden konnte. Die unprozessierte Isoform der HNE von 34 kD wurde präferentiell an der Plasmamembran lokalisiert gefunden. Dieses Ergebnis führten die Autoren auf die Möglichkeit zurück, dass ein intakter C-Terminus der unprozessierten Form die Interaktion zwischen dem Sortiersignal und AP3 blockiert und auf diese Weise ein Transport zu den Granula verhindert wurde. Weiterhin wies die Untersuchung der Mutation Y199X, die das AP3-Signal zerstört, dieses mutante Protein an der Plasmamembran auf. Folglich resultieren Mutationen der Neutrophilen Elastase, die das AP3-Signal unterbrechen, in einer plasmamembranen Verteilung des Proteins.

Ferner konnten Benson und Kollegen anhand bioinformatischer Analysen erstmals zwei putative Transmembrandomänen der Neutrophilen Elastase beschreiben. Sie folgerten, dass das HNE-Protein eine transmembrane Konformation annehmen kann. Um eine lösliche Topologie zu erreichen, in der die Neutrophile Elastase in den Granula vorliegt, wird die Protease durch noch unbekannte Mechanismen aus der transmembranen Konformation gelöst. Des weiteren wiesen Benson *et al.* nach, dass durch Mutationen, welche diese potentiellen transmembranen Strukturen unterbrechen, das Protein exklusiv in die Granula transportiert wurde. Diese Beobachtung würde für die meisten Mutationen zutreffen, die zur zyklischen Neutropenie führen.

Konträre Ergebnisse wurden von Masullo *et al.* demonstriert. Bei der Analyse der Mutante G185R, welche sich inmitten der putativen Transmembrandomäne befindet, stellten sie fest, dass dieses Protein vorwiegend an der Plasmamembran detektierbar wurde (Masullo *et al.*, 2005). Neben diesen Veränderungen konnten die Autoren ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Neutrophilen Elastase und dem AP3-Protein entdecken. In WT-HNE-exprimierenden Zellen befanden sich die Neutrophile Elastase und das AP3-Protein in gleichen Fraktionen. Die Untersuchungen des subzellulären Verteilungsmusters von AP3 in G185R-exprimierenden Zellen ergab ein vollständiges Fehlen des AP3-Proteins.

Lindmark und Kollegen untersuchten ebenfalls die unterschiedlichen Varianten der Neutrophilen Elastase. Sie konnten eine unprozessierte Form (34 kD) der Neutrophilen Elastase als sezernierte Form im Kulturmedium identifizieren (Lindmark *et al.*, 1990). Die Sekretion von unprozessierten Proformen konnte zudem auch für weitere Serinproteasen gezeigt werden. Weitere Untersuchungen der Proformen von Proteasen erbrachten außerdem Hinweise zur Bedeutung von Serinproteasen im Rahmen von Differenzierung

und Proliferation myeloischer Zellen. Während die sezernierte Proform der Proteinase 3 zu einer Hemmung der Proliferationskapazität mononukleärer Knochenmarkszellen führte, konnte dieser Effekt für die reife, prozessierte Proteinase 3 nicht nachgewiesen werden (Sköld *et al.*, 1999). Die Inhibierung konnte durch Zugabe von Wachstumsfaktoren (G-CSF, GM-CSF) antagonisiert werden. Für die Wildtyp-Elastase konnte dieser Effekt nicht aufgezeigt werden. Inwieweit die sezernierte Proform der mutanten Elastase über eine derartige Aktivität verfügt, bleibt zu klären.

Die Erwägung einer verstärkten Apoptose der Vorläuferzellen als Folge der Mutationen der Neutrophilen Elastase stellt einen bedeutsamen und konträr diskutierten Punkt dar. Die Expression mutanter Formen der Elastase in RBL-Zellen führte zu keinerlei Änderung der Überlebenskapazität (Li & Horwitz, 2001). Währenddessen wiesen myeloische Zellen von Patienten mit zyklischer Neutropenie und anderen angeborenen Neutropenien im Vergleich zu gesunden Kontrollkollektiven eine verstärkte Apoptoserate auf (Aprikyan *et al.*, 2000a; Aprikyan *et al.*, 2000b; Aprikyan *et al.*, 2001). Auch Massullo *et al.* unterstützen diese Hypothese. Sie konnten zeigen, dass die Expression der Mutante G185R eine vorzeitige Apoptose von differenzierenden HL-60 Zellen auslöste und führten diese Beobachtung auf eine aberrante Enzymfunktion zurück (Massullo *et al.*, 2005).

1.6 Zielsetzung

Die Entdeckung, dass die Mehrzahl der an Neutropenie erkrankten Patienten eine Mutation im Gen der Neutrophilen Elastase tragen, war ein Meilenstein in der Historie dieser Erkrankung. Doch obwohl inzwischen mehr als 40 unterschiedliche Mutationen im *ELA2*-Gen gefunden wurden, bleiben die molekularen Konsequenzen dieser Mutationen auf zellulärer Ebene bei angeborenen Neutropenien bisher weitgehend ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, Aufschluss über die Relevanz der Mutationen im Gen der Neutrophilen Elastase für die Pathogenese von kongenitalen Neutropenien zu erhalten.

Im ersten Schritt sollte ein induzierbares humanes Zellmodell entwickelt werden. Mit Hilfe dieses Systems können Auswirkungen von spezifischen Mutationen im *ELA2*-Gen, die typischerweise bei Patienten mit Neutropenien gefunden werden, funktionell analysiert

werden. Da keinerlei Daten zur Lokalisation des mutanten Proteines vorlagen, jedoch hypothetisiert wird, dass Mutationen der Neutrophilen Elastase zur Mislokalisierung des Proteins führen, konzentrierte sich die Arbeit vordergründig auf die Untersuchung des Transportes und der Lokalisation der mutanten Neutrophilen Elastase.

Ein weiterer Fokus der Untersuchungen bestand in der Charakterisierung der Auswirkungen der Mutationen im *ELA2*-Gen auf die Funktion des Proteins. Da einige Mutationen die katalytische Domäne der Elastase verändern, sollte analysiert werden, inwieweit das mutante Protein Änderungen in der proteolytischen Aktivität, Substratspezifität oder Inhibitorinteraktion aufweist. Da bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte, dass myeloische Zellen von Patienten mit angeborenen Neutropenien im Vergleich zu gesunden Kontrollkollektiven eine verstärkte Apoptoserate aufweisen, sollte weiterhin die Apoptoseinduktion untersucht werden.

Um ein vollständiges Bild über die Auswirkungen der Mutationen der HNE geben zu können, sollten zusätzlich zu dem Zellmodell ebenfalls Analysen der subzellulären Lokalisation der Elastase in primären Granulozyten von Patienten mit SCN oder CyN durchgeführt werden.

Die geplanten Forschungsansätze könnten nicht nur dazu beitragen, die Bedeutung der Neutrophilen Elastase bei schweren angeborenen Neutropenien zu verstehen, sondern auch einen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien bei diesen Erkrankungen darstellen.

2. Material und Methoden

Alle allgemein gebräuchlichen Reagenzien waren von p.a. Qualität und wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Klonierungsstrategie

Zur Generierung mutanter Varianten der Neutrophilen Elastase wurde der Vektor pLXIN, der die komplette Sequenz für die Humane Neutrophile Elastase enthält, verwendet. Für die Erstellung ausgewählter Mutationen wurde eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt. Die Verifizierung der Integrität der Vektoren und das Vorhandensein der gewünschten Mutation erfolgte durch die Sequenzierung (MWG; Ebersberg). Um das Tet-Off-System zu generieren, wurden alle *ELA2*-Konstrukte in die *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle des retroviralen Expressionsvektors pRevTRE (BD Clontech; Heidelberg), der unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-regulierten Promotors steht, umkloniert. In **Abbildung 4** sind die verwendeten Vektoren schematisch dargestellt. Beide Vektoren beinhalten eine multiple Klonierungsstelle (MKS), in welche die gesamte kodierende Sequenz für die Humane Neutrophile Elastase (932 bp) kloniert wurde. Weitere Details zu den verwendeten Vektoren können **Abbildung 4** entnommen werden.

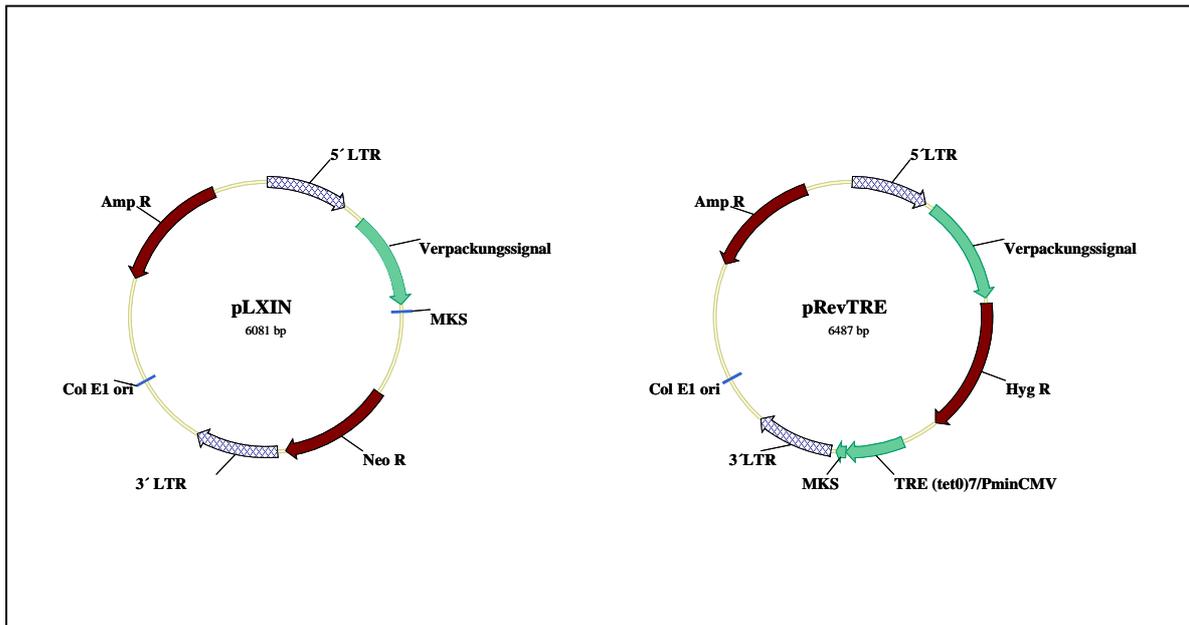


Abb. 4 Schema der eukaryontischen Expressionsvektoren pLXIN und pRevTRE. Zur Erstellung der mutanten Varianten der Neutrophilen Elastase wurde der eukaryontische retrovirale Expressionsvektor pLXIN (6081bp) verwendet. Er beinhaltet die gesamte kodierende Sequenz für die Humane Neutrophile Elastase (932 bp), die in die *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle der MKS des Vektors kloniert wurde. Das Plasmid besitzt eine Ampicillin (Amp^R)-Resistenz sowie einen Replikationsursprung (ColE1ori) für die Vermehrung in *E. coli*, während die Neomycin (Neo^R)-Resistenz der Selektion im eukaryontischen System diene. Die 5' und 3' LTR- Sequenzen (*long terminal repeat*) wurden für die retrovirale Integration und Genexpressionskontrolle benötigt. Außerdem weist das Plasmid ein Verpackungssignal auf. Der 6487 bp große retrovirale Expressionsvektor pRevTRE wurde für die Erstellung des Tet-Off-Systems verwendet. Ähnlich wie der pLXIN-Vektor weist er einen Replikationsursprung (ColE1ori), 5' und 3' LTR und ein Verpackungssignal auf. Für die Selektion in prokaryontischen Zellen wurde die Ampicillin-Resistenz (Amp^R) verwendet, während eukaryontische transduzierte Zellen mittels der vorhandenen Hygromycin-Resistenz (Hyg^R) selektiert wurden. Das Gen, das in die MKS kloniert wird, steht unter der Kontrolle des Tetrazyklin-regulierten Promotors TRE (tet0)/PminCMV).

2.1.2 Zielgerichtete Mutagenese

Zur Generierung mutanter Varianten der Elastase wurde eine zielgerichtete Mutagenese mittels des „QuikChange site-directed mutagenesis kit“ (Stratagene; Amsterdam, Niederlande) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Ausgangsvektor diente der Expressionsvektor pLXIN mit der kodierenden Sequenz für die Humane Neutrophile Elastase (GenBank Nummer Y00477). Nach erfolgter DNA-Amplifikation (Bedingungen in **Tabelle 2**) mittels der *PfuTurbo* DNA-Polymerase II (2,5 U) unter Verwendung der spezifischen Mutagenese-Primer (MWG; **Tabelle 3**) wurde dieser Ansatz mit 10 U *DpnI* bei 37° C für 1 h inkubiert. Die verdaute DNA wurde anschließend in die XL-1 blue kompetente Bakterien transformiert und die gewünschten Klone über eine Ampicillin-Antibiotikaresistenz selektiert.

Tab. 2 Bedingungen der durchgeführten PCR bei der Generierung der mutanten Varianten der HNE

| Segment | Zyklus | Temperatur | Zeit |
|---------|--------------------------------|------------|--------|
| 1 | 1 x | 95° C | 30 sec |
| 2 | 12 x (Punktmutation) | 95° C | 30 sec |
| | 16 x (Deletion oder Insertion) | 55° C | 60 sec |
| | | 68° C | 14 min |

Tab. 3 Primer, verwendet bei der Generierung der mutanten Varianten der HNE

| Primer | Primersequenz |
|----------------------------------|---|
| C42R VW T>C | 5'-catgtcggccgcgcacCgcgtggcgaatgtaaac-3' |
| C42R RW | 5'-gtttacattcgccacgcGgtgcgccgacatg-3' |
| V72M VW G>A | 5'-caccggcagggtgttcgccAtgcagcgcacatcttcgaaaa-3' |
| V72M RW | 5'-gttttcgaagatgcgctgcaTggcgaacacctgccgggtg-3' |
| InsPQ94 VW >+CCC CAG | 5'-gacatcgtgattctccagCCCAGctcaacgggtcggccacc-3' |
| InsPQ94 RW | 5'-ggtagccgaccggttgagCTGGGGctggagaatcacgatgtc-3' |
| S97L VW C>T | 5'-ctccagctcaacgggtTggccaccatcaacgcc-3' |
| S97L RW | 5'-ggcgttgatgggtggccAaccogttgagctggag-3' |
| P110L VW C>T | 5'-caggtggcccagctgcTggctcagggacgcccgc-3' |
| P110L RW | 5'-gcggcgtccctgagccAgcagctgggcccactg-3' |
| C122Y VW G>A | 5'-ggcaacggggtgcagtAcctggccatgggctgg-3' |
| C122Y RW | 5'-ccagcccattggccaggTactgcaccccgttgcc-3' |
| ΔV145-C152 VW | 5'-gccagcgtcctgcaggagctcaacΔcgtcgcagcaacgtctgcact-3' |
| >Δgtgacggtggtgacgtccctctgc | 5'-gagtgcagacgttgctgagcagΔgttgagctcctgcaggacgctggc-3' |
| ΔV145-C152 RW | 5'-gagtgcagacgttgctgagcagΔgttgagctcctgcaggacgctggc-3' |
| ΔV161-F170 VW | 5'-cagcaacgtctgcactctcΔggggactccggcagcccc-3' |
| >Δgtgaggggcccggcaggccggcgtctgttc | 5'-ggggctgcccggagctcccΔgagagtgacagcgttgctg-3' |
| ΔV161-F170 RW | 5'-ggggctgcccggagctcccΔgagagtgacagcgttgctg-3' |
| P176R VW C>G | 5'-gactccggcagccGcttggctgcaac-3' |
| P176R RW | 5'-gttgacagaccaagCggctgcccggagtc-3' |
| R191Q VW G>A | 5'-ggaattgcctccttcgtccAgggaggctgcccctcag-3' |
| R191Q RW | 5'-ctgaggcgcagctcccTggacgaaggaggcaattcc-3' |
| Y199F VW A>T | 5'-cgctcagggctcTccccgatgcctttgcc-3' |
| Y199F RW | 5'-ggcaaaggcatcggggAagagccctgaggcg-3' |
| Y199Stop VW C>A | 5'-cgctcagggctctaAcccgatgcctttgcc-3' |
| Y199Stop RW | 5'-ggcaaaggcatcggggTtagagccctgaggcg-3' |

2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA aus *E.coli* Bakterien zu isolieren, wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit oder QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen; Hilden) gemäß Herstellerangaben verwendet. Die isolierte DNA wurde in sterilem H₂O (BD Biosciences) aufgenommen und bei -20° C aufbewahrt. Zur Bestimmung der DNA-Reinheit und Konzentration erfolgte eine photometrische Messung (Photometer DU 530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierfür wurde die DNA-Lösung in Wasser verdünnt und in eine Quarzküvette überführt. Die Konzentration der DNA wurde folgendermaßen berechnet:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{gemessene OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$$

2.1.4 Restriktionsanalyse von DNA

Die Restriktionsanalysen wurden unter den Reaktionsbedingungen gemäß Angaben des Herstellers (New England Biolabs, Inc; Frankfurt/Main) durchgeführt. Es wurden 2,5-5 Units Enzym/ μ g DNA eingesetzt und der Ansatz für einen Zeitraum von 2 h bis 16 h bei 37° C inkubiert. Es folgte die Analyse der Restriktionsfragmente in einem Agarosegel (2.1.5).

2.1.5 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurde die Agarosegel-Elektrophorese verwendet. Abhängig von der Größe der zu trennenden DNA wurde die Agarosekonzentration zwischen 1 und 2 % gewählt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80-100 V. Anhand eines DNA-Molekulargewichtsmarkers (GeneRuler 1kb DNA-Ladder; Fermentas) konnte die Größe der DNA-Banden bestimmt werden. Das dem Gel zugefügte Ethidiumbromid (0,5 μ g/ml, AppliChem; Darmstadt) interkalierte zwischen den Basen der Nukleinsäuren, so dass dieser Ethidiumbromid-DNA-

Komplex nach Anregung mit UV-Licht (312 nm) im sichtbaren Bereich als orange leuchtende Bande erschien.

2.1.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente aus Agarosegelen zu isolieren (2.1.5), wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben verwendet. Die aufgereinigte DNA wurde anschließend auf einem Agarosegel mittels des Massruler™ DNA-Markers (Fermentas) quantifiziert. Hierbei wurde die Bandenintensität der Test-DNA mit der Intensität des Markers, dessen Länge und Konzentration bekannt war, verglichen. Solche Bestimmungen wurden vor allem durchgeführt, um die Konzentrationen von Vektor- und Insert-DNA zu vergleichen, welche miteinander ligiert werden sollten.

2.1.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um zu verhindern, dass ein linearisierter Vektor religiert, wurde der terminale 5'-Phosphatrest mittels alkalischer Phosphatase entfernt. Die Dephosphorylierung erfolgte für 2 Stunden bei 37° C mit 1 Unit alkalischer Phosphatase (Promega; Mannheim) unter der Zugabe des mitgelieferten Puffers (50 mM Tris-HCL, pH 9,3, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM Spermidin). Danach wurde das Enzym nach Zugabe von 20 mM EDTA, pH 8,0 bei 75° C für 20 min inaktiviert. Anschließend wurde die DNA mittels des QIAquick Nucleotide Removal Kits (Qiagen) gemäß Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.1.8 Ligation

Um DNA-Fragmente in Vektoren einzufügen, wurde die Ringschlussreaktion mit Hilfe der T4 DNA-Ligase (Promega) vollzogen. Die hierfür benötigten DNA-Mengen wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{ng Insert} = \frac{\text{ng Vektor} \times \text{kb Insert}}{\text{kb Vektor}} \times \frac{\text{Ratio Insert}}{\text{Vektor}}$$

Die DNA wurde in einem Verhältnis von 3:1 (Menge Insert DNA/Vektor DNA) eingesetzt. Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl unter Zugabe von 10 U T4 DNA-Ligase und 0,1 Volumen des mitgelieferten Puffers (300 mM Tris-HCL, pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP) bei 16° C über Nacht durchgeführt. Anschließend wurde das erzeugte Konstrukt in die kompetenten DH5α- oder XL-1 Blue-Bakterienzellen transformiert (2.1.9).

2.1.9 Transformation

Zu 50 µl kompetenter Bakterien, die zuvor langsam auf Eis aufgetaut wurden, wurden 5 µl Ligationsansatz (2.1.8) zugefügt und vorsichtig im Transformationsröhrchen (5 ml Rundbodenröhrchen; BD) gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42° C für 45 sec im Wasserbad. Nachdem die Bakterien 3 min auf Eis abgekühlt waren, wurden 450 µl SOC-Medium (Invitrogen) zugefügt und bei 37° C für 1 h und 220 UpM inkubiert. Anschließend wurde die gesamte Lösung auf eine ampicillinhaltige LB-Agar-Platte ausplattiert und bei 37° C über Nacht inkubiert. Nachfolgend wurden Bakterieneinzelkolonien in 3 ml LB-Medium überimpft und als Übernachtkultur bei 37° C unter Schütteln inkubiert (Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, USA). Die Selektion der gewünschten Klone erfolgte über eine Ampicillin-Antibiotikaresistenz als Marker. Das Vorhandensein eines Inserts wurde nach erfolgter Plasmid-DNA-Isolation aus den Bakterien (2.1.3) mittels Restriktionsverdau überprüft (2.1.4). Für eine längerfristige Lagerung positiver Bakterienklone wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurden frische Bakterien-Übernachtulturen 3:1 mit 45 % Glycerin versetzt und anschließend in Kryogefäßen bei -80° C deponiert. Um die Bakterien erneuert anzuzüchten, wurde mit einem sterilen Zahnstocher etwas von der gefrorenen Bakterienkultur entnommen und auf eine LB-Agar-Platte (versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen. Die Genotypen der verwendeten Bakterienstämme lauten wie folgt:

Escherichia coli DH5α (Invitrogen): F' φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA endA1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1

Escherichia coli XL1-Blue (Stratagene): recA1 endA1 gyr96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^r)].

2.1.10 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus Zelllinien wurde mittels der Kits QIAshredder und RNeasy Mini Kit (Qiagen; Hilden) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierte RNA wurde in sterilem, RNase-freiem H₂O (Qiagen) aufgenommen und bei -80° C aufbewahrt. Im Anschluss an die Isolierung erfolgte eine photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung (Photometer DU 530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentration der RNA wurde folgendermaßen berechnet:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{gemessene OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

2.1.11 cDNA-Synthese

Um mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA aus RNA-Präparationen zu entfernen, wurde ein Dnase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurden 2 µg RNA mit 0,5 U DNase I (Qiagen) und 10 U RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen) im RDD-Puffer (Qiagen) bei 37° C für 30 min inkubiert. Nachfolgend wurde die DNase I durch Zugabe von 50 mM EDTA und Erhitzen der Lösung bei 65° C für 5 min inaktiviert. Für die anschließende Synthese von cDNA wurde der gesamte DNase-verdaute Ansatz verwendet. Hierfür wurden zur RNA 0,5 µg Random Hexamer-Primer (MWG) zugefügt, die Lösung nachfolgend bei 70° C für 8 min erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Nach Zufügen eines Reaktion-Mixes (5 x First-Strand Puffer (250 mM Tris-HCL, pH 8,3, 375 mM KCL, 15 mM MgCl₂; Invitrogen) sowie 0,1 mM DTT, dNTP-Mix (je 10 mM, Roche), 40 U RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor und 200 U Superscript II Reverse Transkriptase (Invitrogen) erfolgte die Inkubation der Lösung bei 42° C für 1 h. Anschließend wurde die Probe auf 70° C für 15 min erhitzt. Die cDNA wurde bis zur Analyse bei -20° C gelagert.

2.1.12 Quantitative *Real-Time* RT-PCR

Um die Expression der Neutrophilen Elastase hinsichtlich ihrer Promotorinduktion zu untersuchen sowie die Expression von BiP zu analysieren, wurde die quantitative *Real-Time* RT-PCR angewandt. Durch den Einsatz von sequenzspezifischen Primern und Sonden ist es mit Hilfe dieser Methode möglich, die Expression eines Gens in einer Probe zu quantifizieren. Die quantitative *Real-Time* RT-PCR wurde unter der Verwendung der TaqMan Technologie (7700 Sequence Detector; Applied Biosystems, Foster City, USA) für die Neutrophile Elastase, beziehungsweise iCycler Technologie (iCycler; BioRad) für BiP gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mittels der PRIMER EXPRESS Software (Applied Biosystems) erfolgte die Auswahl der Primer und Sonde für die Neutrophile Elastase. Als Sonde diente dabei das folgende Oligonukleotid: 5'-cgt gat tct cca gct caa cgg gtc g-3' (Eurogentec, Seriang, Belgien), welches mit 5'-Carbofluorescein (FAM; Reporter) und 3'-6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA; Quentscher) konjugiert war. Die Amplifikation der DNA erfolgte unter der Verwendung der beiden Primer VW 5'-cat ctt cga aaa cgg cta cga-3' und RW 5'-agc tgg gcc acc tgc ac-3' (MWG) und des Taqman PCR core reagents (Eurogentec) gemäß Angaben des Herstellers. Die Bedingungen wurden wie folgt gewählt: initiale Denaturierung bei 95° C für 10 min, 45 Zyklen bei 95° C für 15 sec und 62° C für 60 sec. Für BiP wurde das vorgefertigte Taqman assay reagents (PDAR; Applied Biosystems; Foster City, CA) gemäß Herstellerangaben eingesetzt. Jede Probe wurde in zwei unabhängigen Analysen als Duplikat untersucht. Die Expression der beiden Gene wurde jeweils zum GAPDH-Level (FG PDAR; Applied Biosystems) normalisiert. Die relative Expression wurde unter Verwendung der Ct-Methode nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-[\text{Ct}(\text{Ziel}) - \text{Ct}(\text{GAPDH})]} \times 100.$$

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden 293T, HT1080, U937T und HeLa Zelllinien verwendet. Sämtliche Arbeiten wurden unter Einhaltung steriler Bedingungen an einer Sicherheitsbank der Klasse 2 (Hera safe 261 Typ HS12 Heraeus; Hanau) durchgeführt. Alle Zellen wurden in Zellkulturflaschen (Sarstedt) bei 37° C und in Anwesenheit von 5 % CO₂ kultiviert (Inkubator: Typ CB 150; Binder; Tuttlingen). Alle verwendeten Medien sowie das Trypsin wurden immer auf 37° C im Wasserbad erwärmt. Die Zelldichte, Morphologie und mögliche Kontaminationen wurden unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Bei circa 90 % Konfluenz der Zellen oder 1 Tag vor einer Transfektion wurden die Zellen passagiert.

293T Zellen (American Type Culture Collection; LGC Promochem; Wesel) wurden in MEM Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS (Life Technologies, Inc.), 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 1 x nicht-essentiellen Aminosäuren (Life Technologies, Inc.; Karlsruhe) und 1 mM Natriumpyruvat (Life Technologies, Inc.) kultiviert. Sie dienen der Produktion von Viruspartikeln.

HT1080 Zellen wurden in DMEM Medium (Life Technologies Inc.), das mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin (PAA Laboratories; Cölbe), 1 x nicht-essentiellen Aminosäuren und 1 mM Natriumpyruvat versetzt wurde, in Kultur gehalten. Sie wurden für die Bestimmung des Virustiters verwendet.

U937T ist eine humane, promonozytäre Zelllinie, welche das tet-VP16 Gen (Gossen *et al.*, 1992) unter Kontrolle des tet-Operator Promotors (Shockett *et al.*, 1995) stabil exprimiert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von G. Grosveld; Department of Genetics, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA). Die Zellen wurden in RPMI-Medium (Life Technologies, Inc.) unter Zugabe von 10 % hitzeinaktiviertem FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 0,5 µg/ml Puromycin (Sigma; Taufkirchen) und 1 µg/ml Tetrazyklin (Sigma) kultiviert. Zum Einfrieren der U937T Zellen wurde ein Einfriermedium, das aus 90 % FKS und 10 % DMSO bestand, verwendet.

HeLa Zellen wurden in MEM Eagle Medium (Cytogen; Sinn) mit einem Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem FKS ohne die Zugabe von Antibiotika gehalten.

2.2.2 Viruspartikelproduktion und retrovirale Transduktion

Für die Produktion retroviraler Partikel wurde eine transiente Ko-Transfektion mittels der Calciumphosphat-Methode gemäß Angaben des Herstellers (CalPhos; BD Clontech) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden folgende Plasmide in die Produktionszellen 293T eingeschleust: a) pRevTRE (WT- oder MT-*ELA2*-Gene beziehungsweise der Leervektor pRevTRE als Kontrolle), b) gag-pol und c) VSV-G (Vesikuläres Stomatitis Virus G-Protein). Die Plasmide gag-pol und VSV-G wurden freundlicherweise von Ted Friedman (Center for Molecular Genetics and Department of Pediatrics, University of California, San Diego) zur Verfügung gestellt. 48 h nach Transfektion wurden die Zellkulturüberstände, welche die Viruspartikel enthielten, geerntet und bei -80°C eingefroren (Beger *et al.*, 2000). Nachfolgend wurden die Überstände zentrifugiert und durch einen $0,45\ \mu\text{m}$ Filter (Millex-HV, Millipore; Schwalbach) filtriert. Nach Ernte und Aufarbeitung der Überstandsfraktionen wurden die Titer auf HT1080 Zellen bestimmt (2.2.3) und Vektorüberstände bekannten Titers bei -80°C bis zur Verwendung stabil gelagert. Die hier durchgeführte Methode erzielte üblicherweise virale Titer im Bereich von $1-5 \times 10^5$ KBE/ml. Pro Experiment mussten etwa $1-2 \times 10^8$ infektiöse Partikel replikationsdefekter Retroviren erzeugt werden.

Für die Transduktion der U937T Zellen wurden zunächst 2,5 ml Virusüberstände auf Retronectin- (Takara; Gennevilliers, Frankreich) beschichtete 6-Loch-Platten überführt und bei 37°C für 2 h inkubiert. In dieser Zeit bindet das Virus an die H-Domäne des Retronectins. Anschließend wurden die U937T Zellen in einer Dichte von 4×10^5 /Loch in dem Virusüberstand resuspendiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Um die Transduktionseffizienz zu erhöhen, wurde das Transduktionsmedium nach 24 h durch frischen Virusüberstand für weitere 24 h ersetzt. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Zugabe von viralem Überstand. Am Tag 3 der Transduktion wurden die Zellen in neue 6-Loch-Platten überführt und weiterhin ohne die Zugabe von Selektionsantibiotika inkubiert. Vier Tage nach der Transduktion wurden die Zellen in $550\ \mu\text{g/ml}$ Hygromycin-haltigem Medium (PAA Laboratories) aufgenommen und so lange selektiert, bis untransduzierte

Kontrollzellen abgestorben waren. Anschließend erfolgte die Isolation von Einzelzellklonen aus dem gesamten, Hygromycin-resistenten Zellpool (2.2.4).

2.2.3 Bestimmung des Virus-Titers

Zur Bestimmung des Virus-Titers erfolgte zunächst die Ausplattierung von HT1080 Zellen mit einer Dichte von 1×10^5 /Loch (6-Loch-Platte). Nach 24 h wurden die Zellen in einem Kulturmedium aufgenommen, welchem zuvor 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene (Sigma; Taufkirchen) zugefügt wurden. Der vorbereitete Virusüberstand (2.2.2) wurde zunächst verdünnt (1:1; 1:10; 1:100) und anschließend mit einem definierten Volumen (20 μl) zu den HT1080 Zellen zugefügt. 24 h nach Transduktion wurde das Medium durch Hygromycin-haltiges Selektionsmedium ersetzt und die Zellen für weitere 12 Tage selektioniert. An Tag 12 wurden die gewachsenen Kolonien zunächst mit einer Coomassie Blue-Lösung (0,25 g Coomassie Brilliant Blue, 250 ml Methanol, 50 ml Eisessigsäure *ad* 500 ml Wasser) fixiert und gefärbt, anschließend gezählt und der Virus-Titer mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{KBE/ml} = \frac{\text{gezählte Kolonien} \times \text{Verdünnung} \times 1000}{\text{transduziertes Volumen}}$$

2.2.4 Isolierung von Einzelzellklonen

Um eine homogene Population zu erhalten, wurden Einzelzellklone aus dem gesamten stabil transduzierten Zellpool isoliert. Hierfür wurden die Zellen im Kulturmedium so verdünnt, dass die Zellzahl bei 4, 2 oder 1 Zelle pro Loch (96-Loch-Platte) erreicht wurde. Am nächsten Tag erfolgte die mikroskopische Begutachtung der Zellzahl und Zellvitalität. Die Einzelzellklone wurden zunächst im Medium unter Zusatz von 15 % hitzeinaktiviertes FKS ohne Selektionsantibiotika kultiviert. Nach Erreichen einer 90 % Konfluenz in der 96-Loch-Platte erfolgte der Zusatz des entsprechenden Selektionsantibiotikums sowie das Überführen der Zellen in nächstgrößere Kulturplatten. Pro Mutation wurden zehn unabhängige Einzelzellklone isoliert und auf ihre Tetrazyklin-abhängige Expression der Neutrophilen Elastase auf RNA- und Proteinebene untersucht.

2.2.5 Induktion der HNE-Expression

Um die Tetrazyklin-abhängige Expression der Neutrophilen Elastase zu induzieren, wurde das Tetrazyklin aus dem Kulturmedium durch dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS entfernt. Anschließend erfolgte die Ausplattierung der Zellen in einer Dichte von 3×10^5 /ml unter Zugabe von Tetrazyklin-freiem Serum (tet-system approved FBS; BD Biosciences). Nach 3 h sowie nach weiteren 24 h wurden die Zellen wiederholt gewaschen. An Tag 3 der Induktion erfolgte die Überführung der Zellen in frisches Medium in einer Gesamtzellzahl von 3×10^6 (1×10^6 /ml) bis 6×10^7 ($0,6 \times 10^6$ /ml). Die Zellen wurden an Tag 4 geerntet und für weitere Versuche prozessiert.

2.2.6 Transiente Transfektion

Um die Lokalisation der HNE mittels konfokaler Lasermikroskopie zu untersuchen, wurden die verschiedenen HNE-Konstrukte (in pLXIN oder RcRSV Vektoren) unter Verwendung der Calciumphosphat-Methode (CalPhos; BD Clontech) in HeLa Zellen eingeschleust. Zu diesem Zweck wurden einen Tag vor der Transfektion 4×10^4 Zellen auf Deckgläschen in einer 24-Loch-Platte ausplattiert. Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers. 48 h nach Gentransfer wurden die Zellen mit 2 % Paraformaldehyd für 20 min bei RT fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Es folgte die Immunfluoreszenz-Färbung (2.3.15).

2.2.7 Isolierung von mononukleären und polymorphnukleären Zellen aus peripherem Blut

Die in dieser Dissertation verwendeten Blutproben wurden von Patienten aus dem SCN-Register der Medizinischen Hochschule Hannover, beziehungsweise von gesunden Probanden mit und ohne G-CSF-Stimulation aus der Blutbank der Medizinischen Hochschule Hannover nach schriftlicher Einwilligung zur Verfügung gestellt. Die Patienten wurden täglich mit 1-10 μ g/kg Körpergewicht mit rh-G-CSF (Neupogen; Amgen, Inc.; München) behandelt. Gesunde Spender hingegen erhielten im Rahmen einer Granulozytenspende für 4 Tage vor der Blutentnahme eine Behandlung mit 5 μ g/kg

Körpergewicht ein Mal täglich rh-G-CSF. Die Blutentnahmen waren von der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover genehmigt worden.

Die Gewinnung von mononukleären und polymorphnukleären Zellen aus peripherem Blut erfolgte über einen FicollTM-Dichtegradient (Amersham Biosciences; Freiburg). Hierfür wurde heparinisiertes Blut in einem Verhältnis 1:3 mit PBS gemischt und vorsichtig über das FicollTM geschichtet. Nach einer halbstündigen Zentrifugation (530 x g) bei RT sammelten sich die mononukleären Zellen an der Grenzschicht zwischen Blutplasma und Ficoll, während die Erythrozyten und die Granulozyten am Boden sedimentierten. Um eine reine Fraktion mit polymorphnukleären Zellen zu erhalten, folgte eine osmotische Lyse der Erythrozyten in kaltem, destilliertem H₂O für 45 sec. Diese Lyse wurde wiederholt, bis keine Kontamination mit Erythrozyten mehr sichtbar war, höchstens jedoch drei Mal. Die gewonnenen Zellen wurden entweder im Einfriermedium (90 % FKS, 10 % DMSO) bei -80° C eingefroren oder für die subzelluläre Fraktionierung (2.3.5), beziehungsweise Immunfluoreszenz-Färbungen (2.3.15) prozessiert.

2.2.8 Herstellung mikroskopischer Präparate aus Granulozyten

Für die Immunfluoreszenz-Färbung wurden fixierte, primäre Granulozyten verwendet. Hierfür wurden die Granulozyten zunächst über einen FicollTM-Gradienten aus peripherem Blut gewonnen (2.2.7) und in 0,2 % BSA in PBS resuspendiert. Nachfolgend wurden sie in einer Dichte von 3×10^5 Zellen/50 μ l auf Poly-L-Lysin-beschichtete (Sigma) Objektträger pipettiert und bei 37° C für 30 min inkubiert. Bei diesem Schritt adhärten die Granulozyten auf den Objektträgern, sodass eine zwanzigminütige Fixierung mit 2 % Paraformaldehyd möglich wurde. Die Granulozyten wurden bis zur Immunfluoreszenz-Färbung, jedoch nicht länger als 7 Tage, bei 4° C in PBS aufbewahrt.

2.3 Biochemische Methoden

Dieser Teil umfasst die Expressionsanalyse der Neutrophilen Elastase sowie sich anschließende präparative und analytische Verfahren.

2.3.1 Isolierung von Proteinen

Die Isolierung von Proteinen aus Zellen wurde standardmäßig in RIPA-Lysispuffer (10 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% NP-40; 0,5% Na-Deoxycholat; 0,1% SDS) unter Zugabe eines Protease-Inhibitor-Gemisches (100 mM Phenylmethylsulfonyl Fluorid, 2,8 mg/ml Aprotinin, 2 mg/ml Pepstatin A und 2 mg/ml Leupeptin; alle von Sigma) bei 4° C für 1 h durchgeführt. Um unlösliche Bestandteile und Zelltrümmer aus den Zellextrakten zu entfernen, wurden die Suspensionen anschließend bei 4° C und 16 000 x g für 20 min pelletiert. Standardmäßig folgte anschließend die Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Bio-Rad Protein Assay (2.3.2). Um eine Degradation der Proteinlysate durch häufiges Einfrieren und Auftauen zu verhindern, wurden diese aliquotiert und bis zur Analyse im Western Blot (2.3.9) bei -80° C aufbewahrt.

2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bio-Rad Protein Assay (BioRad; München), der auf der von Bradford 1976 veröffentlichten Methode basiert, ermittelt (Bradford, 1976). Für die Bestimmung des Proteingehaltes wurde das Mikroassay Protokoll für Proteingehalte unter 25 µg/ml nach Herstellerangaben verwendet. Die Quantifizierung des gebildeten farbigen Komplexes erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Proteinkonzentrationen wurden zu einer BSA-Standardkurve normalisiert.

2.3.3 Aceton-Fällung von Proteinen

Für die Anreicherung von Proteinen aus den Zellkulturüberständen von U937T Zellen wurde eine Aceton-Fällung angewandt. Im ersten Schritt wurde der Zellkulturüberstand 60 min bei 100 000 x g zentrifugiert, um alle gegebenenfalls vorhandenen Zellmembranen und Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wurden 150 µl des Überstandes mit 6 Volumen vorgekühltem (-20° C) Aceton versetzt und gut gemischt. Es folgte die Präzipitation der Proteine für 1 h bei -20° C. Nachfolgend wurden die Proben für 15 min bei 16 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig verworfen und das Sediment bei RT getrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl 2 x Laemmli-Puffer (125 mM Tris-HCL, pH 6,8, 20 % Glycerol, 2 % SDS, 0,005 % Bromphenolblau, 3 % β-Mercaptoethanol) aufgenommen, bei 95° C für 10 min denaturiert und danach mittels Western Blot (2.3.9) analysiert.

2.3.4 Immunpräzipitation

Sowohl die Zelllysate aus 2×10^6 Zellen (2.3.1), als auch die entsprechenden Zellkulturüberstände wurden mit 40 µl 50 % Protein-G-Sepharose-Lösung in PBS (P.G.S.; Roche; Mannheim) für 2 h vorinkubiert, um unspezifische Bindungen von Proteinen an P.G.S. abzusättigen. Durch kurze Zentrifugation wurde die P.G.S. vom Lysat getrennt. Die vorgereinigten Lysate wurden mit einem monoklonalen α-Neutrophile Elastase Antikörper (BD Biosciences) bei 4° C für 2 h auf einem Kippschüttler inkubiert. Es folgte die Zugabe von 50 µl P.G.S. Die Ausbildung der Antigen-Antikörper-P.G.S-Komplexe erfolgte für erneute 2 h auf einem Kippschüttler. Zur Entfernung der unspezifisch gebundenen Moleküle an die P.G.S. wurden die Präzipitate mit RIPA-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 2 x Laemmli-Puffer (1 Volumen) wurden die Proben bis zur Analyse im Western Blot (2.3.9) bei -80° C eingefroren.

2.3.5 Subzelluläre Fraktionierung

Um die Lokalisation der Neutrophilen Elastase mittels differentieller Zentrifugation zu definieren, wurde ein modifiziertes Protokoll nach Li *et al.* verwendet (Li *et al.*, 2002). Dafür wurden zunächst mindestens 5×10^7 Zellen (U937T oder primäre Granulozyten) in einem hypotonischen Puffer (1 mM EDTA; 10 mM Phenylphosphat; 10 mM β -Glycerophosphat; 10 mM Natriumfluorid) unter Zugabe eines Protease-Inhibitor-Gemisch (100 mM Phenylmethylsulfonyl Fluorid, 2,8 mg/ml Aprotinin, 2 mg/ml Pepstatin A und 2 mg/ml Leupeptin) auf Eis für 25 min inkubiert, um die Zellen schwellen zu lassen. Es folgte ein mechanischer Aufschluss der Zellmembranen mit Hilfe eines Duall-Homogenisators (3 ml-Volumen, Teflon-Pistill, Landgraf; Hannover). Anschließend wurden die einzelnen Zellorganellen über unterschiedliche Zentrifugationsschritte (Zentrifuge: Typ 5415R, Eppendorf; Hamburg) isoliert. Hierbei erfolgte zunächst für 15 Minuten eine Zentrifugation bei $1000 \times g$ zur Gewinnung der Kernfraktion (P1). Der resultierende postnukleäre Überstand wurde dann für 30 min bei $10\,800 \times g$ zentrifugiert, um die mitochondriale Fraktion (P2) zu erhalten. Diese Fraktion enthält neben den Mitochondrien zusätzlich Lysosomen, einige Membranvesikel sowie den Großteil des endoplasmatischen Retikulums. Über eine Ultrazentrifugation (Zentrifuge: Beckman Coulter, SW 55 TI-Rotor; Beckman Coulter, Krefeld) für 60 min bei $100\,000 \times g$ wurde der verbleibende Überstand in eine mikrosomale (P3) und eine zytosolische Fraktion (S) getrennt. In der mikrosomalen Fraktion befanden sich neben Plasmamembranen insbesondere Vesikel der Golgi-Strukturen sowie sekretorische Vesikel. Alle gewonnenen Pellets wurden unter den jeweiligen Original-Zentrifugationsbedingungen mit dem hypotonischen Puffer gewaschen, um mögliche Kontaminationen mit den jeweiligen Überständen zu vermeiden. Die Sedimente wurden nachfolgend in RIPA-Puffer unter Zugabe des Protease-Inhibitor-Gemisch lysiert. Anschließend wurden die Proteinmengen mittels der Bradford-Methode (2.3.2) quantifiziert. Zur Überprüfung der Reinheit einzelner subzellulärer Kompartimente wurden die gewonnenen Fraktionen anhand Organell-spezifischer Markerproteine im Western Blot (2.3.9) charakterisiert.

2.3.6 Endoglykosidase-H/F-Sensitivität

Um den Glykosylierungszustand der Proteine festzustellen, wurden Enzyme eingesetzt, die spezifische Zuckerketten von den Proteinen abspalten. Endo- β -N-acetylglucosaminidase H spaltet am Chitobiosegerüst der mannosereichen Proteinvorläufer die glykosidischen Bindungen zwischen den beiden N-Acetylglucosaminen des Oligosaccharids. N-Glykosidase F trennt dagegen die N-glykosidische Bindung zwischen dem N-Acetylglucosamin des Oligosaccharids und dem Asparagin des Polypeptids, sowohl bei der mannosereichen als auch bei der komplex-glykosylierten Form des Proteins.

Die Analyse des Glykosylierungsmusters der HNE erfolgte durch die Behandlung der Zelllysate mit Endoglykosidase H und N-Glykosidase F (New England Biolabs, Inc.) gemäß Angaben des Herstellers. Zunächst wurden 50 μ g Zelllysate auf ein Volumen von insgesamt 90 μ l mit Denaturierungspuffer (0,5 % SDS, 1 % β -Mercaptoethanol; New England Biolabs, Inc.) aufgefüllt und anschließend durch Erhitzen auf 95° C für 10 min denaturiert. Nach Aufteilung der Probe erfolgte die Zugabe des jeweiligen Enzyms (250 U) und des Puffers (0,1 Volumen) zu den Zelllysaten. Als Kontrolle wurde eine Probe ohne Enzymzugabe verwendet. Es folgte eine Inkubation der Proben bei 37° C für 1,5 h. Anschließend wurden die Proben in 2 x Laemmli-Puffer (1 Volumen) aufgenommen und mittels Western Blot analysiert (2.3.9).

2.3.7 Proteinase K-Sensitivität

Zur Überprüfung der Topologie der Neutrophilen Elastase erfolgte eine Behandlung des Proteins mit Proteinase K (Applichem; Darmstadt). Proteinase K besitzt sowohl endo- als auch exoproteolytische Aktivität. Bei Vorhandensein eines zytosolischen Anteils in einem Transmembranprotein wird dieser von der Proteinase K abgespalten, während die transmembranen und luminal befindlichen Teile des Proteins geschützt bleiben. Aus der Verringerung des Molekulargewichtes resultiert ein verändertes Laufverhalten, welches in der SDS-PAGE sichtbar wird. Hierfür wurde zunächst eine subzelluläre Fraktionierung (2.3.5) von HNE-exprimierenden U937T Zellen durchgeführt. Die gewonnene 100 000 x g Fraktion (P3) wurde nachfolgend mit Proteinase K-Puffer (50 % Glycerin, 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM CaCl₂) versetzt. Es folgte eine Inkubation der Probe mit und ohne die

Zugabe von Proteinase K (20 µg) bei 4° C für 2 h. Als Kontrolle wurde eine Probe verwendet, die mit Proteinase K und 3 % Triton X-100 behandelt wurde. Dabei schließt Triton X-100 die Zellmembran auf, sodass die Proteinase K den gesamten Inhalt der Mikrosomen spalten kann. Das Enzym wurde durch die Zugabe von 100 mM PMSF (10 mM Endkonzentration) und zehnminütiges Inkubieren bei 95° C inaktiviert. Anschließend erfolgte die Analyse des Proteinase K-Spaltungsmusters der Neutrophilen Elastase in einem Western Blot (2.3.9). Als Kontrolle wurde das Proteinase K-Spaltungsmuster des Transmembranproteins Calnexin analysiert.

2.3.8 Peptid-Blockierung des Antikörpers

Um die Spezifität des α -Neutrophile Elastase Antikörpers (Santa Cruz; Heidelberg) zu überprüfen, erfolgte die Blockierung mit einem spezifischen Peptid (Santa Cruz). Dafür wurde der Antikörper mit einem fünffachen Überschuss des Peptides für 3 h bei RT schüttelnd inkubiert. Als Kontrolle diente der Antikörper ohne die Zugabe des Peptides. Nachfolgend wurden der blockierte Antikörper sowie die unblockierte Antikörperkontrolle zur Detektion der Neutrophilen Elastase in einem Western Blot (2.3.9) eingesetzt.

2.3.9 SDS-PAGE und Western Blot

Die Auftrennung und Analyse der molekularen Massen der Proteine erfolgte in einer diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Laemmli unter Verwendung des Nunc-Elektrophorese-Systems (Nunc; Wiesbaden) (Laemmli, 1970). Abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins wurden 8 bis 14 % Acrylamid-Gele eingesetzt. Die Größenabschätzung der Proteine erfolgte im Vergleich zum Molekulargewichtsstandard (Protein Ladder 10-200 kD; Fermentas). Für die Elektrophorese wurden Lysate mit einer Proteinmenge zwischen 20-60 µg eingesetzt, die zunächst mit 2 x Laemmlipuffer (1 Volumen) versetzt wurden. Durch Erhitzen der Proben bei 95° C für 7 min wurde eine vollständige Denaturierung der Proteine erreicht. Die Elektrophorese wurde bei RT und konstant 160 V durchgeführt. Nach Beenden der SDS-PAGE wurden die Proteine mittels eines Semi-Dry-Transfer-Systems (Biometra; Göttingen) auf eine Nitrozellulosemembran

mit einer Porengröße von 0,45 μm (Schleicher & Schüll; Dassel) transferiert. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins erfolgte der Transfer der Proteine für 0,15-2 h bei konstanter Stromstärke von 2,5 mA/cm^2 und 4° C. Zur Kontrolle der Effizienz des Blotvorgangs wurde das Gel einer Coomassie-Färbung (0,1 % Coomassie Brilliant-Blau, 25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure) unterzogen. Coomassie ist ein Farbstoff, der unspezifisch an fast alle Proteine bindet und eine Nachweisgrenze im Bereich von 0,1-2 μg pro Proteinbande aufweist. Hierfür wurde das Gel bei RT für circa 30 min in Coomassiefärbelösung und anschließend circa 1 h bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden in der Entfärbelösung (25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure) geschwenkt. Im Anschluss an den Blot wurde die Nitrozellulosemembran mit einer Ponceau S Lösung (Sigma) für 3 min reversibel gefärbt. Anschließend folgte der immunologische Nachweis der Proteine auf der Nitrocellulosemembran. Um überschüssige Bindungsstellen der Membran abzusättigen und somit eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran zunächst bei 4° C in 5 % Milch-PBST (5 % Milchpulver (Herrler), 0,05 % Tween 20 in PBS) über Nacht inkubiert. Es folgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (in 2 % Milch-PBST) bei RT für mindestens 2 h. Nach drei Waschvorgängen mit PBST erfolgte eine Inkubation für 1 h bei RT mit einem Sekundärantikörper (in 2 % Milch-PBST), welcher mit der Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Die Proteine wurden mittels eines Chemilumineszenz-Substrates (ECL advanced chemiluminescence detection system; Amersham Biosciences) detektiert. Lediglich für die Detektion von β -Aktin sowie Bcl-2 wurde das WesternBreeze Kit (Invitrogen) gemäß Angaben des Herstellers verwendet. Die Expositionszeit der Membranen wurde abhängig von der Signalintensität gewählt und erfolgte auf ECL-adaptierten Röntgenfilmen (Amersham Biosciences). Für die Quantifizierung der Bandenintensität wurde die National Institutes of Health (NIH) Image Software verwendet, welche die geschwärzten Pixel der Banden im Vergleich zum Hintergrund evaluiert. Außerdem wurden die Proteinsignale zu den korrespondierten β -Aktin-Banden normalisiert. Die verwendeten Antikörper, deren Verdünnungen sowie die entsprechenden sekundären Antikörper sind in **Tabelle 4** zusammengefasst.

Tab. 4 Antikörper, verwendet bei der Western Blot Analyse

| <i>Primär-Antikörper</i> | <i>detektiertes Molekulargewicht Gel-Prozentigkeit</i> | <i>Firma Verdünnung</i> | <i>Sekundär-Antikörper</i> | <i>Firma Verdünnung</i> |
|---|--|---|-----------------------------|----------------------------|
| α - β -Aktin monoklonal aus Maus | 42 kD 14 % | Sigma 1:600 | α -Maus AP | Invitrogen |
| α -Bcl2 monoklonal aus Maus | 26 kD 14 % | DakoCytomation 1:600 | α -Maus AP | Invitrogen |
| α -Calnexin monoklonal aus Maus | 90 kD 8 % | BD Transduction Laboratories 1:4000 | Ziege α -Maus HRP | BD Pharmingen 1:100 000 |
| α -CD45 monoklonal aus Maus | 180-220 kD 8 % | Zur Verfügung gestellt von AG Schwinzer 1:1000 | Ziege α -Maus HRP | BD Pharmingen 1:100 000 |
| α -Clathrin monoklonal aus Maus | 190 kD 8 % | Progen 1:500 | Ziege α -Maus HRP | BD Pharmingen 1:100 000 |
| α -GM 130 monoklonal aus Maus | 130 kD 8 % | BD Pharmingen 1:2000 | Ziege α -Maus HRP | BD Pharmingen 1:100 000 |
| α -Lamp-2 monoklonal aus Maus | 120 kD 8 % | BD Pharmingen 1:5000 | Ziege α -Maus HRP | BD Pharmingen 1:500 000 |
| α -Neutrophile Elastase polyklonal aus Kaninchen bei Granulozyten | 31 kD 14 % | Calbiochem 1:100 | α -Kanninchen AP | Invitrogen |
| α -Neutrophile Elastase C-17 polyklonal aus Ziege bei U937T Zellen | 31 kD 14 % | Santa Cruz 1:300 | Esel α -Ziege HRP | Santa Cruz 1:300 000 |
| α -Neutrophile Elastase N-18 polyklonal aus Ziege bei U937T Zellen | 31 kD 14 % | Santa Cruz 1:300 | Esel α -Ziege HRP | Santa Cruz 1:300 000 |
| α -Nukleoporin monoklonal aus Maus | 62 kD 10 % | BD Pharmingen 1:1000 | Ziege α -Maus HRP | BD Pharmingen 1:60 000 |
| α -Nup153 monoklonal aus Maus | 180 kD 8 % | Progen 1:20 | Ziege α -Maus HRP | BD Pharmingen 1:100 000 |
| α -PARP monoklonal aus Maus | 116 kD 8 % | Santa Cruz 1:200 | Ziege α -Maus HRP | BD Pharmingen 1:100 000 |

2.3.10 Bestimmung der proteolytischen Aktivität

Zur Aktivitätsmessung der HNE wurde ein modifiziertes Protokoll nach Gullberg *et al.* verwendet (Gullberg *et al.*, 1995). Zunächst wurden 1×10^8 HNE-exprimierende U937T pelletiert und die Zellpellets nachfolgend zweimal bei -80°C eingefroren und wieder aufgetaut. Danach wurde das Pellet in 450 μl Sonifizierungspuffer aufgenommen (100 mM Tris-Cl, pH 8,5, mit 1 M MgCl_2 und 0,1 % Triton X-100) und für 30 sec sonifiziert (Ultrasonicator: Branson Sonifier 250; BS Eemnes, Niederlande). Nach Zugabe von 1 ml Fällungspuffer (5 mM Tris-Cl, pH 8,5, mit 1 M NaCl und 0,1 % Triton X-100) wurde das Lysat bei 4°C für 2 h und 15 000 x g zentrifugiert, um die DNA zu entfernen. Die Lysate wurden aliquotiert und bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt.

Die proteolytische Aktivität der HNE wurde anhand folgender HNE-spezifischer Substrate bestimmt: 50 mM suc-Ala-Ala-Ala-pNA oder 10 mM suc-Tyr-Leu-Val-pNA (Bachem; Bubendorf). Zu diesem Zweck wurden zunächst 40 µl des Lysates mit 53 µl Aktivitätspuffer (200 mM Tris-Cl, pH 8,5, mit 1 M NaCl) und jeweils einem der Substrate gemischt. Es folgte eine Inkubation bei 40° C für 30 min (suc-Ala-Ala-Ala-pNA) beziehungsweise 5 min (suc-Tyr-Leu-Val-pNA). Um die Reaktion zu beenden, erfolgte die Zugabe des Sojabohnen-Trypsininhibitor (Sigma; 200 µg/ml). Weiterhin wurde die Aktivität der HNE ebenfalls unter dem Einfluss eines Elastase-spezifischen Inhibitors α 1-Antitrypsin untersucht. Hierfür wurde das Lysat zunächst mit α 1-Antitrypsin (10 µg/ml; Sigma) gemischt und die Reaktion durch die Zugabe von 50 mM suc-Ala-Ala-Ala-pNA gestartet. Nach 5-minütiger Inkubation bei 40° C wurde der Sojabohnen-Trypsininhibitor zugefügt. Zur Aktivitätsbestimmung erfolgte die Absorptionmessung bei 410 nm (suc-Ala-Ala-Ala-pNA) oder bei 405 nm (suc-Tyr-Leu-Val-pNA) am Spectra max 340 PC (Molecular Devices; München). Die Standardkurve wurde mittels einer seriellen Verdünnung von porciner Neutrophiler Elastase (Sigma) erstellt. Jede Probe wurde in mindestens zwei unabhängigen Analysen als Duplikat untersucht. Zur Berechnung der relativen Aktivität wurde die folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{Relative HNE Aktivität (HNE Aktivität (+ind) – HNE Aktivität (-ind))}}{\text{Relative HNE Expression (HNE Protein (+ind) – HNE Protein (-ind))}}$$

2.3.11 HNE-ELISA

Um das Sekretionsverhalten der mutanten HNE zu bestimmen, wurden die Medienüberstände von U937T Zellen nach Promotorinduktion analysiert. Hierfür wurden zunächst am Tag 3 der Induktion die Zellen in einer Dichte von 6×10^7 in 100 ml Medium ausplattiert. Für die Untersuchung der Sekretion wurde das Human Elastase ELISA Test Kit (HyCult Biotechnology b.v.; Uden, Niederlande) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Der Test basiert auf dem Sandwich Enzym Immunoassay Prinzip. Hierfür wird eine Mikrotiter-Platte, die mit einem Elastase-spezifischen Antikörper beschichtet ist, verwendet. Nach Zufügen von 100 µl der Proben beziehungsweise der Standards bindet die in den Proben vorhandene Elastase an den Antikörper. Nach der Zugabe eines

biotinylierten Sekundärantikörpers wird ein Streptavidin-Peroxidase Konjugat zugefügt, welches spezifisch mit dem gebundenen Sekundärantikörper reagiert. Durch die Zugabe von 100 µl Tetramethylbenzidin erfolgt eine Farbreaktion, die der vorhandenen Menge an Elastase proportional entspricht. Die Absorption bei 450 nm wurde am Spectra max 340 PC (Molecular Devices) bestimmt. Jede Probe wurde in mindestens zwei unabhängigen Analysen als Duplikat untersucht. Die über den ELISA quantifizierte Menge an sezernierter Elastase wurde zur Gesamtmenge von HNE in der Zelle (semiquantitativ bestimmt mittels Western Blot) korreliert. Die relative Sekretion wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{Relative HNE Sekretion (HNE Überstand (+ind) – HNE Überstand (-ind))}}{\text{Relative HNE Expression (HNE Protein (+ind) – HNE Protein (-ind))}}$$

2.3.12 FACS-Analyse von HNE an der Zelloberfläche

Das Vorkommen der WT- oder MT-HNE an der Zelloberfläche wurde mittels FACS analysiert. Hierfür wurden 1×10^6 U937T Zellen nach Promotorinduktion (2.2.5) mit PBS gewaschen. Durch eine einstündige Inkubation der Zellen mit 10 % Humanserum wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären α -HNE Antikörper (Biogenesis; Frankfurt/Main) erfolgte für 30 min bei 4° C. Nach dreimaligem Waschen mit 0,5 % BSA in PBS folgte eine 15-minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (BD Pharmingen), welcher mit dem Fluorochrom PE (BD Pharmingen) konjugiert ist. Anschließend wurden die Zellen für 15 min fixiert (Fix & Perm Permeabilization Reagents; Caltag; Hamburg). Für den Nachweis der intrazellulären Neutrophilen Elastase wurden die Zellen vor der Inkubation mit den Antikörpern permeabilisiert und fixiert (Fix & Perm Permeabilization Reagents; Caltag). Die Rate der HNE-positiven Zellen wurde durchflusszytometrisch analysiert (FACSCalibur: BD Biosciences) und mittels der CellQuestPro™ Software evaluiert. Jede Probe wurde in mindestens zwei unabhängigen Analysen untersucht. Parallel wurde der Induktionsstatus der HNE-Proteine mittels Western Blot (2.3.9) verifiziert.

2.3.13 Annexin V-Markierung

Die Auswirkung der Überexpression von mutierter HNE auf die Apoptose in U937T Zellen wurde mittels eines Annexin V-Assays untersucht. Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin, das in frühen Stadien der Apoptose von der inneren an die äußere Seite der Plasmamembran transferiert wird. Hierfür wurde zunächst die Promotoraktivität in U937T induziert (2.2.5). An Tag 2 der Transgen-Induktion wurden die Zellen in FKS-freies Medium (OptiMEM 1; Invitrogen) transferiert, um eine Hemmung der Apoptose durch exogene Proteaseinhibitoren zu vermeiden. Um die Apoptose zu stimulieren, wurden zu den Zellen an Tag 3 der Induktion 10 μM Camptothecin (Sigma) zugefügt. Apoptotische Zellen wurden mittels Annexin V laut Herstellerangaben (Roche) markiert und mittels FACS-Messung (FACSCalibur: BD Biosciences) detektiert. Jede Probe wurde in mindestens zwei unabhängigen Analysen untersucht. Die Evaluierung der Apoptoserate erfolgte mit der CellQuestProTM Software.

2.3.14 Induktion von ER-Stress

Um ER-Stress in HeLa Zellen auszulösen, wurden die Zellen mit einem bekannten ER-Stress Induktor behandelt. Zu diesem Zweck wurde zu den transient transfizierten HeLa Zellen 2 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin (Sigma) für 16 h zugefügt. Die Analyse erfolgte mittels der konfokalen Lasermikroskopie nach Immunfluoreszenz-Färbung der Zellen (2.3.15).

2.3.15 Immunfluoreszenz-Färbung und konfokale Lasermikroskopie

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Neutrophilen Elastase wurde die konfokale Lasermikroskopie eingesetzt. Die Analyse erfolgte in transient transfizierten HeLa Zellen (2.2.6) sowie in primären Granulozyten (2.2.8). Anhand der Ko-Lokalisation mit Organell-spezifischen Markerproteinen wurde die Lokalisation der Elastase bestimmt. Für die Detektion des endoplasmatischen Retikulums wurde Calnexin verwendet. Um den Golgi-Apparat darzustellen, wurde eine Färbung mit Giantin durchgeführt. Die Darstellung der Lysosomen erfolgte mittels des lysosomalen Proteins Lamp-3. Nach Fixierung in 2 %

Paraformaldehyd wurden die Zellen für exakt 5 min mit 0,5 % Triton X-100/PBS permeabilisiert. Wenn die Expression der HNE an der Oberfläche untersucht werden sollte, wurde auf eine Zellpermeabilisierung verzichtet. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Zellen mit 10 % Humanserum abgesättigt (Sodeik *et al.*, 1997). Nachfolgend wurden die Zellen mit den jeweiligen primären Antikörpern bei 37° C für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit den jeweiligen sekundären Antikörpern bei 37° C für 30 min. Alle Antikörper wurden in 10 % Humanserum verdünnt. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte für 20 min bei RT unter der Verwendung von TO-PRO-3 (1:1000 in PBS; Molecular Probes; Invitrogen; Karlsruhe) Abschließend wurden die Objektträger mit Moviol 4-88 (Calbiochem), welchem DABCO (25 mg/ml; Sigma) als Ausbleichschutz zugefügt wurde, eingedeckelt. Die konfokale Lasermikroskopie wurde am Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems; Bensheim) durchgeführt. Eingesetzte primäre Antikörper und deren Verdünnungen, die dazugehörigen sekundären Antikörper sowie die bei der Mikroskopie verwendeten Wellenlängen sind in **Tabelle 5** zusammengefasst.

Tab. 5 Antikörper, verwendet bei der konfokalen Lasermikroskopie

| <i>Antikörper</i> | <i>Firma Verdünnung</i> | <i>Sekundär- Antikörper</i> | <i>Firma Verdünnung</i> | <i>Wellenlänge in nm Absorption/Emission</i> |
|--|---|-----------------------------------|-------------------------------------|--|
| α -Neutrophile Elastase polyklonal aus Kaninchen für Granulozyten | Calbiochem 1:600 | Ziege α -Kaninchen Cy2 | Jackson ImmunoResearch 1:1000 | 490/508 |
| α -Neutrophile Elastase polyklonal aus Ziege für HeLa | Santa Cruz 1:300 | Esel α -Ziege Cy2 | Jackson ImmunoResearch 1:400 | 490/ 508 |
| α -Lamp-3 monoklonal aus Maus | Santa Cruz 1:100 | Esel α -Maus RRX | Jackson ImmunoResearch 1:400 | 570/590 |
| α -CD45 monoklonal aus Maus | Zur Verfügung gestellt von AG Schwinzer 1:30 | Esel α -Maus RRX | Jackson ImmunoResearch 1:400 | 570/590 |
| α -Calnexin monoklonal aus Maus | Acris 1:100 | Esel α -Maus RRX | Jackson ImmunoResearch 1:400 | 570/590 |
| α -Giantin polyklonal aus Kaninchen | Hiss Diagnostics 1:1000 | Esel α -Kaninchen TRITC | Jackson ImmunoResearch 1:300 | 550/590 |

3. Ergebnisse

Für die Untersuchungen der funktionellen Auswirkungen von Mutationen der Neutrophilen Elastase bei der Pathogenese von kongenitalen Neutropenien wurde ein humanes Zellmodell generiert. Die Charakterisierung des Zellmodells erfolgte in Hinblick auf Transport und Funktion der mutierten Proteine. Insgesamt wurden 12 verschiedene Mutationen untersucht.

3.1 Generierung und Charakterisierung des U937T Zellmodells

3.1.1 Generierung des Tetrazyklin-abhängigen Genexpressionsystems

Zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Mutationen der HNE und kongenitaler Neutropenie wurden zunächst 10 unterschiedliche Mutationen generiert, die typischerweise bei Patienten mit zyklischer beziehungsweise kongenitaler Neutropenie auftreten. Die Mutationen wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: a) Häufigkeit des Auftretens, b) Vorkommen bei CyN und SCN, c) Veränderung des aktiven Zentrums sowie d) Veränderung der Glykosylierungserkennungssequenz. Zusätzlich wurden im Laufe der Doktorarbeit aufgrund neuerer Erkenntnisse Mutanten erstellt, die in einem putativen Motiv (AP3-Motiv) in der HNE-Proteinstruktur lokalisiert waren. Die ausgewählten Mutationen sind in **Tabelle 6** zusammengefasst und in **Abbildung 5** in der schematischen Struktur der Neutrophilen Elastase dargestellt.

Tab. 6 Auswahl der HNE-Mutanten

| <i>Häufigkeit</i> | <i>Vorkommen in CyN und SCN</i> | <i>Aktives Zentrum</i> | <i>Glykosylierung</i> | <i>AP3-Motiv</i> |
|-------------------|-------------------------------------|----------------------------|-----------------------|------------------|
| V72M | P110L | C42R | InsPQ94 | Y199F |
| C122Y | Δ V161-F170 | P176R | S97L | Y199Stop |
| | R191Q | | Δ V145-C152 | |

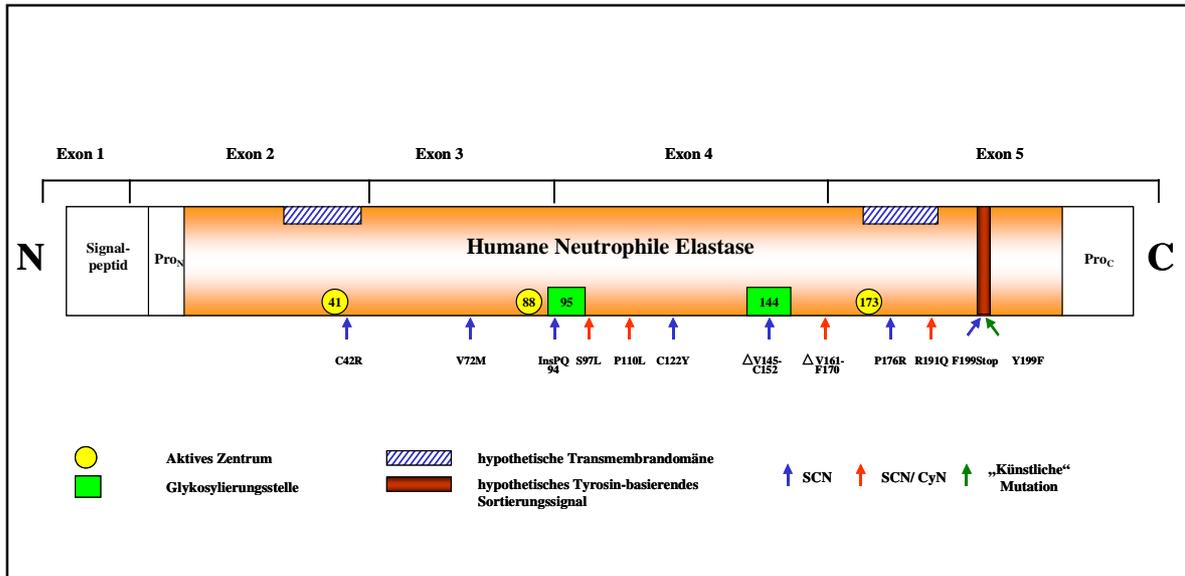


Abb. 5 Schematische Struktur der Humanen Neutrophilen Elastase. Die Neutrophile Elastase ist ein 218 AS großes Protein. Am C-Terminus befindet sich ein Signalpeptid, das ko-translationell entfernt wird. Während des Transportes der Neutrophilen Elastase wird der C- und der N-Terminus abgespalten und das Protein durch zwei komplexe N-Glykosylierungen (Asn-95 und Asn-144) modifiziert. An Position 198 findet man ein Tyrosin-basierendes Signal, das für den Transport dieses Proteins wichtig sein könnte. Das aktive Zentrum der HNE bilden die drei AS His-41, Asp-88 und Ser-173. Die Proteinsequenz enthält 2 potentielle Transmembrandomänen. Die für die Erstellung der Konstrukte ausgewählten Mutationen im *ELA2*-Gen entsprechen Mutationen, die typischerweise bei Patienten mit Neutropenien gefunden werden. Die Mutationen C42R, V72M, InsPQ94, S97L, C122Y, Δ V145-C152, P176 und Y199Stop treten bei Patienten mit schwerer kongenitaler Neutropenie auf, die Mutationen P110L, Δ V161-F170 und R191Q kommen bei SCN sowie CyN vor. Die Mutation Y199F wurde generiert, um das potentielle AP3-Erkennungssignal zu mutieren.

Die mutanten Varianten der Neutrophilen Elastase wurden zunächst im Expressionsvektor pLXIN, der die gesamte Wildtyp-Sequenz der Humanen Neutrophilen Elastase beinhaltet, hergestellt (**Abbildung 6**). Die anschließende Sequenzierung verifizierte die Integrität der Vektoren und das Vorhandensein der gewünschten Mutation.

Anschließend wurden die generierten Vektoren mittels retroviralem Gentransfer in eine humane myeloische Leukämiezelllinie U937T, die den Tet-Off-Vektor (tet-VP16 Gen unter der Kontrolle des tet-Operator Promotors) beinhaltet, eingebracht und stabil HNE-exprimierende Einzelzellklone selektiert und charakterisiert.

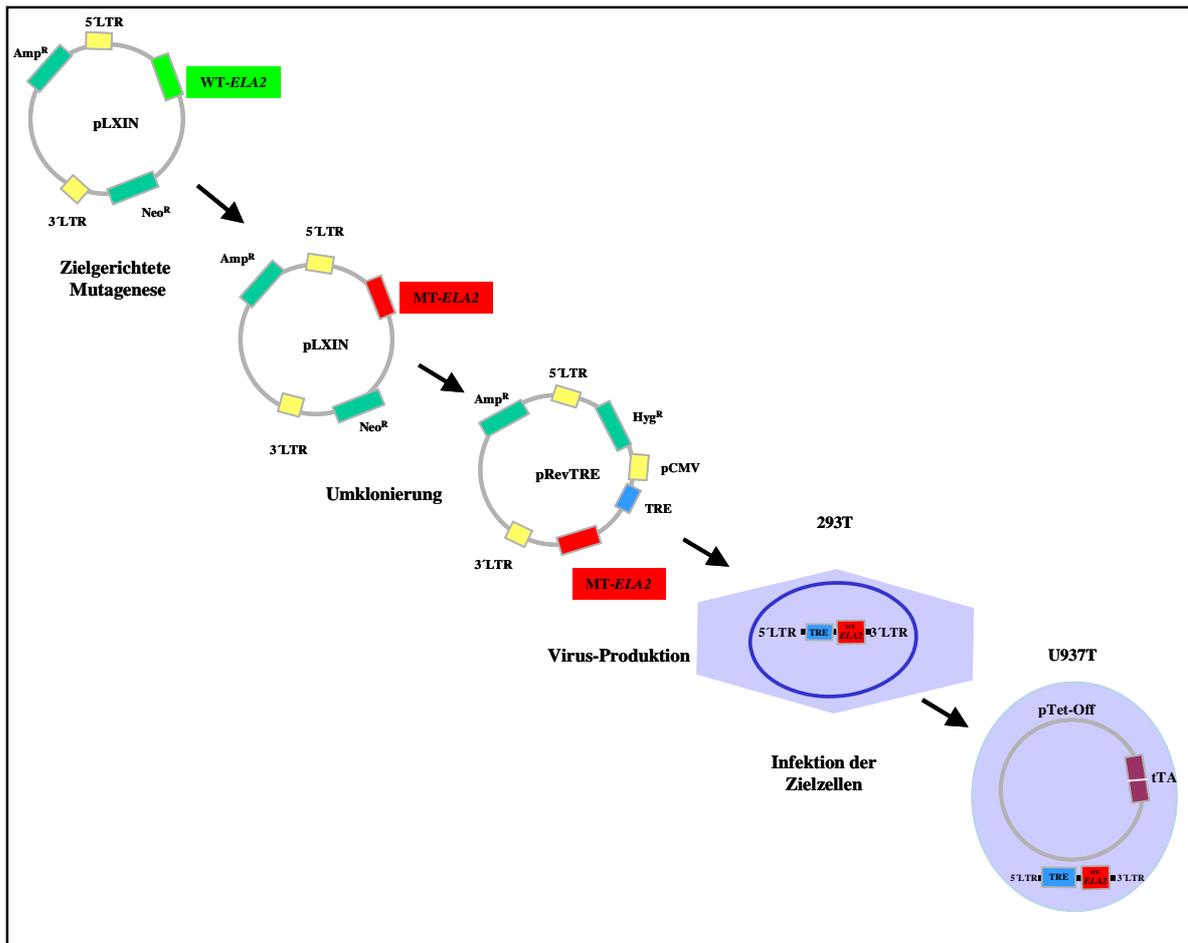


Abb. 6 Schematische Darstellung der Generierung des Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems. Nach erfolgter Mutagenese im pLXIN Vektor wurden die MT-ELA2-Kassetten in den pRevTRE Vektor eingefügt. Anschließend wurden diese Vektoren mittels retroviralem Gentransfers in die humane U937T Zelllinie eingebracht und nachfolgend stabile Einzelzellklone selektiert und charakterisiert.

Das Tetrazyklin-induzierbare Expressionssystem besteht aus zwei Vektoren, pRevTRE und pTet-Off (**Abbildung 7**). Der pRevTRE Vektor beinhaltet eine Klonierungsstelle (MKS), in welche das zu untersuchende Gen kloniert werden kann. Das Gen steht unter der Kontrolle eines durch Tetrazyklin regulierbaren Promotors (TRE). Der pTet-Off Vektor enthält die Sequenz für das tet-VP16 Gen, das über den tet-Operator Promotor (minimaler CMV-Promotor) kontrolliert wird und dessen Aktivierung zur Expression des tTA-Proteins führt. In Anwesenheit von Tetrazyklin besteht eine basale Aktivität des minimalen CMV-Promotors, die in einer sehr geringen Expression des tTA-Proteins resultiert und somit die Aktivierung des TRE-Elements (*tetracycline response element*) verhindert. Durch die Abwesenheit von Tetrazyklin wird die tTA Expression erhöht. Höhere Level an tTA-

Protein wiederum rufen über eine Aktivierung des TRE-Elementes eine Stimulation der Neutrophile Elastase-Genexpression hervor.

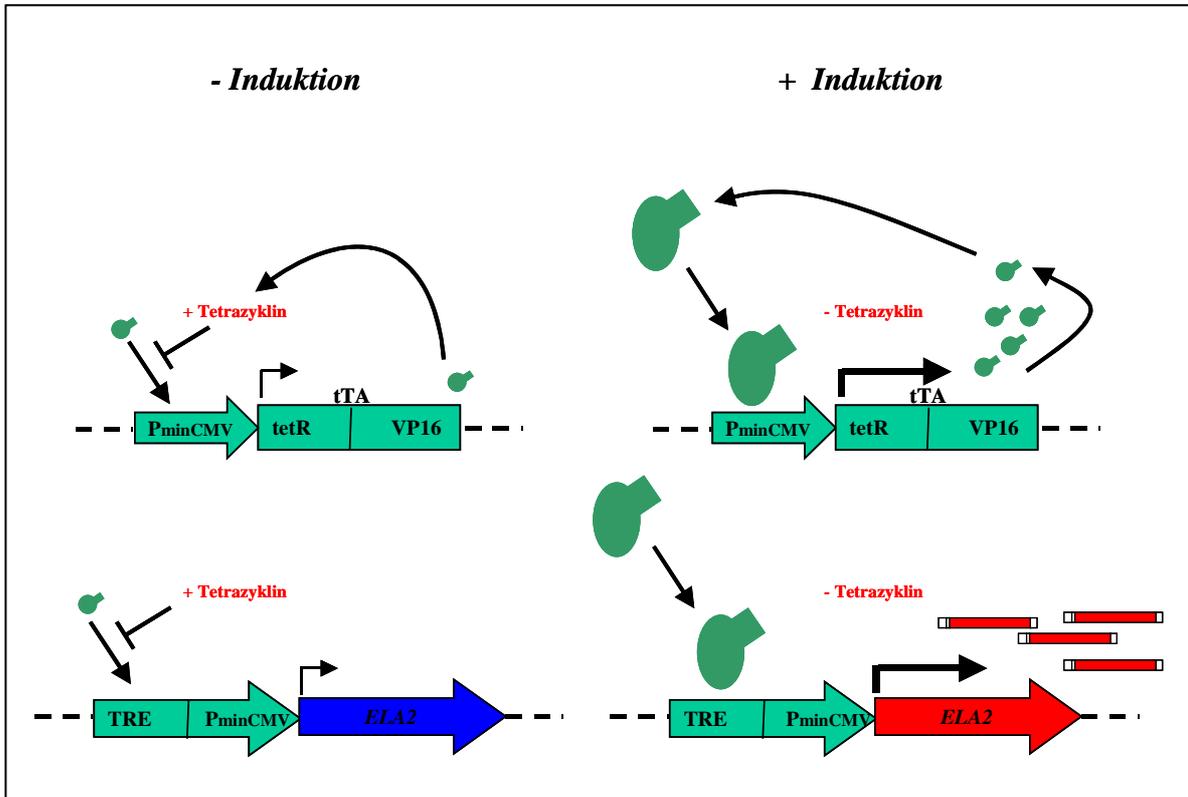


Abb. 7 Funktionsweise des Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionsystems. Durch das Entfernen von Tetrazyklin aus dem Kulturmedium wird die Expression des tTA-Proteins eingeschaltet. Dieses Protein wiederum stimuliert die Expression der Neutrophilen Elastase. Bei der Zugabe von Tetrazyklin zum Zellkulturmedium wird die Expression des tTA-Proteins blockiert und somit auch keine Elastase mehr gebildet.

3.1.2 Charakterisierung des HNE-spezifischen Antikörpers

Im Zuge der Charakterisierung des Zellmodells musste zunächst ein geeigneter Antikörper etabliert werden, da auf eine Vielzahl an unterschiedlichen Elastase-spezifischen Antikörpern zurückgegriffen werden konnte. Vorab wurden auf RNA-Ebene Klone verifiziert, welche eine genügende Expression der Neutrophilen Elastase aufwiesen (vergleiche 3.1.3). Nachfolgend wurde die Spezifität des im Western Blot für das Induktionssystem verwendeten HNE-Antikörpers überprüft. Hierfür erfolgte zunächst die Inkubation des Antikörpers mit dem korrespondierenden Blockierungspeptid. Als Kontrolle dienten sowohl U937T Zellen, die mit dem Leervektor pRevTRE transduziert wurden als auch nicht-induzierte WT-HNE-Zellen. **Abbildung 8** zeigt die Detektion der charakteristischen HNE-Bande mit dem Molekulargewicht von 31 kD nach Promotorinduktion in WT-HNE-exprimierenden Zellen. Sowohl bei der Probe, die mit dem Blockierungspeptid inkubiert wurde als auch bei dem Leervektor, konnte keine HNE-spezifische Bande nachgewiesen werden. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass in nicht-induzierten Zellen nur sehr geringe Mengen an Elastase detektierbar waren.

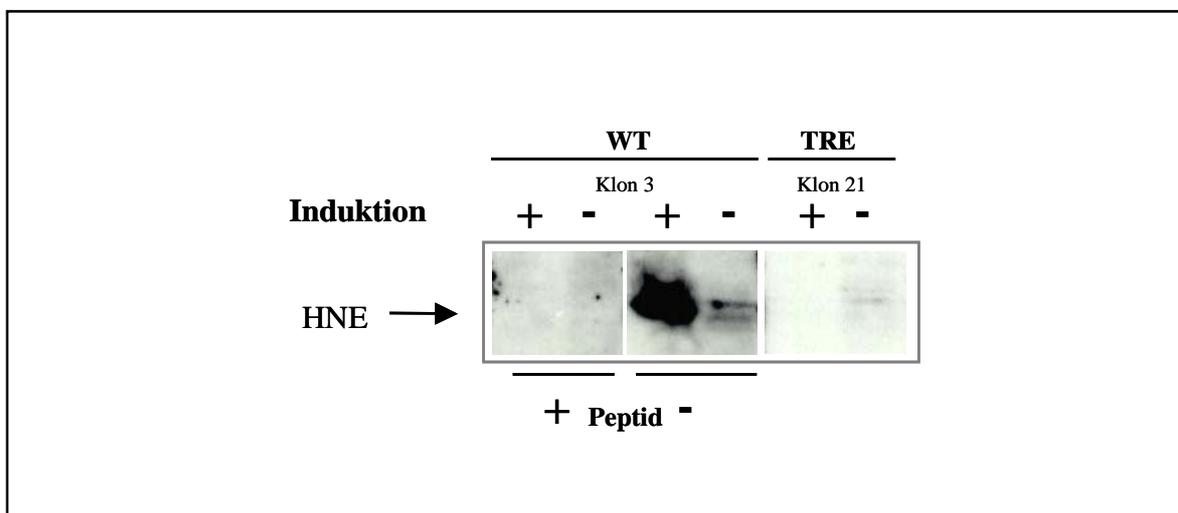


Abb. 8 Analyse der Spezifität des HNE-Antikörpers im Western Blot. Vier Tage nach Promotorinduktion wurden Zelllysate aus WT-HNE und pRevTRE-exprimierenden U937T erstellt. Für die WT-HNE erfolgte zusätzlich eine Peptidkompetition des Antikörpers. Als Kontrollen wurden pRevTRE-exprimierende (Leervektor) und nicht-induzierte WT-HNE-transduzierte Zellen mitgeführt. Es folgte die Auftrennung der isolierten Proteine in einer 14 % SDS-PAGE und der immunologische Nachweis der Neutrophilen Elastase mittels Western Blot.

3.1.3 Charakterisierung der Induktion der HNE-Expression auf RNA- und Protein-Ebene

Um für nachfolgende Analysen geeignete Klone zu finden, die eine ausreichende Promotorinduktion aufweisen, wurde zunächst die HNE-Genexpression auf RNA-Ebene untersucht. Hierfür wurde mittels *Real-Time* RT-PCR die Expression der Neutrophilen Elastase nach Promotorinduktion analysiert. Da nach 24 Stunden Promotorinduktion keine ausreichenden Mengen an Elastase RNA nachweisbar waren, wurden Erntezeitpunkte an Tag 4 und 6 gewählt. Aus **Tabelle 7** kann man den Induktionsstatus der untersuchten Klone auf RNA-Ebene entnehmen. Die Induktion der Genexpression war sehr variabel. Es ergaben sich große Unterschiede in der Promotorinduktion an den beiden untersuchten Zeitpunkten, nicht nur zwischen den Mutanten, sondern teilweise auch zwischen den jeweiligen Einzelzellklonen. Beispielsweise wies C42R Klon 1 eine hohe Induktion an Tag 4 (25 x), an Tag 6 aber keine messbare Promotorinduktion auf. Hingegen zeigte C42R Klon 2 eine nur 10-fache Induktion des Promotors an Tag 4, an Tag 6 war die Elastase aber um das 17-fache erhöht war. Für die Mutanten InsPQ94 und S97L ergab sich eine insgesamt eher niedrige Aktivität des Promotors, die unter einer 10-fachen Induktion lag. Wiederum wiesen die Mutanten WT-HNE Klon 3, C122Y Klon 2 und Δ V145-C152 Klon 1 eine besonders gesteigerte Transgeninduktion von dem über 100-fachen auf. Die *Real-Time* RT-PCR Analysen sollten zunächst Hinweise liefern, ob der Promotor eingeschaltet wird und welche Induktionslevel erreicht werden können. Aufgrund der erhaltenen Daten wurden jeweils zwei bis fünf Klone pro Mutante, welche eine hohe Promotorinduktion auf RNA-Ebene aufwiesen, ausgesucht und nachfolgend auf Protein-Ebene auf ihre Elastase-Induktion analysiert.

Tab. 7 Übersicht der Induktion der ELA2-Expression auf RNA- und Protein-Ebene

| <i>Klon</i> | <i>Fache Induktion auf RNA-Ebene Tag 4</i> | <i>Fache Induktion auf RNA-Ebene Tag 6</i> | <i>Analyse auf Protein-Ebene Tag 4</i> |
|----------------|--|--|--|
| WT-HNE K3 | 151 | 26 | + |
| WT-HNE K23 | 13 | 52 | n.u. |
| WT-HNE K24 | 43 | 0 | + |
| C42R K1 | 25 | 0,2 | +/- |
| C42R K2 | 10 | 17 | + |
| C42R K3 | 10 | 12 | + |
| C42R K4 | 3 | 3 | +/- |
| C42R K5 | 1200 | 6 | + |
| V72M K2 | 48 | 25 | + |
| V72M K11 | 12 | 27 | n.u. |
| V72M K12 | 18 | 18 | n.u. |
| V72M K22 | 26 | 16 | + |
| InsPQ94 K1 | 2 | 4 | n.u. |
| InsPQ94 K2 | 1 | 1 | n.u. |
| InsPQ94 K4 | 2 | 8 | n.u. |
| InsPQ94 K5 | 4 | 5 | + |
| InsPQ94 K9 | n.u. | n.u. | + |
| InsPQ94 K12 | 2 | 8 | n.u. |
| InsPQ94 K14 | n.u. | n.u. | + |
| S97L K1 | 4 | 16 | + |
| S97L K7 | n.u. | n.u. | + |
| S97L K24 | 6 | 7 | n.u. |
| S97L K25 | 9 | 9 | n.u. |
| S97L K26 | 21 | 2 | +/- |
| S97L K48 | 0,2 | 4 | n.u. |
| S97L K49 | 5 | 6 | n.u. |
| P110L K1 | 26 | 5 | +/- |
| P110L K2 | 15 | 13 | n.u. |
| P110L K3 | 3 | 8 | n.u. |
| P110L K9 | 15 | 20 | +/- |
| P110L K10 | n.u. | n.u. | + |
| P110L K30 | n.u. | n.u. | + |
| C122Y K1 | 8 | 24 | n.u. |
| C122Y K2 | 226 | 79 | + |
| C122Y K3 | 14 | 8 | n.u. |
| C122Y K4 | 42 | 15 | + |
| C122Y K5 | 35 | 6 | n.u. |
| ΔV145-C152 K1 | 152 | 54 | + |
| ΔV145-C152 K2 | 2 | 4 | n.u. |
| ΔV145-C152 K19 | 10 | 8 | + |
| ΔV145-C152 K20 | 15 | 8 | + |
| ΔV145-C152 K21 | 24 | 12 | + |
| ΔV161-F170 K1 | 28 | 10 | + |
| ΔV161-F170 K2 | 16 | 18 | n.u. |
| ΔV161-F170 K3 | 11 | 32 | +/- |
| ΔV161-F170 K18 | 3 | 36 | n.u. |
| ΔV161-F170 K19 | 14 | 10 | n.u. |
| P176R K1 | 10 | 15 | +/- |
| P176R K2 | 2 | 5 | n.u. |
| P176R K3 | 0,01 | 21 | + |
| P176R K4 | 4 | 5 | n.u. |
| P176R K5 | 10 | 10 | n.u. |
| P176R K12 | n.u. | n.u. | +/- |
| P176R K13 | n.u. | n.u. | +/- |
| P176R K16 | n.u. | n.u. | + |
| R191Q K1 | 22 | 15 | + |
| R191Q K2 | 17 | 10 | n.u. |
| R191Q K5 | 46 | 16 | + |

Die Expression der Neutrophilen Elastase wurde auf RNA-Ebene sowohl an Tag 4 als auch Tag 6, auf Protein-Ebene lediglich an Tag 4 nach Promotorinduktion untersucht. Die Induktion des Promotors entspricht der -fachen Induktion im Vergleich zum jeweiligen nicht-induzierten Klon. n.u. bezeichnet nicht untersucht; +/- bezeichnet schwache Induktion auf Protein-Ebene; + bezeichnet deutliche Induktion auf Protein-Ebene.

Die beobachtete Variabilität der Promotorinduktion auf RNA-Ebene führte zu der Annahme, dass auch die Induktion der Proteinproduktion starke Unterschiede aufweisen könnte. Aus diesem Grund wurde im ersten Schritt für WT-HNE-exprimierende U937T Zellen sowie für einige Mutanten die Induktionsdauer anhand einer Induktionszeitreihe bestimmt. Die Zellen wurden von Tag 1 bis Tag 4 täglich geerntet und mittels Western Blot analysiert. Wie in **Abbildung 9** gezeigt, war die Expression der WT-Neutrophilen Elastase an Tag 1 sehr gering. Ab Tag 2 nach Promotorinduktion stieg die Expression der Neutrophilen Elastase und erreichte an Tag 4 ein hohes Level an Promotoraktivität. Auch die Induktion der Mutanten P176R und R191Q ergab eine nur sehr geringfügige Expression der Elastase an Tag 1 und erst am Tag 4 eine stabile und ausreichende Synthese des Proteins. Daher wurden alle nachfolgenden Analysen im U937T Zellsystem nach 4-tägiger Promotorinduktion durchgeführt.

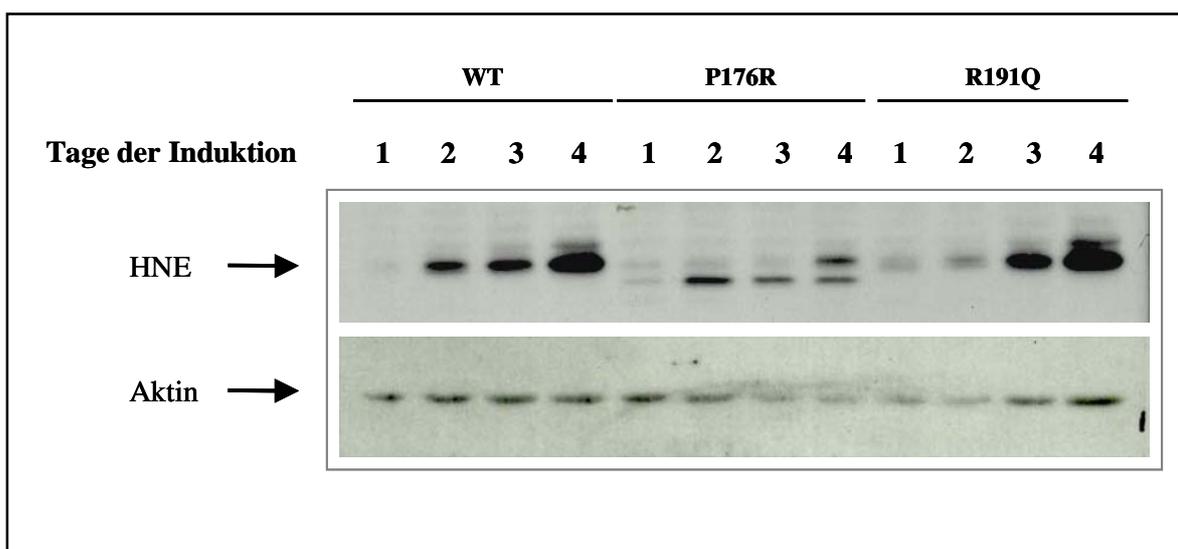


Abb. 9 Analyse der Promotorinduktion auf Protein-Ebene. WT-, P176R- und R191Q-exprimierende U937T Zellen wurden von Tag 1 bis Tag 4 der Induktion täglich geerntet. Anschließend folgte die Auftrennung der isolierten Proteine in einer 14 % SDS-PAGE und der immunologische Nachweis der Neutrophilen Elastase mittels Western Blot. Als Kontrolle der Lademenge wurde β -Aktin detektiert.

Es wurden mindestens zwei Einzelzellklone der jeweiligen HNE-Mutanten auf ihre HNE-Expression auf Protein-Ebene untersucht. **Tabelle 7** gibt die Auswahl der Klone, die auf Protein-Ebene analysiert wurden. Wenn keine ausreichende Induktion der HNE-Proteinbiosynthese für einige Mutanten gezeigt werden konnte, wurden nachfolgend weitere

Klone auf ihre Promotorinduktion auf Protein-Ebene überprüft. Auf eine vorhergehende Analyse der Expression der Elastase auf RNA-Ebene wurde dann verzichtet.

Abbildung 10 zeigt exemplarisch die Analyse der HNE-Induktion verschiedener Einzelzellklone der Mutante P176R mit dem dazugehörigen Aktinnachweis als Ladekontrolle. Man konnte feststellen, dass die Induktion des Klons 12 im Bereich der Nachweisgrenze blieb, während Klon 16 eine starke Induktion der HNE aufwies. Für alle anderen Mutanten zeigten sich vergleichbare Ergebnisse.

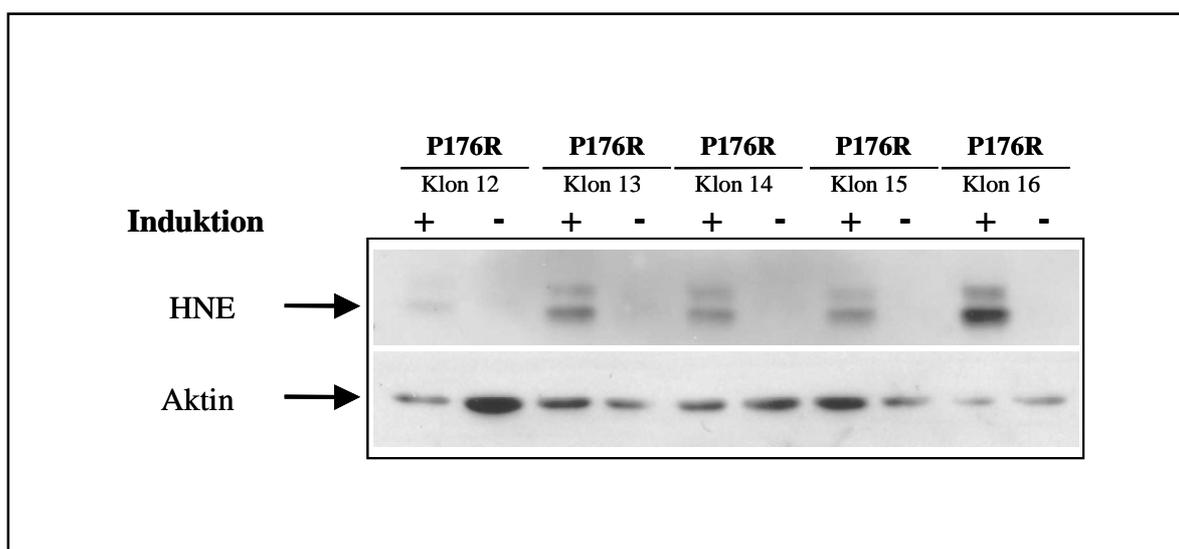


Abb. 10 Charakterisierung der HNE-Mutanten auf Protein-Ebene. P176R-HNE exprimierende Einzelzellklone wurden an Tag 4 der Promotorinduktion geerntet. Anschließend folgte die Auftrennung der isolierten Proteine in einer 14 % SDS-PAGE und der immunologische Nachweis der jeweiligen HNE-Expression mittels Western Blot. Als Kontrolle der Lademenge wurde β -Aktin nachgewiesen.

Um optimale Ergebnisse im U937T Zellsystem zu erhalten, wurden für die Analysen Klone ausgewählt, welche ein hohes Level an Promotorinduktion auf Protein-Ebene zeigten. Die für weitere Untersuchungen im U937T Zellmodell ausgewählten Einzelzellklone sind in **Abbildung 11** mit und ohne Promotorinduktion auf Protein-Ebene einschließlich ihres Induktionsstatus dargestellt. Der Induktionsstatus wurde berechnet durch den Vergleich zum jeweiligen nicht-induzierten Klon.

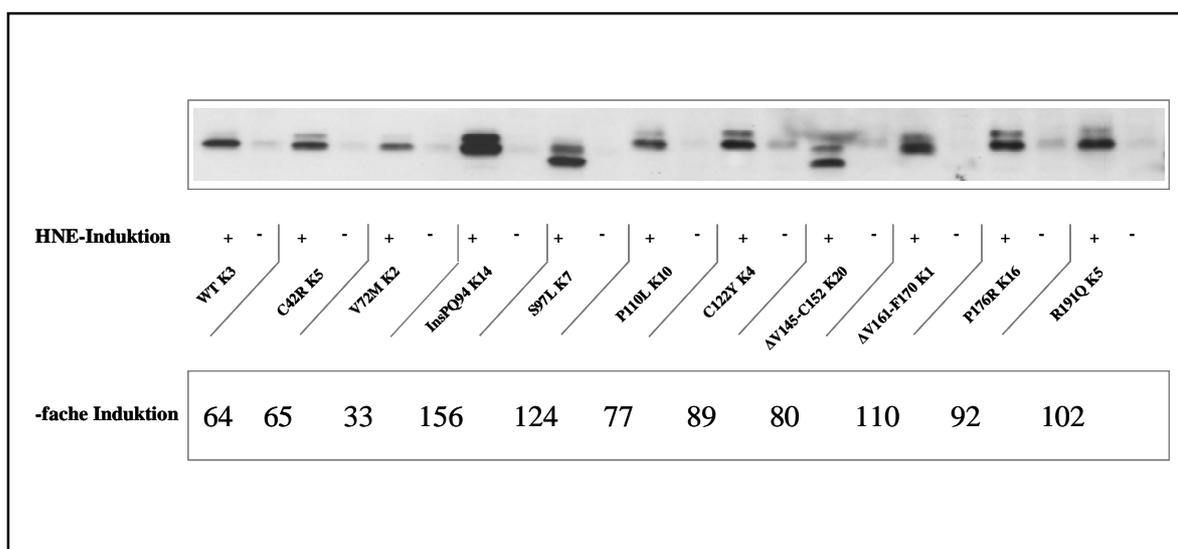


Abb. 11 Induktion der HNE-Proteinexpression im U937T Zellmodell. HNE-exprimierende Einzelzellklone wurden an Tag 4 der Promotorinduktion geerntet. Anschließend folgte die Auftrennung der isolierten Proteine in einer 14 % SDS-PAGE und der immunologische Nachweis der Neutrophilen Elastase mittels Western Blot.

3.2 Analyse der Lokalisation und Funktion der HNE in Zelllinien

3.2.1 Analyse des Glykosylierungsmusters der HNE in U937T

Die humane Neutrophile Elastase besitzt zwei potentielle Glykosylierungsstellen, Asparagin-95 sowie Asparagin-144, die beide während des Transportes glykosyliert werden (Gullberg *et al.*, 1995). Nach dem Anfügen der mannosereich glykosylierten Zuckerketten an das Asparagin im endoplasmatischen Retikulum erfolgt die Modifikation der Oligosaccharide in komplexe Formen im Golgi-Apparat. Die Endoglykosidase H und Endoglykosidase F entfernen diese durch posttranslationelle Modifikationen N-glykosidisch gebundene Zuckerseitenketten. Dementsprechend gibt die Endoglykosidase H und Endoglykosidase F-Behandlung von Gesamtzelllysaten eine gute Aussage über die intrazelluläre Prozessierung sowie den Transport eines Glykoproteins in der Zelle. Endo H spaltet die mannosereichen Zuckerketten, die im ER angefügt werden, ab, während die im Golgi-Apparat prozessierten komplexen Formen gegenüber der Endo H resistent bleiben. Endo F deglykosyliert sowohl mannosereich N-glykosidisch gebundene Oligosaccharide als auch komplex glykosylierte Formen. Ein deglykosyliertes Protein lässt sich von der glykosylierten Form aufgrund seines geringeren Molekulargewichtes durch

ein anderes Migrationsverhalten im Acrylamidgel differenzieren. Die Glykosylierung fungiert nicht nur als ein Transportsignal, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Gewährleistung der richtigen Faltung eines Proteins oder seiner Löslichkeit (Varki, 1993; Helenius & Aebi, 2001). Aus diesem Grund war es von großem Interesse, ob aufgrund der Mutationen die Glykosylierung der Neutrophilen Elastase verändert wird.

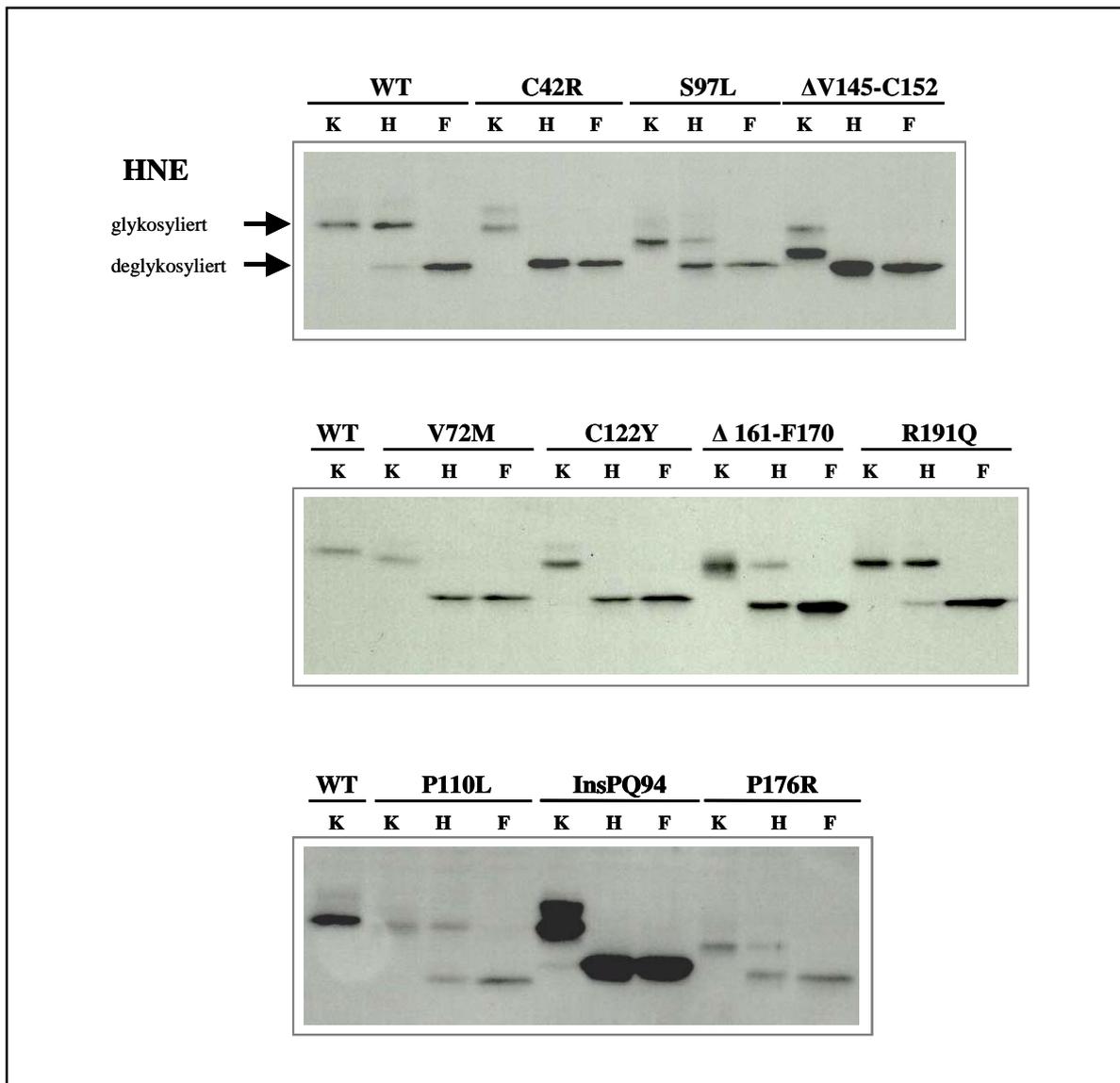


Abb. 12 Analyse des Glykosylierungsmusters der HNE nach Endo H-, Endo F-Behandlung von Gesamtzelllysaten. Vier Tage nach Promotorinduktion wurden die Zellen geerntet und Gesamtproteinlysate erstellt. Die Proteinlysate wurden jeweils mit Endoglycosidase H (H), N-Glycosidase F (F) oder ohne Zugabe der Enzyme (Kontrolle; K) behandelt. Anschließend folgte die Auftrennung der isolierten Proteine in einer 12 % SDS-PAGE und der immunologische Nachweis der Neutrophilen Elastase mittels Western Blot.

Die Analyse der Glykosylierungsmuster in WT- und MT-HNE-exprimierenden U937T Zellen erfolgte nach 4-tägiger Promotorinduktion. Nach der Endoglykosidase H-Behandlung und anschließendem Western Blot wies die WT-HNE 2 Banden auf (**Abbildung 12**). Bei der oberen Bande handelte es sich um die komplex-glykosylierte Form der HNE, die nicht durch die Endoglykosidase H gespalten wurde, also eine Endo H-Resistenz aufwies. Die untere Bande stellte die deglykosylierte Form der HNE dar. Hierbei waren die mannosereichen Zuckerketten der Neutrophilen Elastase sensitiv gegenüber der Endoglykosidase H-Behandlung und wurden nachfolgend durch das Enzym abgespalten. Die densitometrische Quantifizierung ergab ein Verhältnis von der oberen zur unteren Bande von circa 4:1. Des Weiteren konnte nach der Endo F-Behandlung der WT-HNE eine Sensitivität gegenüber der Endoglykosidase F festgestellt werden. Hierbei wurden durch das Enzym sowohl die mannosereichen als auch die komplexen Ketten abgespalten. Im Gegensatz zu der WT-HNE zeigten die Mutanten C42R, V72M, InsPQ94, C122Y und Δ V145-C152 einen Verlust der Endo H-Resistenz, die das Fehlen der komplex-glykosylierten Formen der HNE bei diesen Mutationen aufzeigten.

Die Mutanten S97L, P110L, Δ V161-F170, P176R und R191Q zeigten ein Glykosylierungsmuster, das dem der WT-HNE ähnlich war, das heißt, es war auch hier eine partielle Endoglykosidase H-Resistenz zu beobachten. Hierbei ist allerdings zu bemerken, dass die Mutanten S97L, Δ V161-F170 und P176R ein Verhältnis der Bandenintensität zwischen der oberen und der unteren Form von circa 1:4 aufwiesen. Dieses deutet darauf hin, dass die Mehrzahl der Proteine nur mannosereich und nicht komplex-glykosyliert wurde. Bei der Mutante P110L waren beide Formen zu etwa 50 % vertreten. Lediglich die Mutante R191Q zeigte eine Verteilung des Glykosylierungsmusters, welches mit dem der WT-HNE gänzlich übereinstimmte. Das leicht veränderte Migrationsverhalten einiger Mutanten könnte auf einen Verlust einer Glykosylierungsstelle (S97L, P176R) oder auf durch Mutationen bedingte Änderungen des Molekulargewichtes (Δ V145-C152, Δ V161-F170) zurückzuführen sein. Ob bei der Mutante Δ V145-C152 nur eine Glykosylierungsstelle verwendet wurde, konnte mit Hilfe dieser Methode nicht festgestellt werden. Bei der Mutante InsPQ94 war wiederum eine Erhöhung des Molekulargewichtes feststellbar, die aufgrund der Insertion zweier Aminosäuren in die Proteinstruktur entstand. Das Fehlen der Modifizierung der mannosereichen Formen in die komplex-glykosylierten Formen der HNE bei einigen

Mutanten deutete auf eine Störung des intrazellulären Transportes der Neutrophilen Elastase.

3.2.2 Analyse der Lokalisation der HNE in U937T mittels differentieller Zentrifugation

Die Analyse der subzellulären Verteilung der mutanten HNE im Vergleich zur WT-HNE wurde im ersten Schritt mittels differentieller Zentrifugation durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, Zellorganellen aufgrund ihrer Dichte zu separieren und anschließend individuell zu analysieren, um so die Verteilung des Proteins innerhalb der Zelle zu beurteilen. Für die Analyse wurden vier verschiedene Fraktionen gewonnen, die nachfolgend mittels Western Blot analysiert wurden.

Die Analyse des Verteilungsmusters mittels subzellulärer Zentrifugation in WT- und MT-HNE-exprimierenden U937T Zellen erfolgte nach 4-tägiger Promotorinduktion. Fraktion P1 (1000 x g) enthielt hauptsächlich die Zelltrümmer und die Zellkerne. Fraktion P2 (10 000 x g) beinhaltete die mitochondrialen, lysosomalen und ER-Proteine. Die mikrosomale Fraktion P3 (100 000 x g) bestand aus den sekretorischen sowie Golgi- und Plasmamembranen. Fraktion S, welche nach der 100 000 x g Zentrifugation als Überstand verblieb, enthielt die löslichen, zytosolischen Proteine. Um die gewonnenen Fraktionen zu charakterisieren, erfolgte eine immunologische Analyse von Organell-spezifischen Markern im Western Blot (**Abbildung 13B**). Als Marker für die nukleäre Fraktion P1 diente dabei das nukleäre Porenkomplex Protein Nup 153 (190 kD), während Lamp-2 (120 kD), ein lysosomales Protein, die Fraktion P2 charakterisierte. Um die Fraktion P3 und S zu beschreiben, wurde Clathrin (180 kD), das sowohl membranständig wie auch löslich vorkommt, verwendet. Um die Verteilung von ER und dem Golgi-Komplex zu definieren, wurden Calnexin (90 kD) und GM130 (130 kD) eingesetzt. Aus **Abbildung 13B** wird ersichtlich, dass die Verteilung der Organell-spezifischen Marker für die WT- und MT-HNE vergleichbar war. Somit konnte die Reinheit der gewonnenen Fraktionen bestätigt werden.

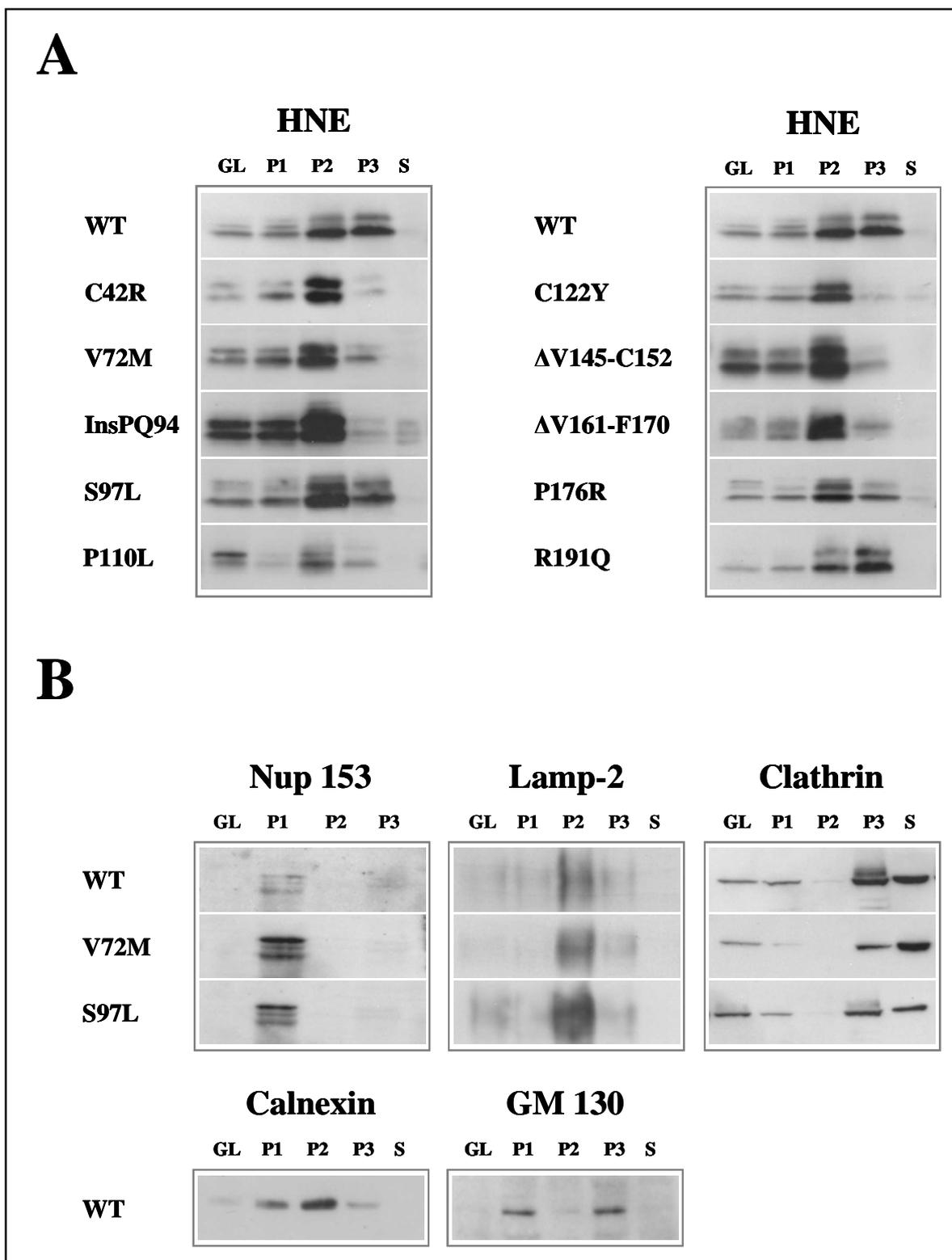


Abb. 13 Analyse der subzellulären Verteilung der HNE in U937T mittels differentieller Zentrifugation.

(A) Vier Tage nach Promotorinduktion wurden HNE-exprimierende Zellen mittels differentieller Zentrifugation in subzelluläre Kompartimente unterteilt. Anschließend folgte die Auftrennung der isolierten Proteine in einer 8 oder 14 % SDS-PAGE und der immunologische Nachweis der jeweiligen Proteine mittels Western Blot. (B) Zur Charakterisierung der mittels differentieller Zentrifugation gewonnenen Fraktionen wurden spezifische Organell-Marker verwendet. Das nukleäre Porenkomplex Protein Nup 153 (190 kD) definierte die Fraktion P1, während Lamp-2 (120 kD), ein lysosomales Protein Fraktion P2 charakterisierte. Um die Fraktion P3 und S zu beschreiben, wurde Clathrin (180 kD), das sowohl membranständig als auch löslich vorkommt, verwendet. Um die Verteilung des ER und des Golgi-Komplex zu definieren, wurden Calnexin (90 kD) und GM130 (130 kD) eingesetzt.

Wie in **Abbildung 13A** gezeigt, konnte die WT-HNE in vergleichbaren Anteilen hauptsächlich in der lysosomalen Fraktion (P2) und der 100 000 x g-Fraktion (P3), welche die sekretorischen Vesikel sowie den Golgi-Komplex und die Plasmamembranen enthielt, detektiert werden. Während eine geringere Menge an Elastase in Fraktion P1 aufgezeigt wurde, war in der löslichen Fraktion S kein HNE-Protein nachweisbar. Die Mutanten S97L, P110L, P176R und R191Q zeigten ein dem WT-HNE ähnliches Verteilungsmuster in der Zelle. Unterschiede in der subzellulären Verteilung konnten für die Mutanten C42R, V72M, InsPQ94, C122Y, Δ V145-C152 und Δ V161-F170 erfasst werden. Verglichen mit der WT-HNE war bei diesen Mutanten in P3 eine signifikant reduzierte Menge an HNE-Proteinen zu detektieren.

Dieses Ergebnis bestätigte die Daten aus der vorausgegangenen Untersuchung des Glykosylierungsmusters. Erneut zeigten einige Mutanten signifikante Unterschiede verglichen zur WT-HNE. Diejenigen Mutanten, welche ein Fehlen der komplexen Glykosylierung aufwiesen, demonstrierten auch einen Verlust der Neutrophilen Elastase in der Fraktion P3, die den Golgi-Apparat beinhaltet. Nur die Mutante Δ V161-F170 wich von diesem Muster ab und zeigte Abweichungen in der intrazellulären Distribution des Proteins trotz eines anscheinend normalen Glykosylierungsstatus.

3.2.3 Analyse der Lokalisation der HNE mittels konfokaler Lasermikroskopie in HeLa

Um die Resultate der subzellulären Fraktionierung zu bestätigen und zu präzisieren, wurde die konfokale Lasermikroskopie eingesetzt. Die ersten Ergebnisse im U937T Zellmodell zeigten jedoch, dass die Kompartimente in diesen Zellen aufgrund des schmalen Zytoplasmasaums um den äußerst großen Zellkern sehr schwer definierbar sind, wie es in **Abbildung 14** deutlich wird. Aus diesem Grund wurden die Experimente in der humanen Zelllinie HeLa nach transienter Transfektion mit *ELA2*-Expressionsvektoren durchgeführt.

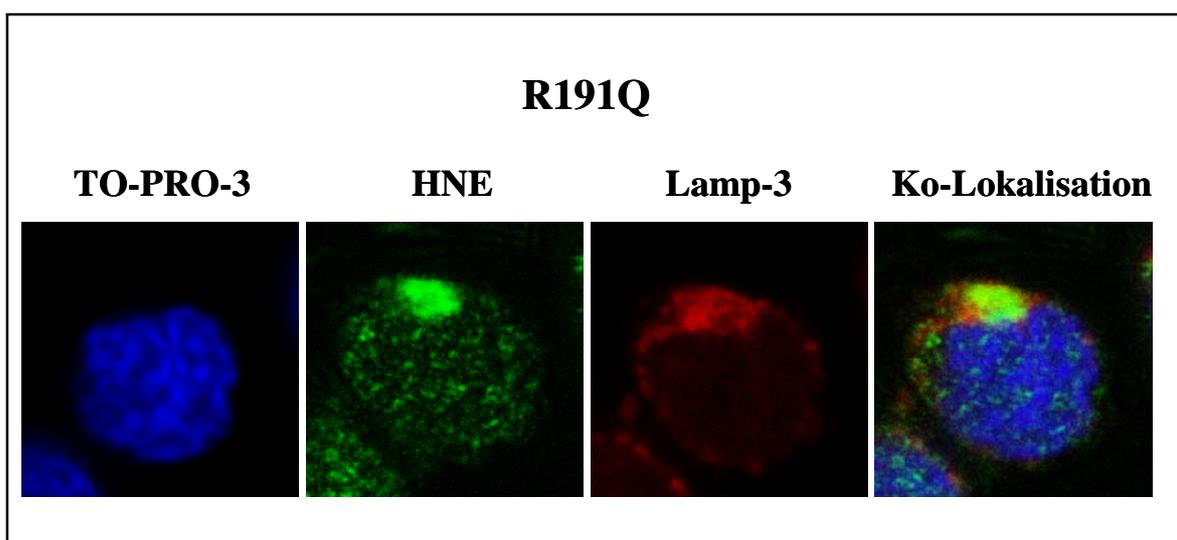


Abb. 14 Analyse der subzellulären Lokalisation der HNE in U937T Zellen mittels konfokaler Mikroskopie. Vier Tage nach Promotorinduktion erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung der R191Q-HNE exprimierenden U937T Zellen. Für die Anfärbung der HNE wurde ein α -HNE Antikörper verwendet (detektiert mit Cy2-konjugiertem Sekundärantikörper: grün). Um die lysosomalen Strukturen anzufärben, wurde Lamp-3 eingesetzt (detektiert mit RRX-konjugiertem Sekundärantikörper: rot). Die Kerne wurden mit TO-PRO-3 gegengefärbt (blau). Gelb zeigt die Ko-Lokalisation der Neutrophilen Elastase mit dem Organell-Marker.

Abbildung 15 zeigt die mit WT- oder MT-HNE Sequenzen (im pLXIN-Expressionsvektor) transient transfizierten HeLa Zellen. Es konnte festgestellt werden, dass die WT-HNE eine deutliche Färbung im Bereich der Golgi-Strukturen aufwies. Eine Ko-Lokalisation mit dem ER- oder dem lysosomalen Marker konnte nicht detektiert werden. Auch die Mutante R191Q zeigte ein der WT-HNE vergleichbares Verteilungsmuster und ko-lokalisierte mit dem Golgi-Marker Giantin. Ein abweichendes Bild zeigten die weiteren untersuchten Mutanten. Am auffälligsten war dabei Mutation C122Y, die weder mit dem Golgi-Komplex, noch mit dem lysosomalen Marker Lamp-3 ko-lokalisierte. Statt dessen befand sich das mutante Protein im gesamten Zytoplasma verteilt, wo es teilweise mit Calnexin (ER-Marker) ko-lokalisierte. Desgleichen zeigten die Mutanten Δ V161-F170 und P176R eine Veränderung der Lokalisation im Vergleich zur WT-HNE. Interessanterweise demonstrierten diese eine Ko-Lokalisation sowohl im Bereich der Golgi-Strukturen als auch teilweise der Strukturen des endoplasmatischen Retikulums. Ebenso wie bei der Mutante C122Y wurde auch hier eine signifikante Verteilung der mutanten Proteine im Zytoplasma sichtbar. Ferner konnte man feststellen, dass die Verteilung der eingesetzten Organell-Marker für alle untersuchten Proben ein vergleichbares Muster aufwies.

Wie schon die Fraktionierungsversuche vermuten ließen, wiesen auch die Immunfärbungen auf eine Störung des intrazellulären Transportes der mutanten Elastase hin. Zudem konnte man eine Akkumulation des mutanten Proteins in den Strukturen des Zytoplasmas beobachten.

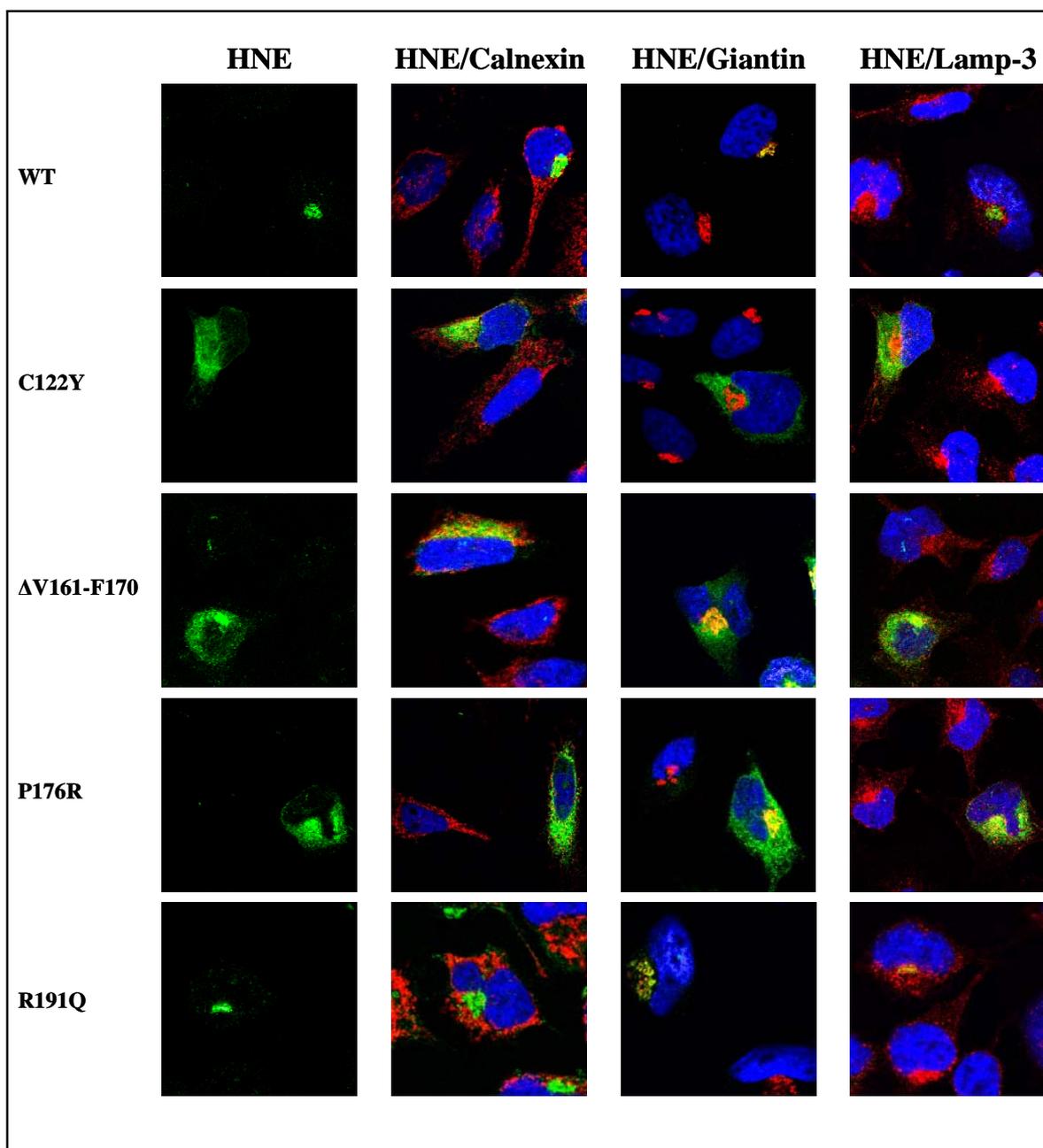


Abb. 15 Analyse der subzellulären Lokalisation der HNE in transient transfizierten HeLa Zellen mittels konfokaler Mikroskopie. Zwei Tage nach transienter Transfektion der HeLa Zellen erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellen. Für die Anfärbung der HNE wurde ein α -HNE Antikörper verwendet (detektiert mit Cy2-konjugiertem Sekundärantikörper: grün). Um die einzelnen Organellen in der Zelle sichtbar zu machen, wurden Antikörper gegen Calnexin (ER), Giantin (Golgi) oder Lamp-3 (Lysosomen) eingesetzt (jeweils detektiert mit RRX-konjugiertem Sekundärantikörper: rot). Die Kerne wurden mit TO-PRO-3 gegengefärbt (blau). Gelb zeigt die Ko-Lokalisation der Neutrophilen Elastase mit den Organell-Markern.

3.2.4 Analyse der Sekretion von HNE in U937T

Die Neutrophile Elastase wird in die azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten transportiert, von wo aus sie nach einem Stimulus reguliert sezerniert wird. Neuere Untersuchungen zeigten, dass die Elastase ebenfalls zu einem großen Teil über die konstitutive Sekretion aus der Zelle herausgeschleust wird (Garwicz *at al.*, 2005). Da eine Transportstörung der mutanten Elastase festgestellt worden ist, war von Bedeutung, ob die Sekretion des Proteins trotz Mutation noch möglich ist. Zur Untersuchung der Fähigkeit zur Sekretion des Proteins abhängig vom Mutationsstatus der HNE wurde ein HNE-ELISA eingesetzt.

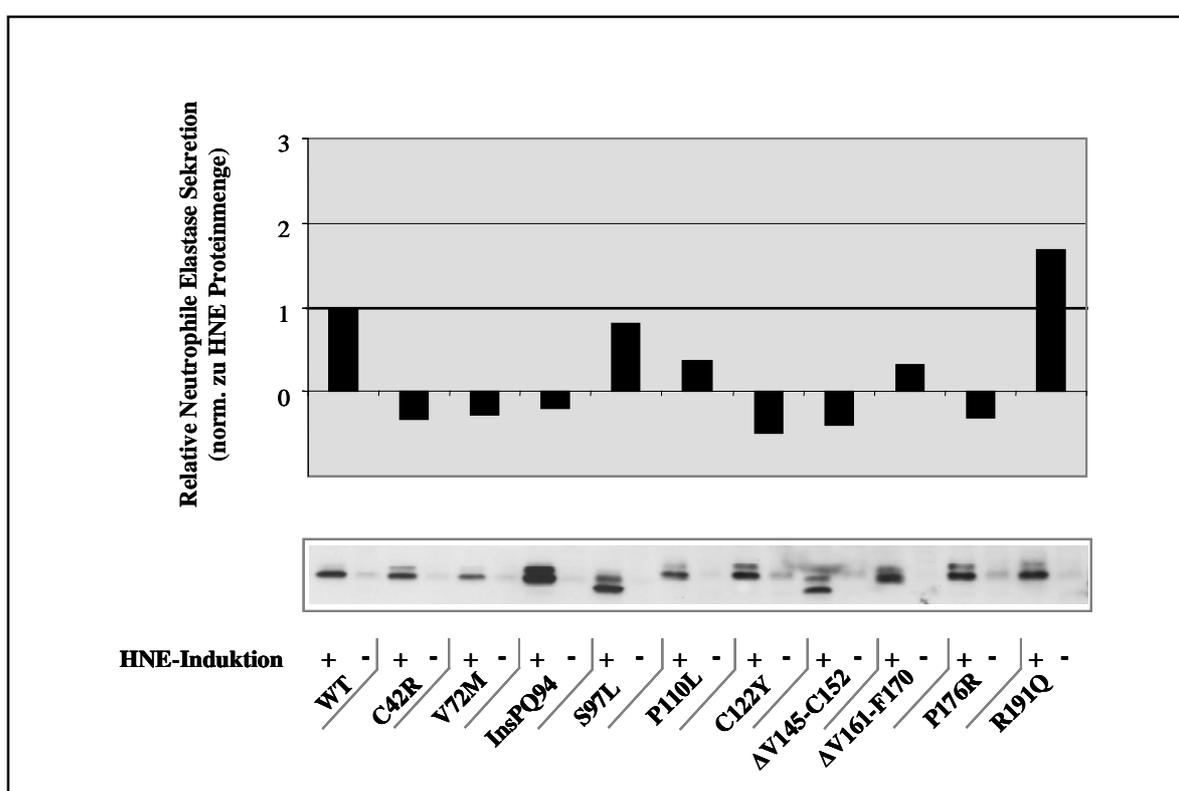


Abb. 16 Sekretion der Neutrophilen Elastase in U937T Zellen. Vier Tage nach Induktion des Promotors wurden die Zellüberstände sowie die Proteine geerntet. Die Sekretion der Neutrophilen Elastase wurde mittels eines HNE-ELISA bestimmt. Die relative Sekretion wurde definiert als die Differenz zwischen der Sekretion mit und ohne Promotorinduktion und wurde normalisiert zur Menge an synthetisierter HNE (bestimmt über den Western Blot).

Die Analyse der Sekretion von WT- und MT-HNE in das Kulturmedium erfolgte nach 4-tägiger Promotorinduktion. Dabei wurde die relative Sekretion definiert als die Differenz zwischen der Sekretion mit und ohne Promotorinduktion und wurde anschließend zur

Menge an synthetisierter HNE (bestimmt über den Western Blot) normalisiert. Für die WT-HNE konnte eine Sekretion ins Zellkulturmedium detektiert werden (**Abbildung 16**). Zur WT-HNE vergleichbare Sekretionslevel wurden für die Mutante S97L gefunden. Interessanterweise wies die Mutante R191Q eine leicht erhöhte Sekretion auf. Eine signifikante Reduktion der Sekretionskapazität demonstrierten die Mutanten P110L sowie Δ V161-F170. Bei den Mutanten C42R, V72M, InsPQ94, C122Y, Δ V145-C152 sowie P176R war die Sekretion sogar vollständig blockiert.

Auch das Ergebnis der Sekretion unterstützte die bisherigen Untersuchungen im Bezug auf eine Transportstörung der mutanten Neutrophilen Elastase.

3.2.5 Analyse der proteolytischen Aktivität von HNE in U937T

Die Neutrophile Elastase ist gegenüber einem breiten Spektrum an Proteinen aktiv. Sie ist in der Lage, sowohl Kollagen und Elastin zu degradieren als auch synthetische Substrate wie Succinyl-Ala-Ala-Ala-pNitroanilid zu spalten (Lee *et al.*, 2001). Da einige Mutationen ebenfalls das aktive Zentrum der Neutrophilen Elastase betreffen, stellte sich die Frage, inwieweit sich der Mutationsstatus auf die proteolytische Aktivität der Mutanten auswirkt. Um die proteolytische Aktivität der mutierten Elastase zu untersuchen, wurden zwei typische synthetische Substrate verwendet, Succinyl-Ala-Ala-Ala-pNitroanilid und MeO-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Val-pNitroanilid. Die relative Aktivität wurde definiert als Differenz zwischen Aktivität mit und ohne Promotorinduktion und wurde normalisiert zur Menge an synthetisierter HNE (bestimmt über den Western Blot).

Vier Tage nach Promotorinduktion wurde die proteolytische Aktivität von WT- und MT-HNE gegenüber Suc-Ala-Ala-Ala-pNA und MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA gemessen. Wie in **Abbildung 17** gezeigt ist, war bei der WT-HNE für beide Substrate eine proteolytische Aktivität messbar. Die Mutanten S97L und R191Q wiesen eine erhöhte relative proteolytische Aktivität im Vergleich zur WT-HNE auf. Im Gegensatz dazu waren die beiden Mutanten C42R und P176R gegenüber den angebotenen Substrate nicht aktiv. Zusätzlich zu den erwarteten Funktionsstörungen dieser beiden Mutanten, welche Mutationen des aktiven Zentrums tragen, konnte ebenfalls keine proteolytische Aktivität

für die Mutanten V72M, InsPQ94, P110L, C122Y, Δ V145-C152 und Δ V161-F170 nachgewiesen werden.

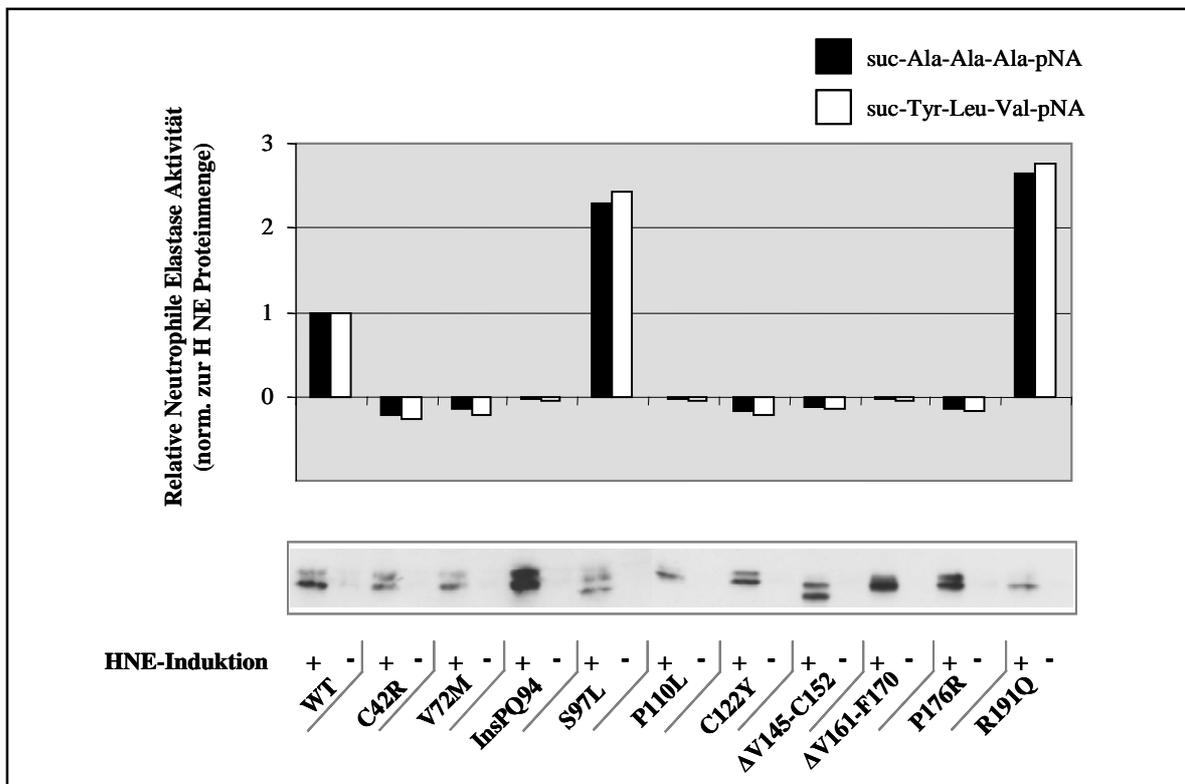


Abb. 17 Analyse der proteolytischen Aktivität der mutanten Neutrophilen Elastase. Vier Tage nach Induktion des Promotors wurden die Zellen geerntet und Lysate erstellt. Es folgte die Messung der proteolytischen Aktivität der mutanten Elastase gegenüber den Substraten suc-Ala-Ala-Ala-pNA sowie suc-Tyr-Leu-Val-pNA im Vergleich zur WT-HNE. Die relative Aktivität wurde definiert als die Differenz zwischen der Aktivität mit und ohne Promotorinduktion und wurde normalisiert zur Menge an synthetisierter HNE (bestimmt über den Western Blot).

Weiterhin wird vermutet, dass mutante Formen der Elastase Änderungen in der Interaktion mit Inhibitoren aufweisen. Bekannte, physiologisch vorkommende Elastase-Inhibitoren sind α 1-Antitrypsin, SLPI und Eglin. Um festzustellen, ob Mutationen eine Auswirkung auf das Zusammenspiel zwischen der Neutrophilen Elastase und ihrem Inhibitor aufzeigen, wurde die proteolytische Aktivität der Elastase gegenüber dem Substrat suc-Ala-Ala-Ala-pNA unter dem Einfluss von α 1-Antitrypsin getestet.

Abbildung 18 zeigt eine deutlich reduzierte Aktivität für die WT-HNE sowie die Mutanten S97L und R191Q unter der Zugabe des Inhibitors. Schwer beurteilbar war hingegen die Aktivitätsinhibierung bei den Mutanten, die eine sehr starke Suppression der proteolytischen Aktivität bereits ohne Zugabe von α 1-Antitrypsin aufwiesen.

Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der Analyse der Inhibition der Elastase mit SLPI erhalten (Daten nicht gezeigt).

Diese Beobachtungen wiesen darauf hin, dass die Neutrophile Elastase, abhängig von ihren Mutationsstatus, einen Verlust in der Protease-Aktivität erfuhr.

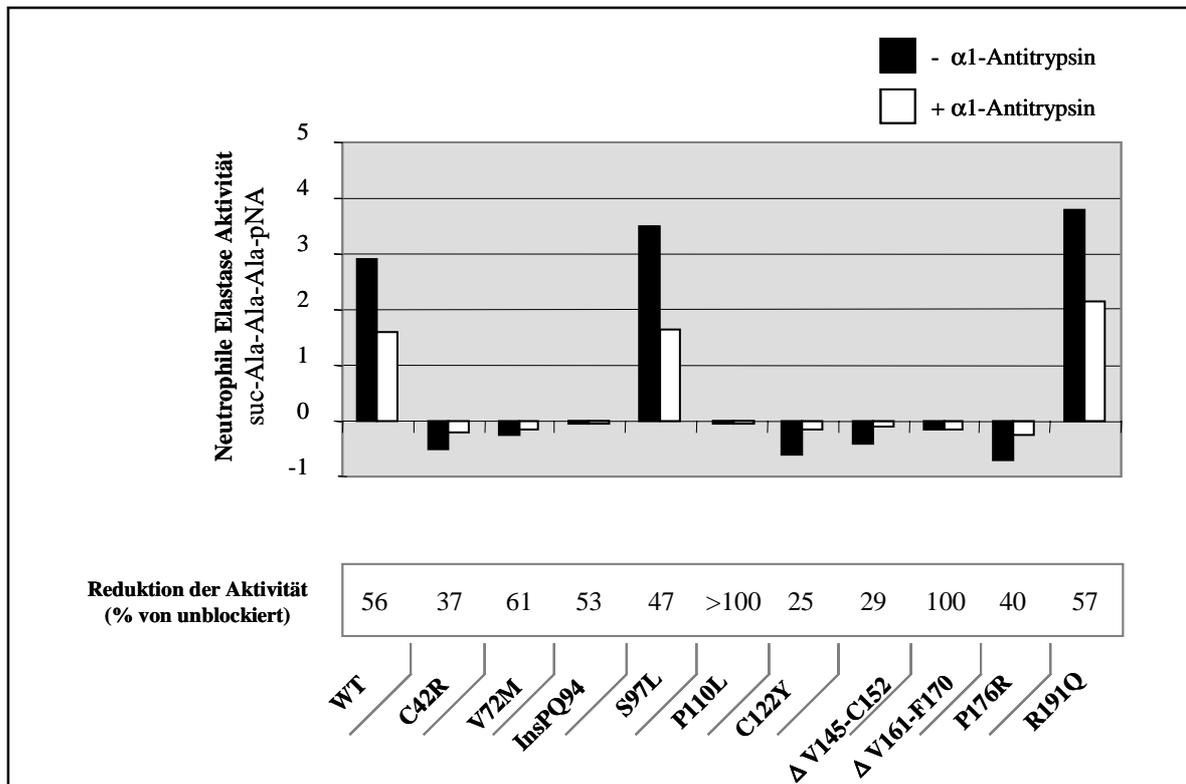


Abb. 18 Inhibition der proteolytischen Aktivität der HNE mittels α 1-Antitrypsin. Vier Tage nach Induktion des Promotors wurden die Zellen geerntet und die Lysate erstellt. Es folgte die Messung der proteolytischen Aktivität der mutanten Elastase gegenüber dem Substrat suc-Ala-Ala-Ala-pNA mit und ohne die Zugabe des α 1-Antitrypsin. Die Aktivität wurde definiert als die Differenz zwischen der Aktivität mit und ohne Promotorinduktion. Die Inhibition der proteolytischen Aktivität ist prozentual zur unblockierten Aktivität für die jeweilige Mutante dargestellt.

3.2.6 Analyse der CPT-abhängigen Apoptose in U937T

Da Serinproteasen proapoptotisch wirken können (Trevani *et al.*, 1996), wird angenommen, dass mutante HNE-Proteine möglicherweise über eine aberrante Enzymfunktion in den Zellen eine verstärkte Apoptoseinduktion bewirken. Des weiteren konnte von Aprikyan *et al.* eine verstärkte Apoptoserate in Patienten demonstriert werden (Aprikyan *et al.*, 2001). Zur Analyse der Apoptose im U937T Zellmodell wurde zunächst die spontane Apoptose von MT-HNE-exprimierenden Zellen mittels eines Annexin V-Assays bestimmt. Da jedoch diese Zellen keine eindeutige Erhöhung der spontanen

Apoptoserate im Vergleich zu WT-HNE exprimierenden U937T Zellen aufwiesen, wurden die Zellen mit dem Apoptoseinduktor Camptothecin behandelt. Camptothecin ist ein Inhibitor der DNA-Synthese und ein Induktor von Brüchen in der chromosomalen DNA (Hsiang *et al.*, 1985). Die Apoptoserate wurde anschließend anhand von Annexin V-positiven Zellen mittels einer FACS-Messung quantifiziert.

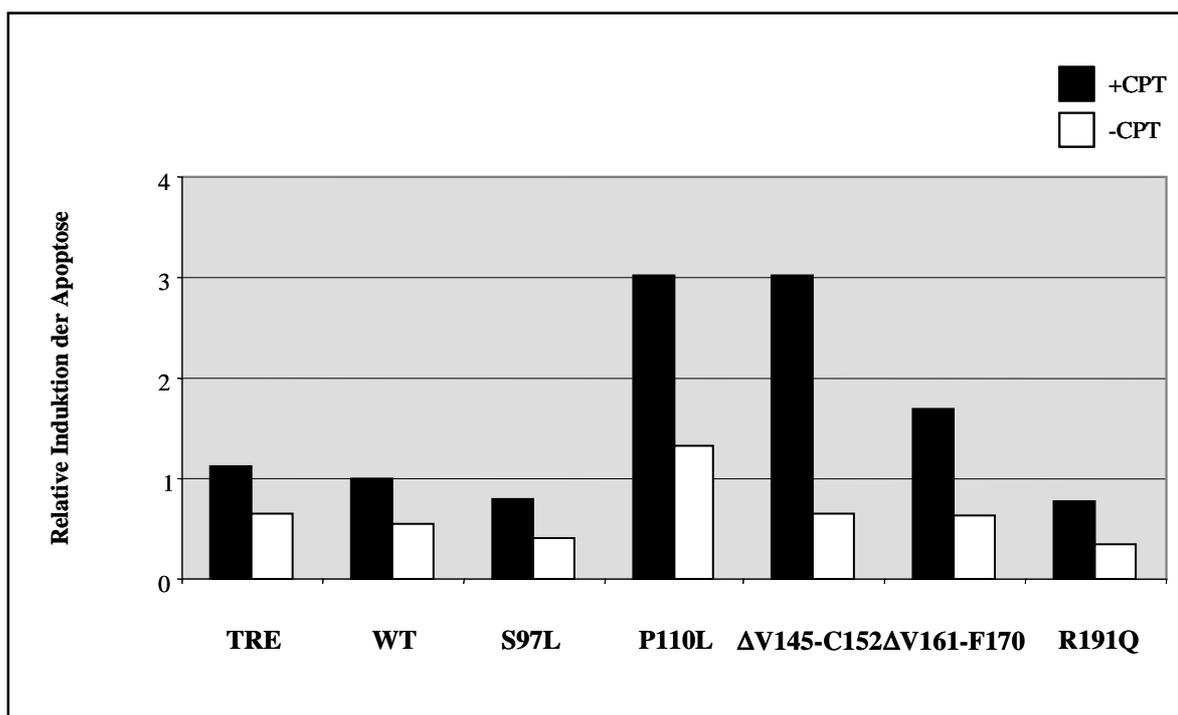


Abb. 19 Analyse der spontanen und CPT-induzierten Apoptose in U937T Zellen. Drei Tage nach Induktion der Elastaseexpression erfolgte die Zugabe von Camptothecin (CPT) zur Auslösung von Apoptose. 25 h später wurde die Apoptoserate anhand von Annexin V-positiven Zellen mittels einer FACS-Messung bestimmt. Die relative Apoptoserate wurde definiert als Ratio der jeweiligen Mutante mit und ohne Apoptoseinduktion zur CPT-induzierten WT-HNE.

Vier Tage nach Promotorinduktion erfolgte die Messung Camptothecin-induzierter Apoptose. WT-HNE-exprimierende Zellen wiesen eine den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen (TRE) vergleichbare Apoptoserate auf (**Abbildung 19**). Die Induktion der Apoptose hatte ebenfalls keine nennenswerte Auswirkung auf die Mutanten S97L und R191Q, die eine der WT-HNE vergleichbare Apoptoserate zeigten. Im Gegensatz dazu resultierte die Apoptoseinduktion bei den Mutanten P110L, ΔV145-C152 und ΔV161-V170 in einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zu Kontrollzellen (Leervektor-, WT-HNE exprimierende Zellen). Gegensätzlich zu den anderen untersuchten Mutanten war zu beobachten, dass die Mutante P110L bereits eine erhöhte spontane Apoptoseinduktion aufwies.

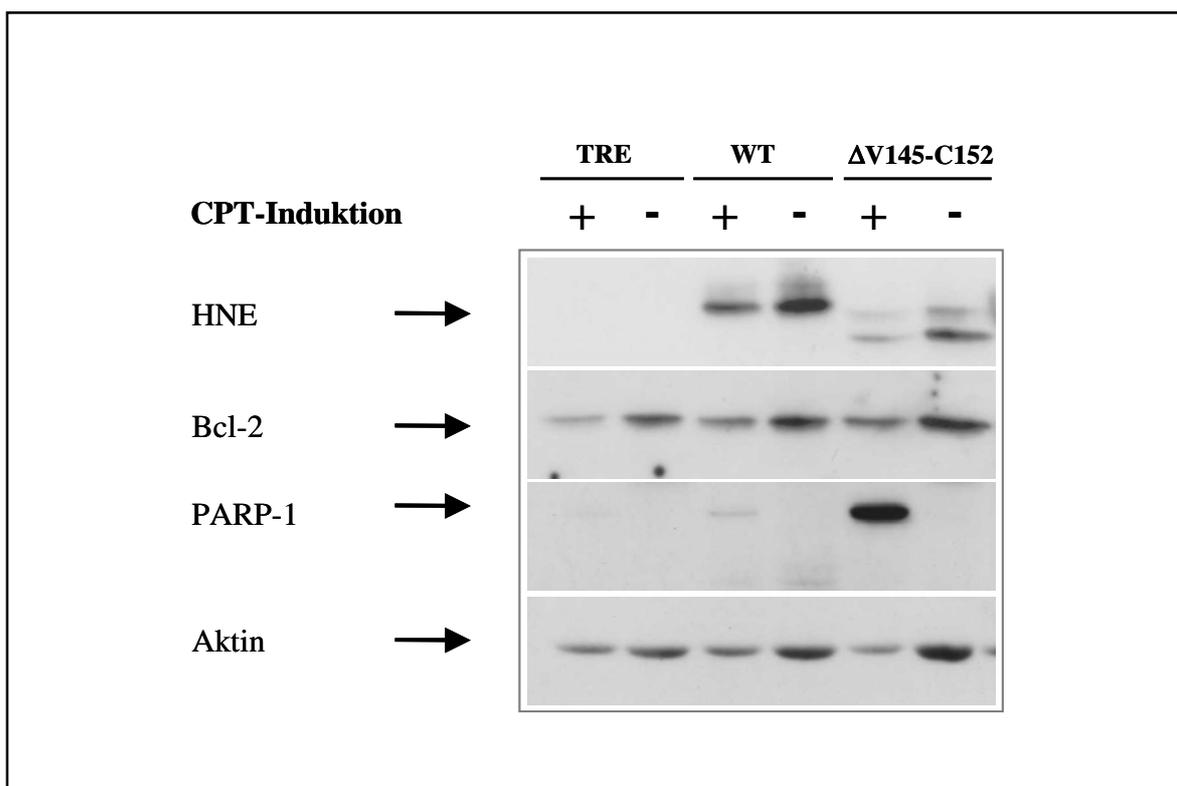


Abb. 20 Analyse der Apoptose in U937T Zellen. Drei Tage nach Induktion der Elastaseexpression erfolgte die Zugabe von Camptothecin (CPT) zur Auslösung von Apoptose. 25 h später wurden die Zellen geerntet. Anschließend folgte die Auftrennung der isolierten Proteine in einer 8 % oder 14 % SDS-PAGE und der immunologische Nachweis der jeweiligen Proteine mittels Western Blot. Als Kontrolle der Lademenge wurde β -Aktin detektiert.

Um die FACS-Analysen zu unterstützen, wurde weiterhin die Expression einiger Proteine nach Apoptoseinduktion untersucht, die als Apoptosemarker bekannt sind. Dazu gehören der anti-apoptotische Faktor Bcl-2 sowie PARP-1. Die Spaltung von PARP-1 in ein 85 kD und 25 kD großes Fragment ist ein typisches Apoptosemerkmal (Lazebnik *et al.*, 1994). Wie die Western Blot Analysen zeigten (**Abbildung 20**), resultierte die Apoptoseinduktion bei Δ V145-C152-exprimierenden U937T Zellen in einer Spaltung des PARP-Proteins. Diese gespaltene Form war bei den Kontrollen nicht zu beobachten und wies darauf hin, dass in diesen Kontrollen keine Induktion der Apoptose nach CPT-Zugabe stattgefunden hat. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Induktion der Apoptose nicht auf einer Suppression der Bcl-2 Expression basierte. Der Abgleich der Bcl-2 mit der Aktin Menge ergab keine verminderte Bcl-2 Expression in apoptotischen Zellen, welche die Mutante Δ V145-C152 exprimieren.

Anhand der erhaltenen Daten konnte festgehalten werden, dass für exemplarisch ausgewählte Mutanten, welche einen Defekt in der Prozessierung der HNE aufwiesen, ebenfalls eine Erhöhung der Apoptose demonstriert werden konnte.

3.2.7 Analyse der Induktion von ER-Stress in HeLa

Die in den FACS- sowie Western Blot Analysen beobachteten erhöhten Apoptosen in Assoziation mit einer Akkumulation von Proteinen im Zytoplasma, warfen die Frage auf, welche Mechanismen hierbei eine Rolle spielen könnten. Ein Mechanismus, der zur Apoptose führen kann, ist ER-Stress. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden WT-HNE-exprimierende HeLa Zellen mit einem bekannten ER-Stress Induktor, Tunicamycin, behandelt. Hierbei verhindert Tunicamycin die N-Glykosylierung der Proteine und löst auf diese Weise ER-Stress aus (Elbein, 1984; Lee, 2001). Die Analyse, welchen Einfluss die Induktion von ER-Stress auf WT-HNE nimmt, erfolgte mittels der konfokalen Lasermikroskopie. Hierfür wurde die Verteilung der WT-HNE mit und ohne Zugabe von Tunicamycin anhand spezifischer Organell-Marker bestimmt.

Abbildung 21 demonstriert eindrücklich die Auswirkung einer Tunicamycin-Behandlung von mit WT-HNE Sequenzen (im pLXIN-Expressionsvektor) transient transfizierten HeLa Zellen. Wie bereits zuvor gezeigt (vgl. Abbildung 15), wiesen WT-HNE-exprimierende Zellen ohne Tunicamycin-Zugabe eine präferentielle Färbung der HNE-Proteine im Bereich der Golgi-Strukturen auf. Durch die Einwirkung von Tunicamycin wurde die Lokalisation der Neutrophilen Elastase signifikant verändert. Anstelle der prominenten Ko-Lokalisation mit dem Golgi-Apparat wurde eine Verteilung der Elastase im gesamten Zytoplasma der Zelle mit partieller Überlagerung mit dem ER-Marker Calnexin sichtbar. Eine solche Akkumulation des Proteins konnte man schon bei der Mutante C122Y beobachten (vgl. Abbildung 15).

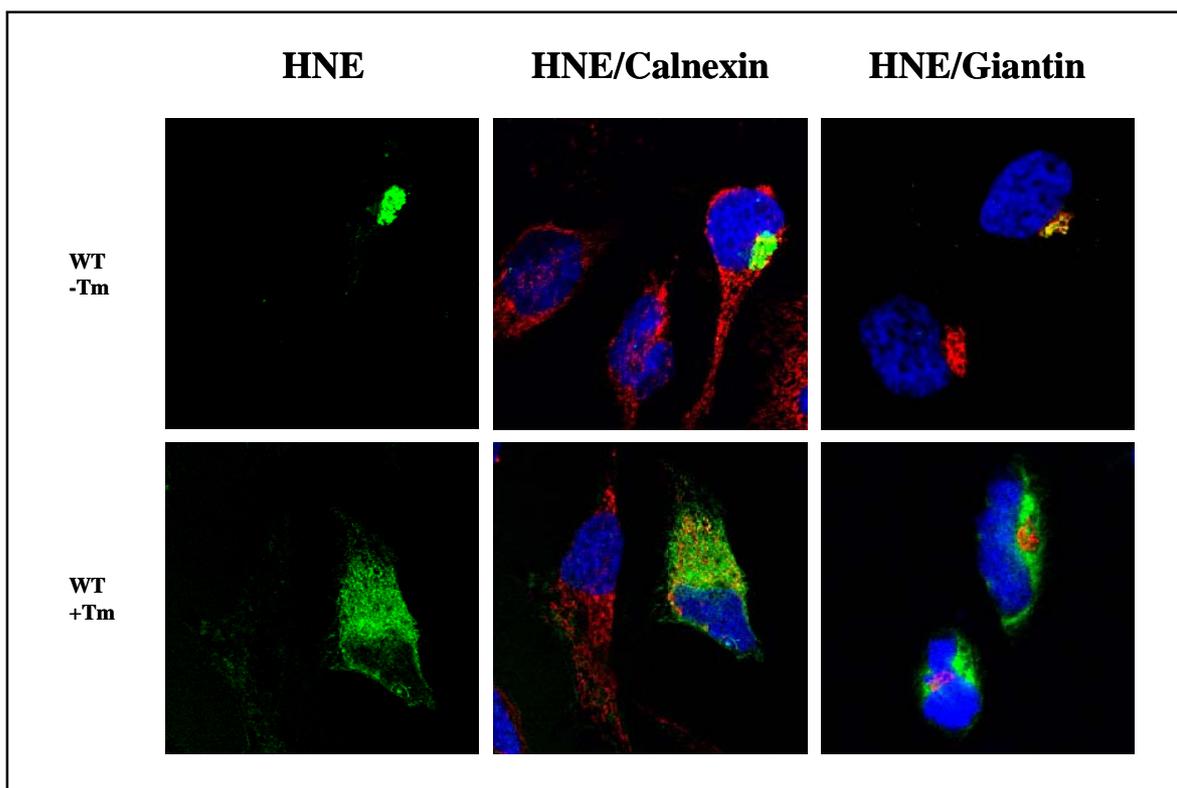


Abb. 21 Analyse der Induktion von ER-Stress bei WT-HNE-exprimierenden HeLa Zellen. Mit WT-HNE transient transfizierte HeLa Zellen wurden für 16 h mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin (Tm) beziehungsweise ohne Zugabe von Tm kultiviert. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellen. Für die Anfärbung der HNE wurde ein α -HNE Antikörper verwendet (detektiert mit Cy2-konjugiertem Sekundärantikörper: grün). Um die einzelnen Organellen in der Zelle sichtbar zu machen, wurden Antikörper gegen Calnexin (ER), Giantin (Golgi) oder Lamp-3 (Lysosomen) eingesetzt (jeweils detektiert mit RRX-konjugiertem Sekundärantikörper: rot). Die Kerne wurden mit TO-PRO-3 gegengefärbt (blau). Gelb zeigt die Ko-Lokalisation der Neutrophilen Elastase mit den Organell-Markern.

3.2.8 Analyse der BiP-Expression in U937T

Um den potentiellen Mechanismus von ER-Stress im U937T Zellmodell besser zu charakterisieren, wurde die BiP-Expression analysiert. Die Induktion von BiP gilt als ein eindeutiges Zeichen einer Antwort der Zelle auf ER-Stress (Hendershot, 2004). Zu diesem Zweck wurden WT- und MT-HNE- exprimierende Zellen mit und ohne CPT-Zugabe kultiviert. Exemplarisch wurden sowohl Mutanten ausgewählt, welche eine hohe Apoptoserate (P110L, $\Delta\text{V145-C152}$) aufwiesen als auch eine Mutante ohne Erhöhung der Apoptose (R191Q). Nachfolgend wurde die BiP-Expression in diesen Zellen mittels der *Real-Time* RT-PCR evaluiert.

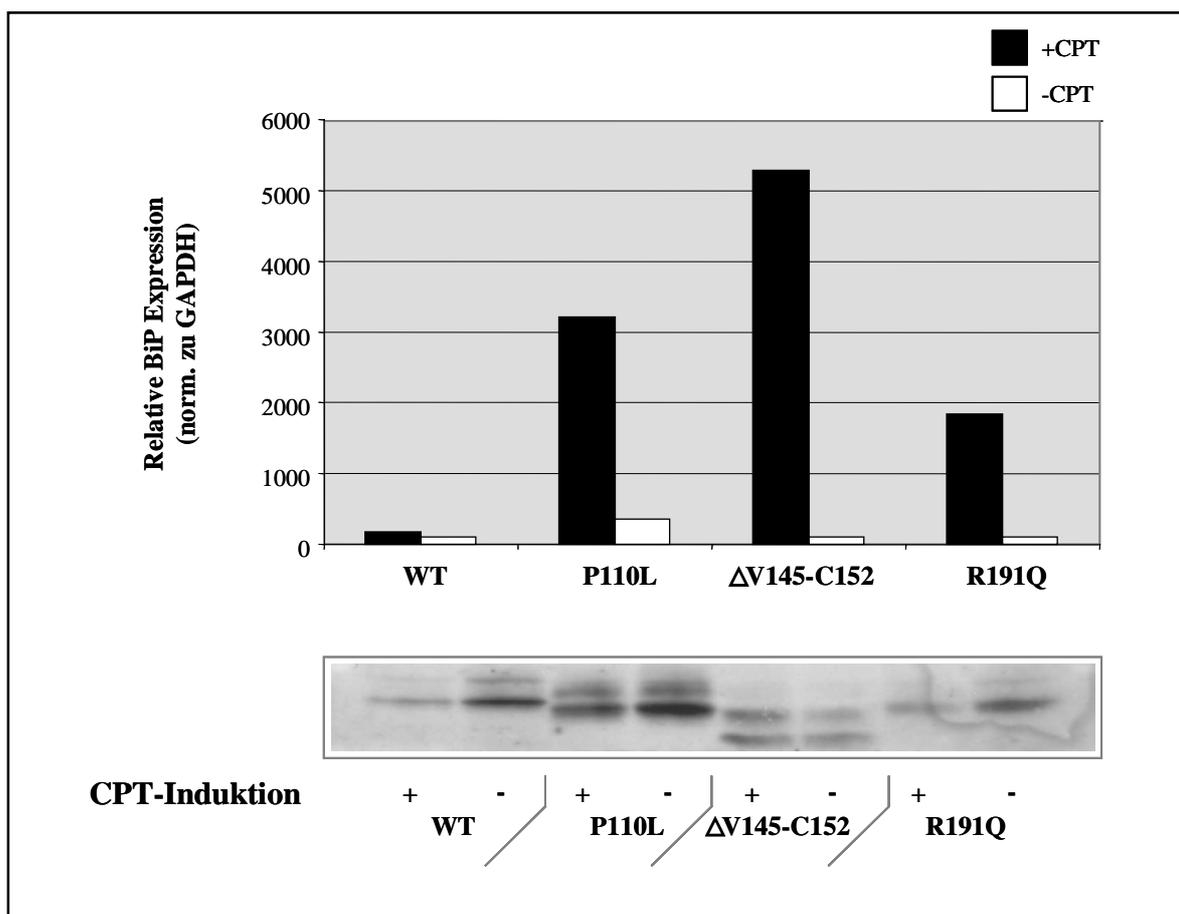


Abb. 22 Analyse der BiP-Expression nach CPT-Zugabe in U937T. Drei Tage nach Induktion der Elastaseexpression erfolgte die Zugabe von Camptothecin (CPT) zur Auslösung von Apoptose. 25 h später wurden die Zellen geerntet, RNA isoliert und die BiP-Expression mittels *Real-Time* RT-PCR analysiert. Parallel wurde der HNE-Induktionsstatus in korrespondierten Zelllysaten mittels Western Blot bestimmt.

Die Analyse der BiP-Expression in WT- und MT-HNE-exprimierenden U937T Zellen erfolgte nach 4-tägiger Promotorinduktion. Wie in **Abbildung 22** gezeigt, wiesen WT-HNE-exprimierende Zellen infolge der CPT-Zugabe keine nennenswerte Induktion von BiP auf. Im Gegensatz dazu demonstrierten die Mutanten P110L und ΔV145-C152 eine signifikante Induktion der BiP-Expression (32- bis 53-fach). Interessanterweise zeigte sich ebenfalls bei der Mutante R191Q eine Erhöhung der BiP-Expression. Diese lag bei einer 18-fachen Induktion verglichen zur WT-HNE. Ferner konnte beobachtet werden, dass ohne CPT-Zugabe keine Induktion der BiP-Expression für WT, ΔV145-C152 und R191Q erfasst werden konnte. Lediglich die Mutante P110L wies eine geringe Erhöhung der BiP-Expression bereits ohne Camptothecin auf. Analoges konnte zuvor bei der Apoptoseinduktion dieser Mutante beobachtet werden.

Zusammenfassend kann formuliert werden, dass die aus dem Zellmodell gewonnenen Daten eine Vielzahl an Veränderungen in Abhängigkeit vom Mutationsstatus der Neutrophilen Elastase aufzeigten. Es konnte beobachtet werden, dass die Mutationen sowohl zu einem Verlust der proteolytischen Funktion als auch der sekretorischen Kapazität führen. Zudem wurde eine Störung des intrazellulären Transportes gefunden, die in einer Ansammlung defekter Proteine in zytoplasmatischen Bereichen der Zelle resultierte. Des weiteren demonstrierten exemplarisch ausgewählte Mutanten sowohl eine Erhöhung der Apoptoserate als auch die Induktion des ER-Chaperones BiP. Es ist zu vermuten, dass die Akkumulation der mutanten Proteine eine wichtige Rolle bei der Auslösung der Apoptose spielt. Die bislang aus dem Zellmodell erhaltenen Daten sind in **Tabelle 8** vergleichend zusammengefasst.

Tab. 8 Zusammenfassung der Veränderungen im U937T Zellmodell

| HNE Sequenz | Glykosylierung | | Fraktionierung | Proteolytische Aktivität | Protein Sekretion | Intrazelluläre Lokalisation (HeLa) | CPT- abhängige Apoptose | BiP Induktion |
|----------------|----------------|---|----------------|-----------------------------|----------------------|--|-------------------------------|------------------|
| | ER | G | | | | | | |
| WT | + | + | P2+P3 | + | + | G | - | - |
| C42R | + | - | P2 | - | - | n.u. | n.u. | n.u. |
| V72M | + | - | P2 | - | - | n.u. | n.u. | n.u. |
| InsPQ94 | + | - | P2 | - | - | n.u. | n.u. | n.u. |
| S97L | + | + | P2+P3 | + | + | n.u. | - | n.u. |
| P110L | + | + | P2+P3 | - | +/- | n.u. | + | + |
| C122Y | + | - | P2 | - | - | Z | n.u. | n.u. |
| ΔV145-C152 | + | - | P2 | - | - | Z | + | + |
| ΔV161-F170 | + | + | P2 | - | +/- | Z | + | n.u. |
| P176R | + | + | P2+P3 | - | - | Z | n.u. | n.u. |
| R191Q | + | + | P2+P3 | + | + | G | - | + |

Das Glykosylierungsmuster der HNE-Proteine wies mannosereiche (ER) und komplexe (Golgi; G) Zuckerketten auf. Die vorherrschende Lokalisation der Proteine wurde nach subzellulärer Fraktionierung sichtbar in P2 (Mitochondrien, Lysosomen, ER) und/oder P3 (Plasmamembran, sekretorische und andere Vesikel, Golgi-Apparat). Des weiteren konnte sowohl eine proteolytische und sekretorische Kapazität als auch die Erhöhung einer CPT-abhängigen Apoptose gemessen werden (+: Induktion nach Transgen-Promotor Induktion; -: keine Induktion nach Transgen-Promotor Induktion; +/-: starke Reduktion der Induktion nach Transgen-Promotorinduktion). Die intrazelluläre Lokalisation der HNE wurde ferner in HeLa Zellen mittels konfokaler Lasermikroskopie beurteilt (G: Golgi; Z: Zytoplasma; n.u.: nicht untersucht).

3.3 Lokalisation der HNE in primären Zellen

3.3.1 Analyse der Lokalisation der HNE mittels differentieller Zentrifugation

Die im U937T Zellsystem erhaltenen Daten belegten eine veränderte intrazelluläre Lokalisation der mutanten Elastase. Fraglich war, ob diese Ergebnisse in primären Granulozyten bestätigt werden können. Hierfür wurde zunächst die Lokalisation der Neutrophilen Elastase in primären Granulozyten erkrankter Patienten mittels differentieller Zentrifugation analysiert.

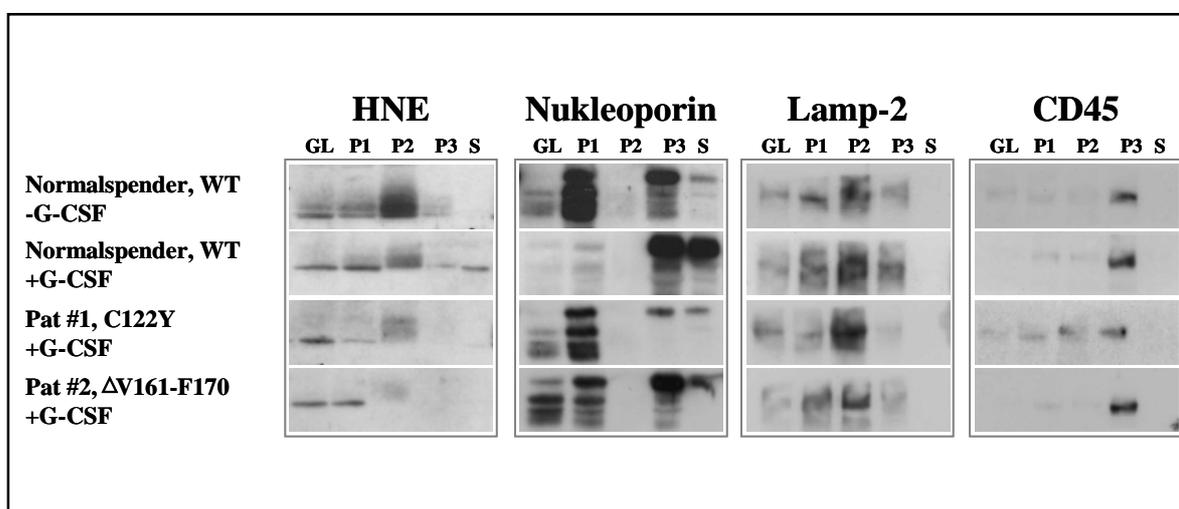


Abb. 23 Analyse der Lokalisation der HNE in primären Granulozyten mittels differentieller Zentrifugation. Zunächst wurden neutrophile Granulozyten über einen Ficoll-Gradienten isoliert. Es folgte die Auftrennung der neutrophilen Granulozyten mittels differentieller Zentrifugation in folgende Fraktionen: P1 (Kerne, Zellfragmente), P2 (Mitochondrien, Lysosomen, Peroxisomen, ER-Membranen), P3 (Membranvesikel, ER, Golgi, sekretorische Vesikel) und S (lösliche zytosolische Proteine). Anschließend folgte die Charakterisierung der gewonnenen Fraktionen anhand spezifischer Organell-Marker. Nukleoporin (62 kD) definierte P1, P2 und S. P2 wurde anhand Lamp-2 (120 kD), einem Lysosomen-spezifischen Protein, identifiziert. Um P3 zu bestätigen, wurde das membranständige CD45-Protein (180-220 kD) verwendet. GL definiert das Gesamtlysate. Da die Patienten täglich mit G-CSF behandelt werden, wurden als Kontrollen Normalspender mit und ohne G-CSF-Applikation mitgeführt.

Abbildung 23 zeigt die Analyse der intrazellulären Verteilung der HNE in primären Granulozyten von Patienten, die an kongenitaler Neutropenie erkrankt sind. Auch in diesem System wurde die Charakterisierung der gewonnenen Fraktionen mit Organell-spezifischen Markern durchgeführt. Im Gegensatz zum U937T System, in welchem Nup153 als Marker für die Kern-Fraktion verwendet wurde, wurde hier diese Fraktion über Nukleoporin identifiziert. Nukleoporin (62 kD) ist sowohl ein nukleäres als auch zytoplasmatisch vorkommendes Porenkomplex-Protein (Emig *et al.*, 1995; Ewald *et al.*,

1996). P2 wurde anhand Lamp-2 (120 kD), einem Lysosomen-spezifischen Protein, charakterisiert. Um P3 zu bestätigen, wurde das membranständige CD45-Protein (180-220 kD) verwendet (Schwinzer *et al.*, 1992). Wie aus **Abbildung 23** ersichtlich, war die Verteilung der Organell-spezifischen Marker sowohl für die Gesundspender als auch die Patienten vergleichbar. Gleichzeitig konnte die Reinheit der gewonnenen Fraktionen bestätigt werden.

Bei dem Normalspender ohne G-CSF-Applikation wurde die Elastase hauptsächlich in Fraktion P2 (azurophile Granula, ER) detektiert. Geringere Mengen befanden sich in Fraktion P1 (Kerne) und P3 (Membranen, Golgi). Eine vergleichbare Verteilung des Proteins zeigte sich bei dem Normalspender unter G-CSF-Behandlung. Dementsprechend ließ sich die Schlussfolgerung ziehen, dass G-CSF keinen Einfluss auf die Lokalisation der Neutrophilen Elastase nimmt. Im Gegensatz zu den Normal Spendern wiesen beide untersuchten SCN-Patienten ein verändertes Bild auf. Das mutante Protein konnte nur in signifikant reduzierten Mengen in der P3 Fraktion nachgewiesen werden. Zusätzlich war in der P2 Fraktion eine schwächere Bande höheren Molekulargewichts sichtbar, die vielleicht mit unprozessierten Formen der Elastase korrespondieren könnte. Ein ähnliches Verteilungsmuster der mutanten Elastase wurde auch bei anderen untersuchten Patienten mit zyklischer oder kongenitaler Neutropenie, die verschiedene *ELA2*-Mutationen tragen, gefunden (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Analyse der Lokalisation der HNE mittels konfokaler Lasermikroskopie

Vergleichbar mit dem U937T Zellmodell wiesen auch die biochemischen Analysen der Verteilung der Neutrophilen Elastase bei Patienten auf eine veränderte Lokalisation des Proteins hin. Zur Validierung und Präzisierung der erhaltenen Ergebnisse wurde die intrazelluläre Lokalisation der Neutrophilen Elastase in primären Granulozyten zusätzlich mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht.

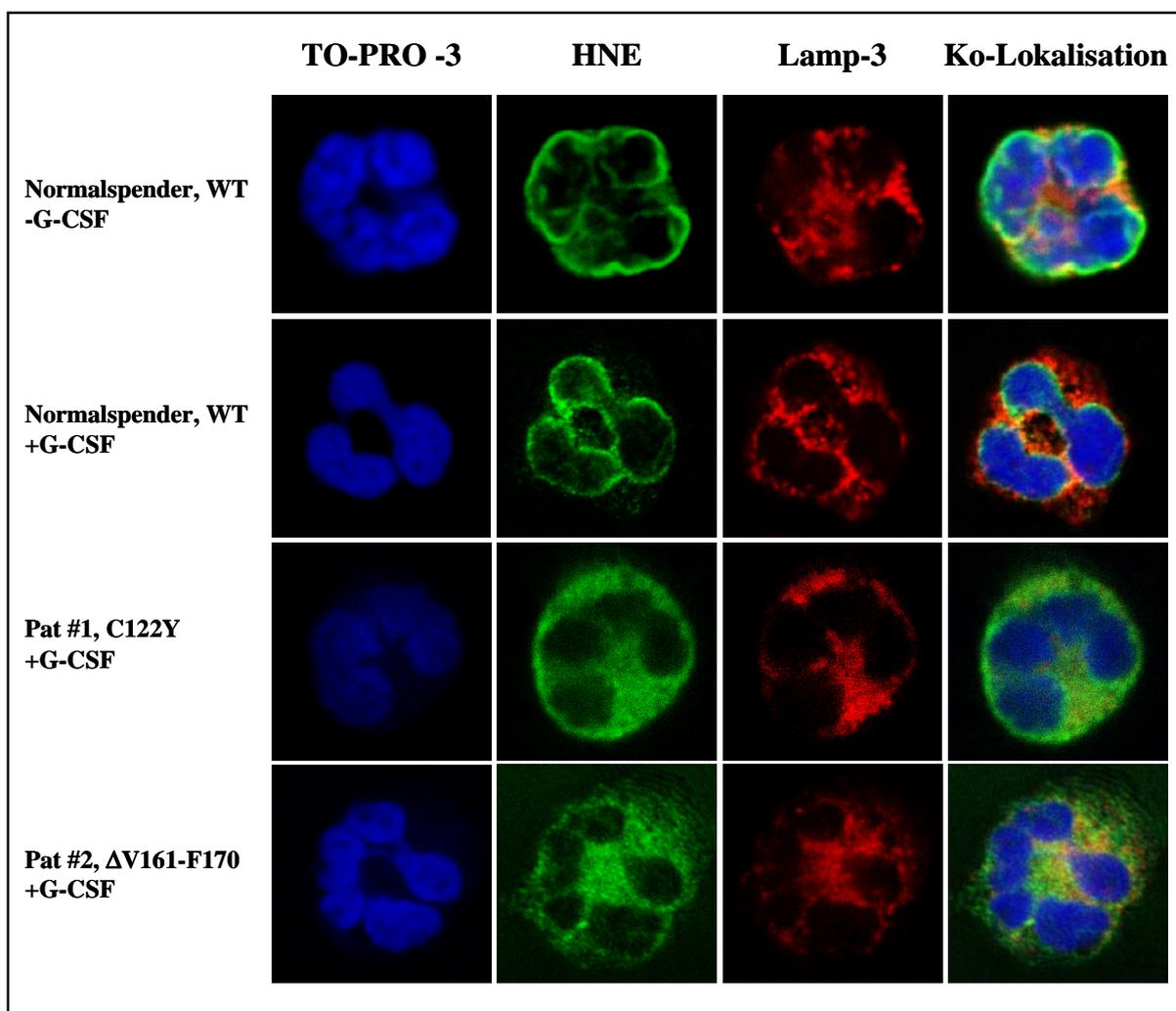


Abb. 24 Analyse der Lokalisation der HNE in primären Granulozyten mittels konfokaler Mikroskopie. Zunächst wurden neutrophile Granulozyten über einen Ficoll-Gradienten isoliert. Nach Adhäsion der neutrophilen Granulozyten an Objektträger folgte eine Immunfluoreszenzfärbung. Für die Anfärbung der HNE wurde ein α -HNE Antikörper verwendet (detektiert mit Cy2-konjugiertem Sekundärantikörper: grün). Um Lamp-3 zu detektieren, wurde ein Antikörper gegen Lamp-3 eingesetzt (detektiert mit RRX-konjugiertem Sekundärantikörper: rot). Die Kerne der Zellen wurden mit TO-PRO-3 (blau) gegengefärbt. In gelb wird die Ko-Lokalisation der Proteine dargestellt. Da die Patienten täglich mit G-CSF behandelt werden, wurden als Kontrollen Normalspender mit und ohne G-CSF-Behandlung mitgeführt.

Abbildung 24 zeigt die subzelluläre Verteilung der Neutrophilen Elastase in primären Granulozyten von Normalspendern und Patienten mit kongenitaler Neutropenie. Die intrazelluläre Verteilung der Neutrophilen Elastase wurde in reifen, segmentierten neutrophilen Granulozyten beurteilt. Dieses Reifungsstadium war anhand des geteilten Zellkernes sichtbar. Zunächst zeigte die Analyse des Granulamarkers Lamp-3 für alle untersuchten Proben ein etwa vergleichbares Muster, welches gut mit der Verteilung der azurophilen Granula vereinbar ist. In Granulozyten von gesunden Kontrollen ohne G-CSF-Behandlung war die HNE insbesondere perinukleär sichtbar. Nur ein kleiner Anteil des Proteins wurde im Zytoplasma detektiert, der dann mit Lamp-3 ko-lokalisierte. Analog zur subzellulären Fraktionierung demonstrierten die Normalspender unter G-CSF-Behandlung eine vergleichbare Verteilung der Neutrophilen Elastase. Die Granulozyten der beiden SCN-Patienten wiesen keine (Pat #1: C122Y) beziehungsweise nur eine partielle (Pat #2: Δ V161-F170) perinukleäre Anfärbung auf. Anstelle dessen wurde die mutante Neutrophile Elastase größtenteils in einer diffusen zytoplasmatischen Verteilung detektiert. Nur ein sehr geringer Teil dieser zytoplasmatisch akkumulierten, mutanten Proteine zeigte eine Ko-Lokalisation mit dem Marker Lamp-3.

Auch in primären Zellen konnte eine Akkumulation der mutanten Proteine anstelle eines intrazellulären Transportes zu den azurophilen Granula demonstriert werden. Somit können diese Analysen die zuvor im U937T Zellmodell gewonnenen Erkenntnisse bestätigen und ergänzen.

3.4 Topologie der Humanen Neutrophilen Elastase

3.4.1 Analyse der Lokalisation der HNE in U937T mittels FACS

Owen und Kollegen konnten zeigen, dass die Wildtyp-Neutrophile Elastase nach einem Stimulus an der Plasmamembran von primären Granulozyten exprimiert wird (Owen *et al.*, 1995). Auch Benson und Kollegen postulieren ein Modell, welches eine Plasmamembran-Lokalisation der Neutrophilen Elastase, verursacht aufgrund der Mutation, favorisiert (Benson *et al.*, 2003). Sie gehen jedoch von einer transmembranen Verankerung der Proteine aus. Um zu erörtern, ob die HNE an der Plasmamembran der U937T Zellen nachgewiesen werden kann, wurden zunächst Analysen mittels FACS durchgeführt.

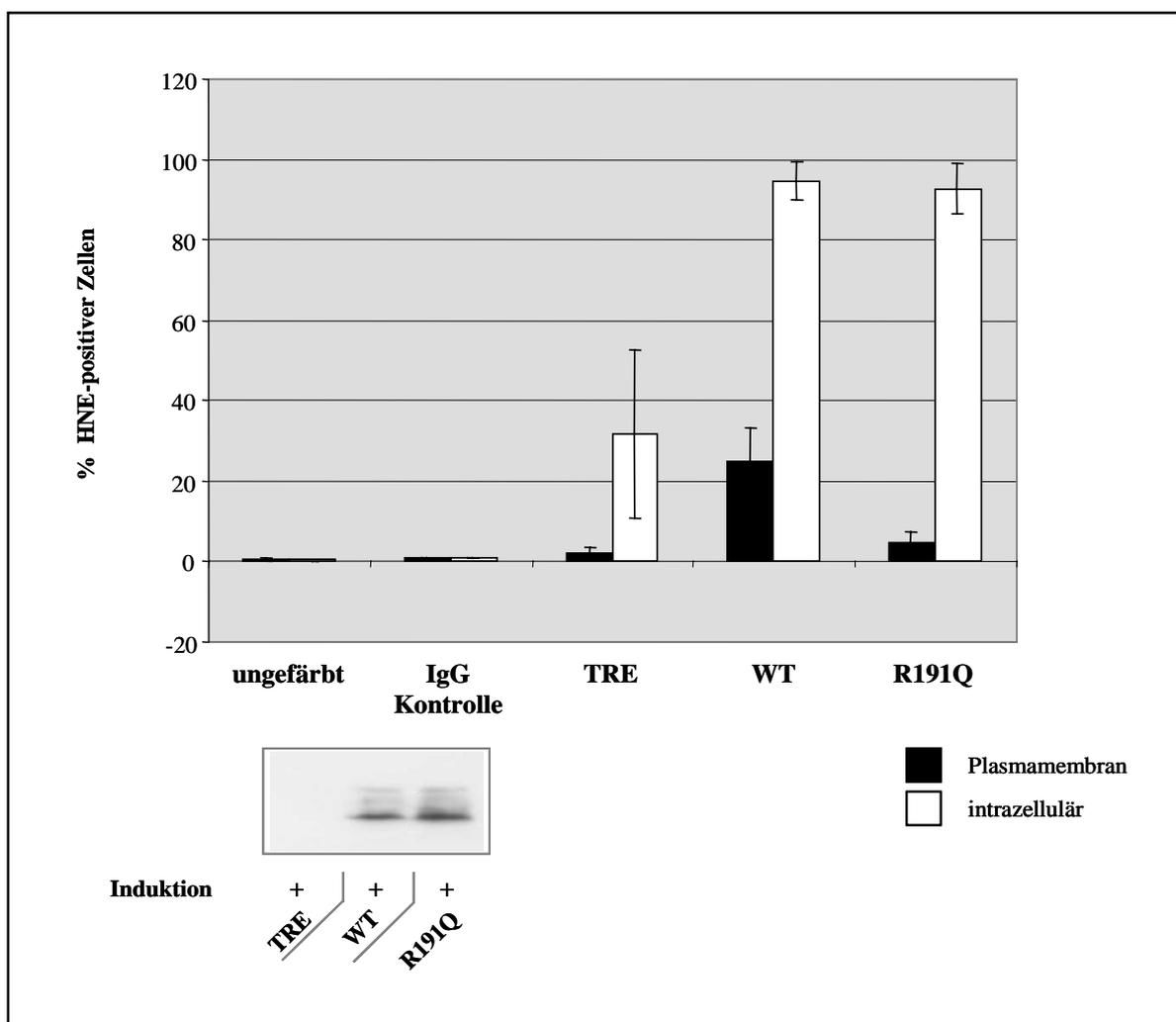


Abb. 25 Analyse des Vorkommens der HNE an der Oberfläche in U937T. Vier Tage nach Promotorinduktion wurden die Zellen mit einem HNE-spezifischen Antikörper mit und ohne Permeabilisierung der Zellen inkubiert und anschließend im FACS auf die Expression der HNE analysiert.

Die Analyse der Expression der Neutrophilen Elastase an der Plasmamembran von U937T Zellen erfolgte nach 4-tägiger Promotorinduktion von WT- und R191Q-HNE-exprimierenden Zellen. Bei der Auswertung der FACS-Analysen wurden die Messrahmen demgemäß gesetzt, dass die IgG1-Werte, die als Basiswerte fungierten, 1 % Elastase-positiver Zellen entsprachen.

Als Kontrolle der Spezifität des Primärantikörpers wurden WT-HNE-U937T Zellen mit IgG1 gefärbt (**Abbildung 25**). Zusätzlich wurden ungefärbte WT-HNE-exprimierende Zellen sowie Zellen, die den Leervektor pRevTRE exprimierten, mitgeführt. Ferner wurden als Kontrolle des HNE-Induktionsstatus Western Blot Analysen durchgeführt. Diese wiesen eine etwa vergleichbare Induktion der Elastase für WT- und R191Q auf, während keine Elastase im Leervektor detektiert werden konnte. Für den durchflusszytometrischen Nachweis der intrazellulären Elastase wurden die Zellen zunächst permeabilisiert. Um das Vorkommen des Proteins an der Plasmamembran zu überprüfen, wurde auf die Permeabilisierung der Zellen verzichtet. In den FACS-Analysen zeigte sich ein etwa übereinstimmender Nachweis der intrazellulären Neutrophilen Elastase für die WT-HNE und die Mutante R191Q. Bei dem Leervektor pRevTRE war eine deutlich niedrigere Menge an endogener HNE messbar. Es konnten etwa 20 % HNE-positiver Zellen detektiert werden, die an der Plasmamembran die Wildtyp-Elastase exprimierten. Die Analyse der Mutante R191Q ergab circa 7 % Zellen, die eine Elastaseexpression an der Plasmamembran aufwiesen. Eine der Mutante R191Q vergleichbare Expression wurde für die mutanten Formen S97L und Δ V145-C152 verzeichnet (Daten nicht gezeigt).

Die erhaltenen Resultate ließen darauf schließen, dass sowohl für die WT-HNE als auch für die untersuchten HNE-Mutationen ein Teil der exprimierten Elastase an der Plasmamembran der U937T Zellen zu finden ist. Für alle Mutanten war der Anteil jedoch im Vergleich zu WT-HNE-exprimierenden Zellen leicht reduziert.

3.4.2 Analyse der Topologie der HNE in U937T mittels Proteinase K-Behandlung

Bei der bioanalytischen Analyse der Proteinstruktur von Neutrophiler Elastase wurden zwei potentielle Transmembrandomänen gefunden (Benson *et al.*, 2003). Um zu überprüfen, ob die Neutrophile Elastase eine transmembrane Konformation annehmen kann, wurde eine Behandlung der HNE mit Proteinase K durchgeführt. Proteinase K ist ein Enzym, das sowohl endo- wie auch exoproteolytische Aktivität aufweist. Mit Hilfe dieses Enzym ist es feststellbar, ob das zu analysierende Protein innerhalb eines Vesikels oder an dessen Oberfläche lokalisiert ist. Falls ein Protein über eine Transmembrandomäne in der Membran verankert ist, wird der zytosolische Part des Proteins für die Proteinase K erreichbar und wird abgespalten. Dies wird aufgrund eines geringeren Molekulargewichtes durch eine Bandenverschiebung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im Acrylamidgel erkennbar. Bei der Verwendung eines Antikörpers zum immunologischen Nachweis der HNE, welcher den C-Terminus des Proteins erkennt, wäre zudem ein Verschwinden der HNE-Bande zu erwarten. Ein sekretorisches Protein hingegen, das im Vesikellumen vorliegt, bleibt gegen einen Proteinase K-Verdau resistent und kann erst nach Permeabilisierung der Membranen durch Triton X-100 proteolytisch gespalten werden.

Vier Tage nach Promotorinduktion wurden WT-HNE und die Mutante R191Q mittels differentieller Zentrifugation in subzelluläre Fraktionen aufgetrennt. Die gewonnene 100 000 x g -Fraktion wurde anschließend mit oder ohne Proteinase K inkubiert. Zusätzlich erfolgte eine Inkubation der Fraktion mit Proteinase K und Triton X-100. Hierbei schloss Triton X-100 die Membranen der Vesikel auf, infolgedessen die Proteine auch innerhalb des Vesikellumens für die Proteinase K zugänglich wurden. Die Analyse des Proteinase K-Spaltungsmusters für HNE und Calnexin erfolgte mittels Western Blot (**Abbildung 26**). Nach der Behandlung mit Proteinase K zeigte die WT-HNE ein geringfügig niedrigeres Molekulargewicht als die unbehandelte Kontrolle. Das HNE-Protein war jedoch weiterhin nachweisbar. Durch die zusätzliche Zugabe von Triton X-100 wurde das gesamte Protein verdaut und konnte nahezu nicht mehr detektiert werden. Es konnte beobachtet werden, dass bei Proben, welche mit Proteinase K behandelt wurden, ein Schatten detektierbar wurde. Dieser sichtbare Schatten entsprach dem Molekulargewicht von Proteinase K, die eine Größe von circa 30 kD aufweist.

Dementsprechend könnte die Ursache für das niedrigere Molekulargewicht der HNE auf eine Änderung des Laufverhaltens zurückzuführen sein, die aufgrund der Zugabe von Proteinase K bedingt war. Ein zur WT-HNE vergleichbares Spaltungsmuster der Neutrophilen Elastase ergab sich bei der Mutante R191Q. Als Kontrolle wurde das transmembrane Protein Calnexin, das einen zytosolischen Teil besitzt, nachgewiesen. Hier zeigte sich nach Behandlung mit Proteinase K wie erwartet ein deutlich niedrigeres Molekulargewicht im Vergleich zur unbehandelten Probe.

Die Ergebnisse der FACS-Untersuchung ließen Rückschlüsse auf ein Vorkommen der Wildtyp-Elastase an der Oberfläche der U937T Zellen ziehen, aber nicht, welche Konformation das Protein aufwies. Die Resultate der Untersuchung mit Proteinase K zeigten, dass es sich bei der Neutrophilen Elastase nicht um ein Transmembranprotein handelt.

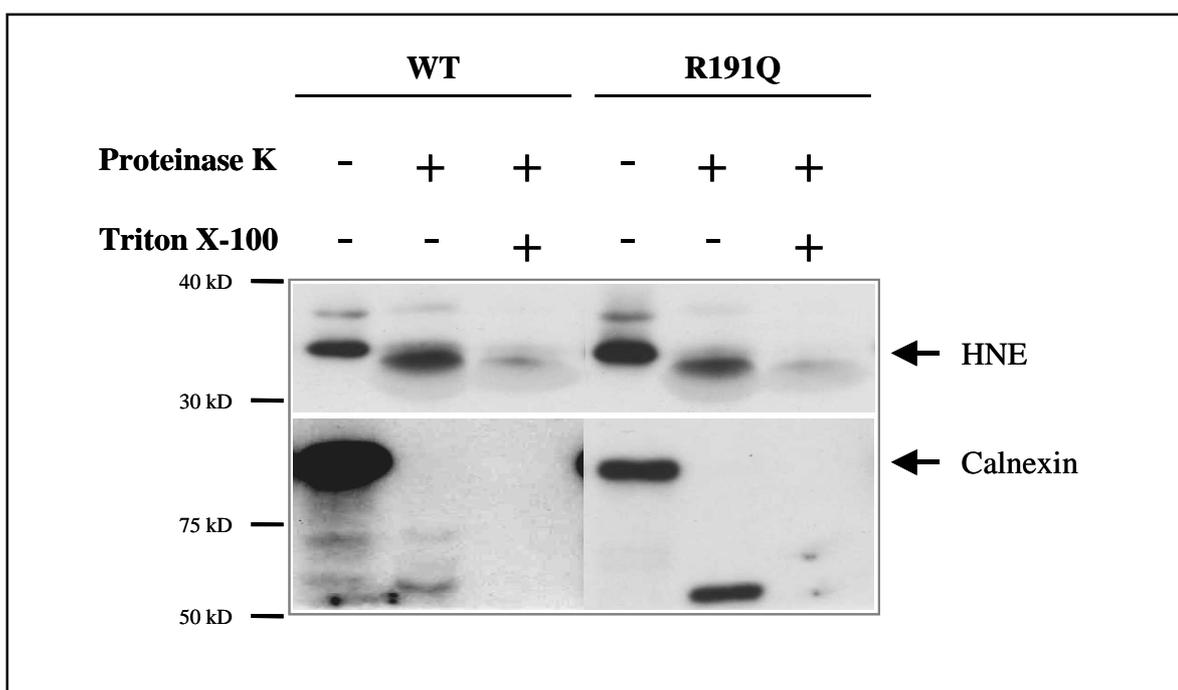


Abb. 26 Analyse der Topologie der HNE mittels Proteinase K-Behandlung. Vier Tage nach Promotorinduktion wurden WT- und R191Q-HNE exprimierende U937T Zellen mittels differentieller Zentrifugation aufgetrennt. Die Plasmamembran-enthaltende Fraktion P3 (100 000 x g) wurde dreigeteilt und mit oder ohne Zugabe von Proteinase K und Triton X-100 inkubiert. Anschließend folgte die Auftrennung der isolierten Proteine in einer 8 oder 12 % SDS-PAGE und der immunologische Nachweis der Neutrophilen Elastase und Calnexin mittels Western Blot.

3.4.3 Analyse der sezernierten Form der HNE in U937T

Die sezernierte Form der Humanen Neutrophilen Elastase stellt vermutlich, wie zuvor beschrieben wurde, eine der intrazellulären HNE vergleichbare Form dar, welche keine zusätzliche Prozessierung der N- und C-Termini erfährt (Gullberg *et al.*, 1995). Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Größe der sezernierten Elastase im Zellkulturmedium im Vergleich zur endogenen Elastase der induzierten U937T Zellen mittels Western Blot analysiert.

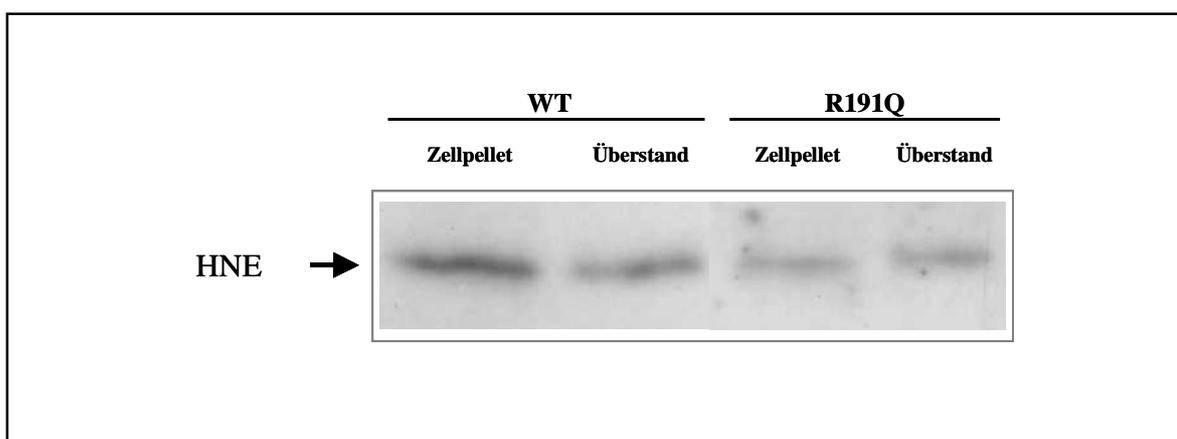


Abb. 27 Analyse der sezernierten Form der Humanen Neutrophilen Elastase. Vier Tage nach Promotorinduktion wurden Zellkulturüberstände von WT- und R191Q-HNE exprimierenden U937T Zellen mittels einer 100 000 x g-Zentrifugation fraktioniert. Um nachfolgend die Proteine des Überstandes anzureichern, wurde eine Aceton-Fällung durchgeführt. Anschließend folgte die Auftrennung der Proteine in einer 14 % SDS-PAGE und der immunologische Nachweis der Neutrophilen Elastase mittels Western Blot.

Vier Tage nach Promotorinduktion wurden die sezernierten Formen der Neutrophilen Elastase von WT- und R191Q-HNE-exprimierenden Zellen hinsichtlich ihrer Molekulargewichte untersucht. Um kontaminierende Membranbestandteile aus den Zellkulturüberständen zu entfernen, wurden diese zunächst einer 100 000 x g Zentrifugation unterzogen. Anschließend folgte die Fällung der Proteine mittels Aceton. Des Weiteren wurden Proteinlysate aus Zellpellets erstellt, um die Größe der endogenen HNE vergleichend darzustellen. Für die immunologische Analyse wurde ein Antikörper gegen die Neutrophile Elastase verwendet, welcher die Bindungsstelle am N-Terminus des Proteins aufweist. Wie aus **Abbildung 27** ersichtlich, besitzen sowohl die endogene als auch die sezernierte Form der Neutrophilen Elastase, unabhängig vom Mutationsstatus, das gleiche Molekulargewicht.

3.4.4 Analyse der Interaktion zwischen AP3 und der HNE

AP3 ist ein Protein, das für den Transport von Transmembranproteinen vom trans-Golgi zu den Lysosomen zuständig ist (Simpson *et al.*, 1997). Benson und Kollegen schlagen vor, dass auch die Neutrophile Elastase als ein potentielles Transmembranprotein über einen AP3-Transport in die Granula dirigiert wird (Benson *et al.*, 2003). Um diese Theorie zu überprüfen, wurden Ko-Immunpräzitationen der Neutrophilen Elastase mit dem AP3-Protein durchgeführt.

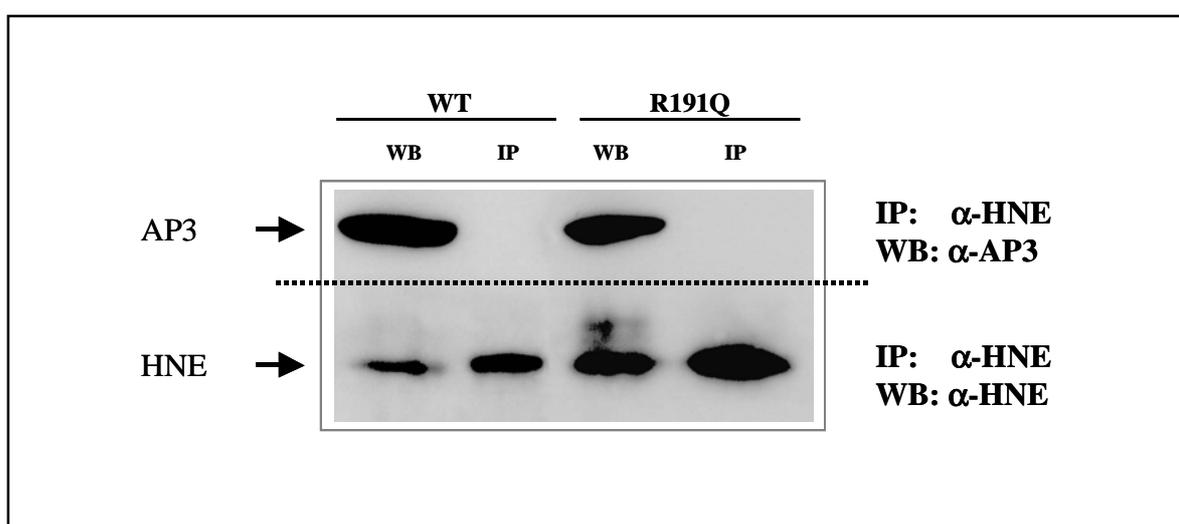


Abb. 28 Analyse der Interaktion der HNE mit AP3. Vier Tage nach Promotorinduktion wurden WT-HNE- und R191Q-exprimierende U937T Zellen geerntet und mit einem α -HNE Antikörper immunpräzipitiert. Parallel erfolgte die Ernte von Gesamtzelllysaten. Anschließend folgte die Auftrennung der Proteine in einer 10 % SDS-PAGE und der immunologische Nachweis der Neutrophilen Elastase und AP3 mittels Western Blot.

Vier Tage nach Promotorinduktion von WT- und R191Q-HNE erfolgte eine Immunpräzitation der Neutrophilen Elastase mit einem gegen das gesamte Protein gerichteten Antikörper. Parallel zur Immunpräzitation wurden als Kontrollen Gesamtzelllysate von WT-HNE- und R191Q-exprimierenden U937T Zellen mitgeführt (**Abbildung 28**). Anschließend erfolgte die Analyse des Bandenmusters von HNE und AP3 mittels Western Blot. Es konnten deutliche Signale sowohl für die Neutrophile Elastase als auch für das AP3-Protein in den Gesamtlysaten verzeichnet werden, welche für die Funktionsfähigkeit der Antikörper sprachen. Weiterhin wurde deutlich, dass bei der Ko-Immunpräzitation große Mengen an Elastase detektiert werden konnten, jedoch

keinerlei AP3-Protein nachweisbar war. Folglich konnte weder für die WT-HNE noch für die Mutante R191Q eine aktive Interaktion mit AP3 festgestellt werden.

3.4.5 Lokalisation der HNE nach Mutation des Tyrosin-basierenden Signals

Um eine eindeutigere Aussage treffen zu können, ob die Neutrophile Elastase über das putative AP3 Erkennungssignal zu den Granula transportiert werden kann, wurde dieses Tyrosin-basierende Signal in der Sequenz der Elastase mutiert (Y199F, Y199Stop). Die subzelluläre Lokalisation der Neutrophile Elastase wurde nach transients Transfektion von HeLa Zellen mit MT-HNE-Sequenzen (im Rc/RSV-Expressionsvektor) mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen analysiert.

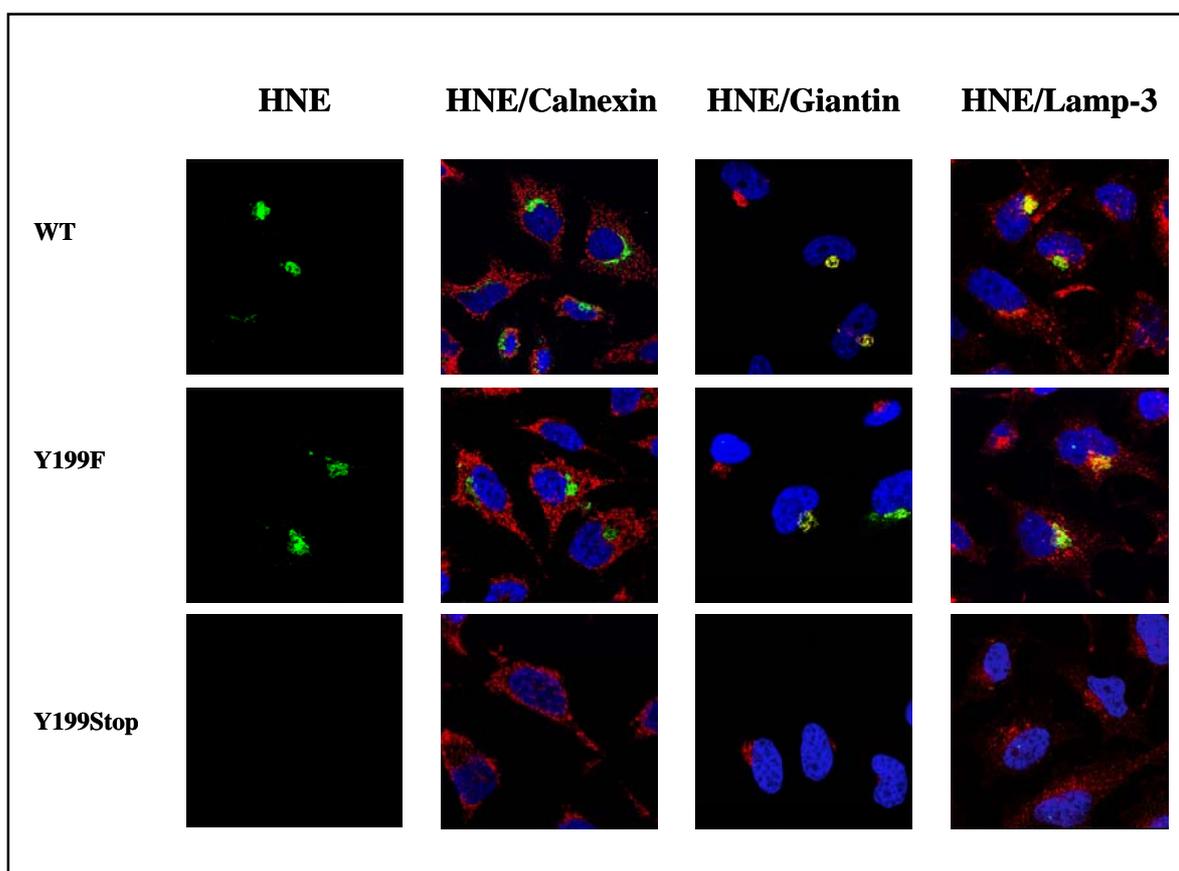


Abb. 29 Analyse der subzellulären Lokalisation der HNE nach Mutation des Tyrosin-basierenden Signals in transient transfizierten HeLa Zellen mittels konfokaler Mikroskopie. Zwei Tage nach transienter Transfektion der HeLa Zellen erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellen. Für die Anfärbung der HNE wurde ein α -HNE Antikörper verwendet (detektiert mit Cy2-konjugiertem Sekundärantikörper: grün). Um die einzelnen Organellen in der Zelle sichtbar zu machen, wurden Antikörper gegen Calnexin (ER), Giantin (Golgi) oder Lamp-3 (Lysosomen;) eingesetzt (jeweils detektiert mit RRX-konjugiertem Sekundärantikörper: rot). Die Kerne wurden mit TO-PRO-3 gegengefärbt (blau). Gelb zeigt die Ko-Lokalisation der Neutrophilen Elastase mit den Organell-Markern.

Für die immunfluoreszenzmikroskopische Analyse wurde ein Antikörper gegen die Neutrophile Elastase verwendet, welcher die Bindungsstelle am N-Terminus des Proteins aufweist. Wie in **Abbildung 29** gezeigt, demonstrierte die Mutante Y199F eine signifikante Ko-Lokalisation mit dem Golgi-Marker Giantin. Sie zeigte folglich eine der Wildtyp-Elastase vergleichbare subzelluläre Verteilung innerhalb der Zelle. Die Mutante Y199Stop hingegen war nicht in der Zelle detektierbar. Analysen mit einem C-terminalen HNE-Antikörper wiesen ein vergleichbares Bild auf (Daten nicht gezeigt). Zur Kontrolle wurden Gesamtzelllysate mittels Western Blot hinsichtlich der HNE-Expression analysiert (**Abbildung 30**). Der immunologische Nachweis (N-terminaler Antikörper) bestätigte sowohl die Expression von WT-HNE und der Mutante Y199F als auch das Fehlen der Y199Stop-Mutante. Für diese Beobachtung könnte eine starke Instabilität des mutanten Proteins verantwortlich sein.

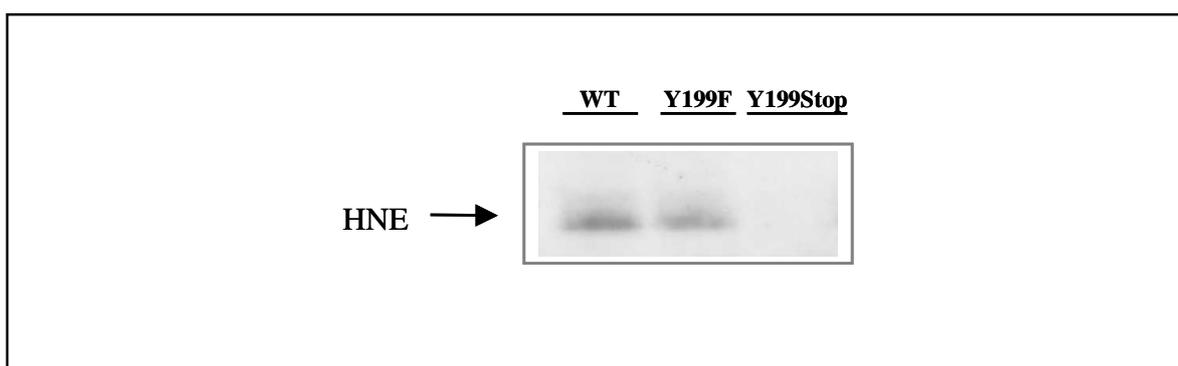


Abb. 30 Analyse der Expression von HNE in Rc/RSV-Expressionsvektor in transient transfizierten HeLa Zellen. Zwei Tage nach transienter Transfektion wurden WT- und MT-HNE-exprimierende HeLa Zellen geerntet und Gesamtproteinlysate erstellt. Anschließend folgte die Auftrennung der isolierten Proteine in einer 12 % SDS-PAGE und der immunologische Nachweis der Neutrophilen Elastase mittels Western Blot.

4. Diskussion

Chronische Neutropenien sind seltene entweder sporadische oder vererbare Erkrankungen der Myelopoese. Dazu gehört die schwere kongenitale Neutropenie, die durch einen Ausreifungsstopp der myeloischen Vorläuferzellen im Stadium der Promyelozyten/Myelozyten und einem erhöhten Leukämierisiko charakterisiert ist. Auch die zyklische Neutropenie stellt eine Form der chronischen Neutropenien dar. Ein Merkmal dieser Form ist eine zyklische Schwankung der Zahl neutrophiler Granulozyten in einem annähernd dreiwöchigen Rhythmus. Diese hämatologischen Funktionsstörungen führen beim Patienten zu zahlreichen, sehr schweren, häufig lebensbedrohlichen Infektionen.

Da sowohl Patienten mit zyklischer als auch kongenitaler Neutropenie heterozygote Mutationen im Gen der Neutrophilen Elastase aufweisen, kann vermutet werden, dass diese Mutationen wahrscheinlich die Hauptursache dieser Erkrankungen darstellen. Obwohl inzwischen mehr als 40 unterschiedliche Mutationen der Neutrophilen Elastase identifiziert worden sind, blieben die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen ungeklärt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Auswirkungen der *ELA2*-Mutationen in Hinblick auf Lokalisation und Funktionsfähigkeit der mutanten Proteine zu charakterisieren. Als Werkzeug für die Analysen wurde ein humanes induzierbares Zellmodell mit spezifischen Mutationen im *ELA2*-Gen, die typischerweise bei Patienten mit Neutropenien gefunden werden, etabliert. Zusätzlich konnte der Einfluss der Mutationen in primären Granulozyten von erkrankten Patienten analysiert und beurteilt werden.

4.1 Generierung des Tetrazyklin-abhängigen Genexpressionsystems

Um eine breitgefächerte Analyse der Auswirkungen der *ELA2*-Mutationen durchführen zu können, wurde ein humanes Zellmodell entwickelt. Die Zelllinie U937 wurde ausgewählt, weil sie eine humane Zelllinie darstellt, welche zudem der myeloischen Linie angehört. Weiterhin war es wichtig, eine Zelllinie zu verwenden, die nur eine geringfügige Menge an endogener Elastase aufweist. Auch dies traf auf die U937 Zelllinie zu.

Ein Nachteil der U937 Zelllinie besteht in der Differenzierungsrichtung. In der Literatur wird die myelomonoblastische U937 Zelllinie als eine in Monozyten/Makrophagen ausdifferenzierende Zelle beschrieben (Zimmer *et al.*, 1992). Die Differenzierung der U937 in Granulozyten ist nur sehr marginal dargestellt (Nakajima *et al.*, 1996). Da jedoch Untersuchungen in Hinblick auf die Differenzierungskapazität der Zellen in Abhängigkeit vom Mutationsstatus nicht im Vordergrund standen, wurde die U937 Zelllinie für das zu generierende Zellmodell gewählt.

Als nächstes mussten Kriterien hinsichtlich der Auswahl der Mutationen im *ELA2*-Gen festgesetzt werden. Das Elastase-Protein weist strukturelle Bereiche auf, die für Transport, Prozessierung und Funktion von Wichtigkeit sein könnten. Aus diesem Grund wurden Mutationen ausgewählt, welche die Glykosylierungs-Erkennungsstellen (InsPQ94, S97L und Δ V145-C152) oder das aktive Zentrum (C42R und P176R) betreffen. Des weiteren wurden Mutationen generiert, die sowohl mit der zyklischen als auch mit der kongenitalen Neutropenie assoziiert gefunden wurden (S97L, P110L, Δ V161-F170 und R191Q). Als weiteres Kriterium diente die Feststellung, dass einige Mutationen besonders häufig in dem Patientenkollektiv auftreten (V72M, C122Y und R191Q). Hierbei sollte angemerkt werden, dass die Mutation C122Y auch als Mosaik bei einem Vater eines SCN-Patienten gefunden wurde. Der betroffene Vater weist jedoch keinerlei klinischen Symptome der Erkrankung auf, währenddessen sein Sohn, der eine komplette Keimbahnmutation C122Y trägt, einen SCN-typischen Phänotyp zeigt (Germeshausen *et al.*, 2001). Im Verlauf der Doktorarbeit wurden weitere putative Motive in der Struktur des Elastase-Proteins identifiziert, wie die von Benson und Kollegen vorgeschlagenen Transmembrandomänen (Benson *et al.*, 2003). Von den bis dahin generierten Mutationen lagen nur die Mutationen P176R und R191Q im Bereich dieser putativen Transmembrandomänen. Weiterhin wurde von Benson *et al.* ein Tyrosin-basierendes Sortierungssignal YXX \emptyset im HNE-Protein

gefunden. Für X kann dabei jede beliebige Aminosäure eingesetzt werden und Ø stellt eine hydrophobe Aminosäure dar. Dieses Sortierungssignal soll vom AP3-Protein erkannt werden und auf diese Weise für den Transport der Elastase zu den azurophilen Granula verantwortlich sein. Um diese interessante Theorie erörtern zu können, wurden Mutationen der Neutrophilen Elastase in diesem potentiellen AP3-Sortierungssignal generiert (Y199F und Y199Stop). Hierbei handelt es sich bei der Mutante Y199F um eine Mutation, die bislang bei Patienten nicht gefunden wurde. Rous und Kollegen untersuchten die Rolle dieses Motivs bei dem Protein Lamp-3 und stellten fest, dass aufgrund der Mutation von Y zu F anstelle einer normalen intrazellulären Verteilung, das Protein eine verstärkte Oberflächen-Lokalisation aufwies (Rous *et al.*, 2002).

Welche Vorteile bietet ein induzierbares System? Zunächst sollte erwähnt werden, dass transiente Transfektionen von Suspensionszellen, zu denen die U937 zugehörig sind, in der Regel mit sehr niedrigen Transfektionseffizienzen einhergehen (Itani *et al.*, 1987; Roddie *et al.*, 2000). Weiterhin spricht gegen eine stabile konstitutive Expression der Neutrophilen Elastase die Tatsache, dass Serinproteasen eine proapoptotische Wirkung aufweisen (Trevani *et al.*, 1996). Aufgrund der Expression mutanter Neutrophiler Elastase könnte daher in den Zellen bereits während der Selektion stabiler Transduktanten eine zelluläre Apoptose induziert werden. Um einen derartigen negativen Selektionsdruck zu umgehen, kann man ein induzierbares System verwenden. Ein induzierbares System bietet den Vorteil, relativ unabhängig von Transfektionseffizienzen zu sein, die Wirkungen des zu untersuchenden Proteins zum unerwünschten Zeitpunkt vermeiden und die Kontrolle über den Expressionslevel des Proteins übernehmen zu können. Des weiteren kann eine nicht-induzierte Zelle bei vielen Analysen als eine interne Kontrolle eingesetzt werden.

Ein Nachteil des induzierbaren Systems liegt neben dem enormen Aufwand in der Generierung und Charakterisierung der Einzelzellklone insbesondere in den unterschiedlichen Expressionshöhen zwischen den einzelnen Einzelzellklonen sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene (vergleiche Tabelle 7, Abbildung 10). Um die Unterschiede auszugleichen, muss man beim Auswerten der Analysen die Expressionshöhen berücksichtigen und in die Berechnungen miteinbeziehen.

4.2 Mutationen der Neutrophilen Elastase führen zu einem Transportdefekt des Proteins in U937T

Nach seiner Synthese muss jedes der Proteine an den richtigen Zielort befördert werden. Die Verteilung der Proteine an den korrekten Bestimmungsort erfordert vielfältige Sortierungssignale und zahlreiche Sortierungsschritte. Eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen auf ihrem Weg zum Bestimmungsort ist die Glykosylierung. Die Glykosylierung fungiert als Vermittler von spezifischen Erkennungsprozessen, an denen Lektine, Antikörper oder Enzyme als Rezeptoren für die Zuckerliganden beteiligt sind (Varki, 1993; Helenius & Aebi, 2001). Weiterhin besteht eine ihrer wichtigsten Funktionen in der Änderung von biochemischen Parametern, wie der Löslichkeit des Proteins oder seiner Zugänglichkeit für Proteasen oder auch der Gewährleistung der richtigen Faltung und Zielsteuerung eines Proteins.

Die Struktur der Neutrophilen Elastase weist zwei Erkennungsstellen für eine N-Glykosylierung auf (Asparagin-95 sowie Asparagin-144) (Takahashi *et al.*, 1988). Diese werden bei der Wildtyp-Form auch verwendet, sodass die reife Neutrophile Elastase ein komplex-glykosyliertes Protein darstellt (Gullberg *et al.*, 1995). Bei der Analyse des Glykosylierungsmusters der mutanten Varianten der Elastase mittels einer Endoglykosidase H/F-Behandlung konnte bei vielen Mutanten eine Veränderung der Glykosylierung gezeigt werden. Die Mutanten C42R, V72M, InsPQ94, C122Y und Δ V145-C152 demonstrierten einen Verlust der Endo H-Resistenz und somit das Fehlen der komplex-glykosylierten Formen der HNE. Einige Mutanten wiesen eine Endo H-Resistenz und ein somit der WT-HNE vergleichbares Muster auf (S97L, P110L, Δ V161-F170, P176R und R191Q). Allerdings konnten für diese mutanten Formen, ausgenommen R191Q, unterschiedliche Verhältnisse zwischen der mannosereichen und komplexen Form im Vergleich zur WT-HNE festgestellt werden. Welche Bedeutung dieser Beobachtung zukommt, bleibt bisher ungeklärt. Möglicherweise wurde die Mehrzahl der Proteine nur mannosereich und nicht komplex-glykosyliert. Eventuell wurde die Struktur aufgrund der Mutationen insoweit verändert, dass nur ein partieller Zugang zu den Oligosacchariden möglich wurde und die Glykosidasen nur erschwert die Glykosylierung des Proteins durchführen konnten.

Interessanterweise zeigten die Mutanten S97L und P176R ein niedrigeres Molekulargewicht als die WT-HNE. Diese Veränderung könnte auf eine Glykosylierung von nur einer der beiden Glykosylierungsstellen zurückzuführen sein. Gleichzeitig spricht diese Beobachtung auch gegen die Funktion der Glykosylierung als essentielles Transportsignal bei der Neutrophilen Elastase, da die beiden Mutanten eine partielle Endo H-Resistenz und somit einen erfolgreichen Transport zum Golgi-Apparat aufwiesen. Diese Hypothese wird von Garwicz *et al.* unterstützt (Garwicz *et al.*, 1995). Er konnte für die Serinprotease Cathepsin G zeigen, dass die Mutation des Glykosylierungssignals keinerlei Auswirkung auf Prozessierung und Transport des Proteins zu den Granula in RBL und 32D Zellen nach sich zog. Bestärkt wird diese Hypothese weiterhin durch heterogene Glykosylierungsmuster anderer Serinproteasen. Während die Myeloperoxidase eine mannosereiche Glykosylierung (Nauseef *et al.*, 1988) und Cathepsin G (Lindmark *et al.*, 1990) komplexe Ketten zeigen, fehlen den Defensinen jegliche Glykosylierungen (Valore & Ganz, 1992). Somit scheint die Glykosylierung beim Transport der Serinproteasen zu den azurophilen Granula nur von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Unabhängig von der Bedeutung der Glykosylierung als Transportsignal, zeigte der Verlust der Endo H-Resistenz bei einigen Mutanten aber, dass die mannosereichen Oligosaccharid-Ketten nicht mehr in eine komplexe Glykosylierung konvertiert wurden. Dieses wiederum spiegelte zumindest eine Änderung des intrazellulären Transportes wieder, die sich durch eine Unterbrechung des Transportes zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat kennzeichnete.

Basierend auf den erhaltenden Daten wurde nachfolgend die Lokalisation der mutanten Elastase mittels einer subzellulären Fraktionierung ermittelt. Entsprechend des Glykosylierungsmusters konnte die WT-HNE sowie die Mutanten S97L, P110L, P176R und R191Q in Fraktionen nachgewiesen werden, welche die Lysosomen und das ER (P2) sowie Strukturen des Golgiapparates und sekretorische Vesikel (P3) enthielten. Wieder zeigten sich Unterschiede für die Mutanten C42R, V72M, InsPQ94, C122Y und Δ V145-C152, die eine signifikante Reduktion der Elastasemenge in der Golgi-korrespondierenden Fraktion ergaben. Die Verminderung entsprach bei diesen Mutanten dem Verlust der komplexen Glykosylierung, die einherging mit einem Verlust der Transportkompetenz aus den Kompartimenten des ER zum Golgi-Apparat. Trotz eines normalen

Glykosylierungsstatus demonstrierte die Mutante $\Delta V161-F170$ interessanterweise ebenfalls ein abweichendes Verteilungsmuster der Elastase. Diese Beobachtung sprach ebenfalls für eine Störung des intrazellulären Transportes, welcher mutmaßlich in anderen Kompartimenten als dem endoplasmatischen Retikulum vorlag.

Weiterhin ergab die Untersuchung der proteolytischen Aktivität der mutanten HNE-Proteine einen kompletten Aktivitätsverlust für die meisten der untersuchten Mutanten. Die Mutanten S97L und R191Q währenddessen behielten eine der WT-HNE in etwa vergleichbare proteolytische Aktivität bei. Im Gegensatz zu Li *et al.*, welche sehr variierende, inkonsequente Effekte in ihren Ergebnissen finden konnten (Li & Horwitz 2001), wiesen die hier analysierten Mutanten einen Zusammenhang zu ihrer intrazellulären Lokalisation auf. Alle Mutanten, welche ein Transportstopp im ER erfahren haben, also nicht bis zu den azurophilen Granula transportiert wurden, wiesen dementsprechend keine proteolytische Aktivität auf. Die Mutanten P110L und P176R, die einen korrekten Transport aufwiesen, zeigten ebenfalls keine Aktivität. Dies war bei P176R zu erwarten, da die Mutation direkt das aktive Zentrum betrifft. Als eine Erklärungsmöglichkeit könnte der Verlust der proteolytischen Aktivität auf eine fehlende Aktivierung der Serinprotease durch die Abspaltung des amino-terminalen Dipeptides zurückzuführen sein, welche normalerweise in den azurophilen Granula erfolgt (Gullberg *et al.*, 1995).

Von großer Wichtigkeit war die Frage, ob die mutanten Formen der Elastase weiterhin sezerniert werden. Von Gullberg und Kollegen konnte eine sezernierte Form der WT-HNE im Medium nachgewiesen werden, die jedoch keine Prozessierung des C-Terminus aufwies (Gullberg *et al.*, 1995). Garwicz *et al.* konnten des weiteren zeigen, dass nur ein kleiner Teil der synthetisierten Elastase in der Zelle verbleibt (Garwicz *et al.*, 2005). Die Mehrzahl der HNE-Proteine wird über die konstitutive Sekretion unmittelbar nach der Synthese aus der Zelle herausgeschleust. Mittels eines ELISA ist es möglich, das ins Medium sezernierte Protein zu messen, allerdings wird hierbei nicht zwischen der regulierten und konstitutiven Sekretion unterschieden. Den Untersuchungen von Garwicz zufolge resultiert jedoch das im ELISA messbare Protein größtenteils aus der konstitutiven Sekretion.

Die Analyse der Sekretion ergab für die Mutante S97L ein der WT-HNE vergleichbares Bild. Darüber hinaus wies die Mutante R191Q eine im Vergleich zur WT-HNE etwas

erhöhte Sekretionskapazität auf. Des Weiteren konnte für einige Mutanten eine signifikante Reduktion (P110L und Δ V161-F170) bis zu einem kompletten Fehlen der Sekretion im Vergleich zur WT-HNE demonstriert werden.

Die Daten demonstrierten einen Verlust der proteolytischen Aktivität, der auf einen fehlenden Transport der mutanten Proteine in die azurophilen Granula zurückzuführen war. Dementsprechend könnte man annehmen, dass die regulierte Sekretion dieser transportdefekten Proteine, welche normalerweise nach einem Stimulus aus den azurophilen Granula eingeleitet wird, nicht erfolgt ist. Erneut wiesen dementsprechend die erhaltenen Ergebnisse auf einen signifikanten Fehler in dem intrazellulären Transport der mutanten Neutrophilen Elastase, der jedoch neben der regulierten Sekretion auch den Transport in die sekretorischen Vesikel für die konstitutive Sekretion betraf.

Nachfolgend wurde die Größe der sezernierten Formen für die WT- und R191Q-HNE evaluiert. Hierbei wurde festgestellt, dass die sezernierte Form das gleiche Molekulargewicht aufwies wie die reife Neutrophile Elastase. Dieses ist konträr zu den Behauptungen von Gullberg *et al.*, welche die sezernierte Form als eine unprozessierte Variante der Neutrophile Elastase diskutierten (Gullberg *et al.*, 1995). Die Proteinsequenzanalysen von Sinha und Kollegen wiesen die humane Neutrophile Elastase als ein eindeutig 218 Aminosäuren großes Protein aus (Sinha *et al.*, 1987). Das sequenzierte Material stammt aus den Granula von gesunden Probanden. Die Untersuchungen von Gullberg jedoch fanden in einer stabil transfizierten RBL-Zelllinie (gewonnen aus der Ratte) statt. Dieser Spezies-Unterschied könnte die beobachteten Varianzen der Prozessierung erklären. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass im U937T Zellsystem die für die finale Prozessierung, das heißt, die Abspaltung des N- und C-Terminus der Elastase benötigten Enzyme nicht vorhanden sind. Infolgedessen würden beide detektierten Formen die gleiche Größe aufweisen. Gegen diese Eventualität spricht die Tatsache, dass eine proteolytische Aktivität der WT-HNE nachgewiesen werden konnte, die eine vollständige Prozessierung der Elastase voraussetzt.

4.3 Mutationen der Neutrophilen Elastase resultieren in einer zytoplasmatischen Akkumulation des Proteins in U937T

Es konnte beobachtet werden, dass die mutanten Formen der Neutrophilen Elastase eine fehlerhafte Glykosylierung und eine Veränderung der interzellulären Lokalisation aufwiesen. Des Weiteren demonstrierten MT-HNE-exprimierende Zellen eine fehlende Sekretionskapazität der Elastase. Zusammenfassend ergaben diese Ergebnisse einen deutlichen Hinweis auf einen signifikanten Transportdefekt abhängig vom Mutationsstatus der Neutrophilen Elastase.

Fraglich war, zu welchem Zeitpunkt des Transportes der Fehler auftritt und in welchem Kompartiment das jeweilige mutante Protein zu finden ist. Um diese Fragen zu klären, wurde die subzelluläre Lokalisation der mutanten Neutrophilen Elastase mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie präzisiert. Mittels dieser Technik ist es möglich, die einzelnen Strukturen der Zelle, wie das endoplasmatische Retikulum oder den Golgi-Apparat, über eine Färbung mit Organell-spezifischen Antikörpern darzustellen. Als schwierig erwies sich der Versuch, die Verteilung der Elastase in den U937T Zellen nachzuweisen. Suspensionszellen sind aufgrund ihres schmalen Zytoplasmasaums um den großen Zellkern sowie der kleinen und runden Form für die differenzierte Darstellung der Zellkompartimente nur unzureichend geeignet. Da anzunehmen ist, dass der interzelluläre Transport der HNE zelltyp-unabhängig stattfindet, wurden für diese Analysen humane HeLa Zellen verwendet, die mit der WT- oder MT-*ELA2*-Sequenzen transient transfiziert worden sind.

Die WT-HNE war vornehmlich in den Golgi-Strukturen zu finden. Ein vergleichbares Verteilungsmuster wies die Mutante R191Q auf. Diese Mutante sowie die Mutante S97L demonstrierten schon in vorausgegangen Untersuchungen keinerlei Veränderungen bezüglich Prozessierung, Aktivität und Sekretionskapazität, sondern entsprachen dem Bild der WT-HNE.

Ein signifikant verändertes Verteilungsmuster zeigten weitere untersuchte mutante HNE-Proteine. Bei der Mutante C122Y (exemplarisch für die Mutanten C42R, V72M, InsPQ94 und Δ V145-C152, die alle eine veränderte Glykosylierung und Lokalisation, sowie einen Sekretions- und Funktionsverlust aufwiesen) war keine Ko-Lokalisation mit dem Golgi oder mit den Lysosomen nachweisbar. Stattdessen wies das Protein eine Verteilung im

gesamten Zytoplasma der Zelle auf, wo es teilweise mit den Strukturen des ER ko-lokalisierte.

Die Mutante $\Delta V161-F170$ wies eine korrekte Glykosylierung, aber eine veränderte intrazelluläre Lokalisation auf, die über eine subzelluläre Fraktionierung belegt werden konnte. Weiterhin konnte eine Sekretion des Proteins nachgewiesen werden, die jedoch eine sehr starke Reduktion der Sekretionskapazität aufwies. Bei der Analyse der Mutante $\Delta V161-F170$ mittels konfokaler Lasermikroskopie ko-lokalisierte diese partiell mit den Strukturen des ER sowie des Golgi-Apparates. Sie zeigte zusätzlich eine analoge Akkumulation im Zytoplasma wie die Mutante C122Y. Eine mögliche Erklärung für dieses Gesamtbild wäre, dass das Protein das Golgi-Kompartiment erreicht hat, dort auch komplex glykosyliert wurde, jedoch nicht mehr effizient aus dem Golgi-Apparat heraus transportiert wurde und nur ein geringer Teil dieses Kompartiment verlassen konnte. Es kann daher angenommen werden, dass die Mutante $\Delta V161-F170$ das ER verlassen hat, aber ein partieller Transportblock im Golgi-Kompartiment erfolgt ist. Dieser könnte beispielsweise auf unzureichende strukturelle Merkmale für den Export aus dem Golgi zurückzuführen.

Das Verteilungsmuster der Mutante P176R, welche eine korrekte Glykosylierung und Lokalisation zeigte, aber einen Verlust der proteolytischen Aktivität und der Sekretion aufwies, demonstrierte eine partielle Ko-Lokalisation mit den Strukturen des ER sowie des Golgi-Apparates auf. Es konnte zusätzlich festgestellt werden, dass diese Mutante ebenfalls eine ähnliche Verteilung im Zytoplasma zeigte wie schon zuvor die Mutante C122Y.

Die Beobachtung der fehlenden Transportkompetenz der unterschiedlichen mutanten Proteine wurde durch die Ergebnisse der konfokalen Lasermikroskopie bestätigt. Abhängig von dem Mutationsstatus fand die Unterbrechung des Transportes in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle statt: vor (C42R, V72M, InsPQ94, C122Y, $\Delta V145-C152$) oder nach ($\Delta V161-F170$) dem Eintritt in den Golgi-Apparat beziehungsweise während des Transportes zu den Lysosomen (P110L, P176R). Des Weiteren wurde deutlich, dass nicht nur ein Transportblock stattfand, sondern auch eine Akkumulation der mutanten Proteine in den Strukturen des Zytoplasmas sichtbar wurde.

4.4 Mutationen der Neutrophilen Elastase führen zu einem Transportdefekt und zytoplasmatischer Akkumulation des Proteins bei Patienten mit SCN und CyN

Die identifizierten Veränderungen im U937T Modell, bedingt durch Mutationen der Neutrophilen Elastase, zeigten eine wichtige Rolle dieses Proteins im Pathomechanismus der Neutropenien. Basierend auf dem Informationsgewinn aus dem Zellmodell stellte sich die Frage, inwieweit die beobachtete Mislokalisierung der Elastase auch in primären Zellen von Patienten mit chronischen Neutropenien nachzuweisen ist.

Zunächst erfolgte der Nachweis der Lokalisation der Neutrophilen Elastase in Proteinlysaten von Patientengranulozyten mittels einer subzellulären Fraktionierung. Die Neutrophile Elastase konnte bei den Normal Spendern in Fraktionen nachgewiesen werden, welche die Lysosomen und das ER (P2) sowie Strukturen des Golgiapparates und sekretorische Vesikel (P3) enthalten. Im Gegensatz dazu zeigten die untersuchten Patienten einen signifikanten Verlust der Elastase in Fraktion P3. Weiterhin wies die Elastasebande in der lysosomalen Fraktion ein höheres Molekulargewicht auf. Dies könnte ein Hinweis auf eine Bindung mit zellulären Faktoren sein, die möglicherweise in dem endoplasmatischen Retikulum ansässig sind. Unabhängig von der Form der Neutropenie und dem Mutationsstatus wiesen alle Patienten das gleiche Verteilungsmuster des mutanten Proteins auf.

Über den Einsatz der konfokalen Lasermikroskopie wurde die genauere Lokalisation der Protease bestimmt. Die gesunden Kontrollpatienten zeigten die HNE in einer perinukleären Angrenzung. Diese perinukleäre Lokalisation der WT-HNE könnte der ER/Golgi-Struktur innerhalb der Zelle entsprechen. Bei den Patienten mit den Mutationen C122Y und Δ V161-F170 deutete sich keine (C122Y) oder nur eine sehr geringe (Δ V161-F170) perinukleäre Lokalisation der Elastase an. Stattdessen war die mutante Elastase bei beiden Patienten in einer diffusen zytoplasmatischen Verteilung zu finden.

Wie schon im Zellmodell beobachtet, war auch in den primären Granulozyten von erkrankten Patienten ein Defekt des Transportes der Neutrophilen Elastase zu den azurophilen Granula vorzufinden. Des weiteren erfolgte eine Akkumulation des mutanten Proteins innerhalb des Zytoplasmas der Zelle.

4.5 Mutationen der Neutrophilen Elastase rufen Stressantworten der Zellen hervor

Aus der Beobachtung, dass Mutationen der HNE sowohl im U937T Zellmodell als auch in primären Granulozyten von Patienten zu einer Akkumulation des mutanten Proteins innerhalb der Zelle führen können, resultierte die Frage, welche Konsequenzen eine solche Anreicherung nach sich zieht.

Die Proteinbiosynthese im ER wird durch eine stringente Qualitätskontrollmaschinerie überwacht, die nur einwandfrei gefaltete Proteine aus dem ER auf den weiteren Transportweg ins Golgi-Netzwerk entlässt. Nicht korrekt gefaltete Proteine werden zunächst im ER zurückgehalten und nachfolgend abgebaut (Bonifacino und Weissman, 1998). In diesen komplexen Prozess, definiert unter dem Begriff ERAD (ER-assoziierte Degradation), sind viele Mechanismen involviert. Dazu gehören zunächst die Erkennung von inkorrekt gefalteten Proteinen, ER-Retention und Rücktransport ins Zytoplasma, die nachfolgende Deglykosylierung, Ubiquitinierung sowie Proteolyse der Proteine durch die Proteasom-Maschinerie (Bonifacino und Weissman, 1998; Plemper und Wolf, 1999, Ellgaard und Helenius, 2003).

Ursprünglich bestand die Meinung, dass die Degradation von Proteinen im ER-Kompartiment durchgeführt wird (Finger *et al.*, 1993). Doch Werner *et al.* konnten zeigen, dass der zytosolische Proteasomkomplex eine proteolytische Komponente der ER-assoziierten Degradation von zwei luminalen Proteinen in Hefe darstellt (Werner *et al.*, 1996). Diesbezüglich wäre aber eine Retrotranslokation der fehlgefalteten Proteine ins Zytosol notwendig, wo sich die erforderliche Degradationsmaschinerie befindet. Vervollständigend wiesen sie deshalb den Export der ERAD-Substrate ins Zytosol nach. Jensen *et al.* konnten damit übereinstimmend die Degradation vom mutanten CFTR-Protein durch den Einsatz von Inhibitoren des zytosolischen Proteasoms verhindern (Jensen *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1995). Ferner konnten Albring und Kollegen eine Retrotranslokation vom ER ins Zytosol von fehlgefalteten MHC Klasse I Proteinen nachweisen (Albring *et al.*, 2004).

Dementsprechend könnte die beobachtete Akkumulation der mutanten Varianten der Neutrophilen Elastase ein Hinweis auf eine Retrotranslokation des mutanten Proteins ins Zytosol darstellen, die aufgrund einer inkorrekten Faltung erfolgt.

Bei ineffizientem oder nicht ausreichendem Abbau der inkorrekt gefalteten Proteine können jedoch weitere Zellantworten ausgelöst werden, zu denen auch die Induktion der Apoptose gehört (Liu & Kaufman, 2003; Hitomi *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang wurde die Apoptose einiger Mutanten nach Camptothecin-Zugabe analysiert. Camptothecin ist eine zytotoxische Droge, welche über die Inhibition der DNA Topoisomerase I die Auslösung der Apoptose steuert (Hsiang *et al.*, 1985). Es konnte exemplarisch für verschiedene Mutanten gezeigt werden, dass nach CPT-Induktion die Apoptoserate signifikant anstieg. Währenddessen wiesen die Mutanten S97L und R191Q eine der WT-HNE vergleichbare Apoptose auf. Der Zelltod ließ sich anhand spezifischer Apoptosemarker wie der Spaltung von PARP-1 sowie Spaltung von Caspase-3 (Daten nicht gezeigt) evaluieren. Diese Daten sind übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Aprikyan *et al.* berichteten beispielsweise über eine gesteigerte Apoptoserate im Knochenmark von Patienten mit kongenitaler Neutropenie (Aprikyan *et al.*, 2001). Auch Massullo und Kollegen wiesen im HL-60 Zellsystem eine Erhöhung der Apoptose nach Expression der Mutante G185R nach (Massullo *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu Beobachtungen von Cario *et al.* konnte keine Suppression des Bcl-2 Proteins dokumentiert werden (Cario *et al.*, 2005).

Der Transportdefekt, resultierend in einer zytoplasmatischen Akkumulation von Proteinen sowie eine erhöhte Apoptose sind Merkmale, die im Zusammenhang mit der *Unfolded Protein Response* (UPR) beschrieben werden. Zhang *et al.* geben einen guten Überblick über diesen komplexen Prozess, dessen Fehlsteuerung häufig eine Mitursache unterschiedlicher Krankheiten darstellt (Zhang & Kaufman, 2004).

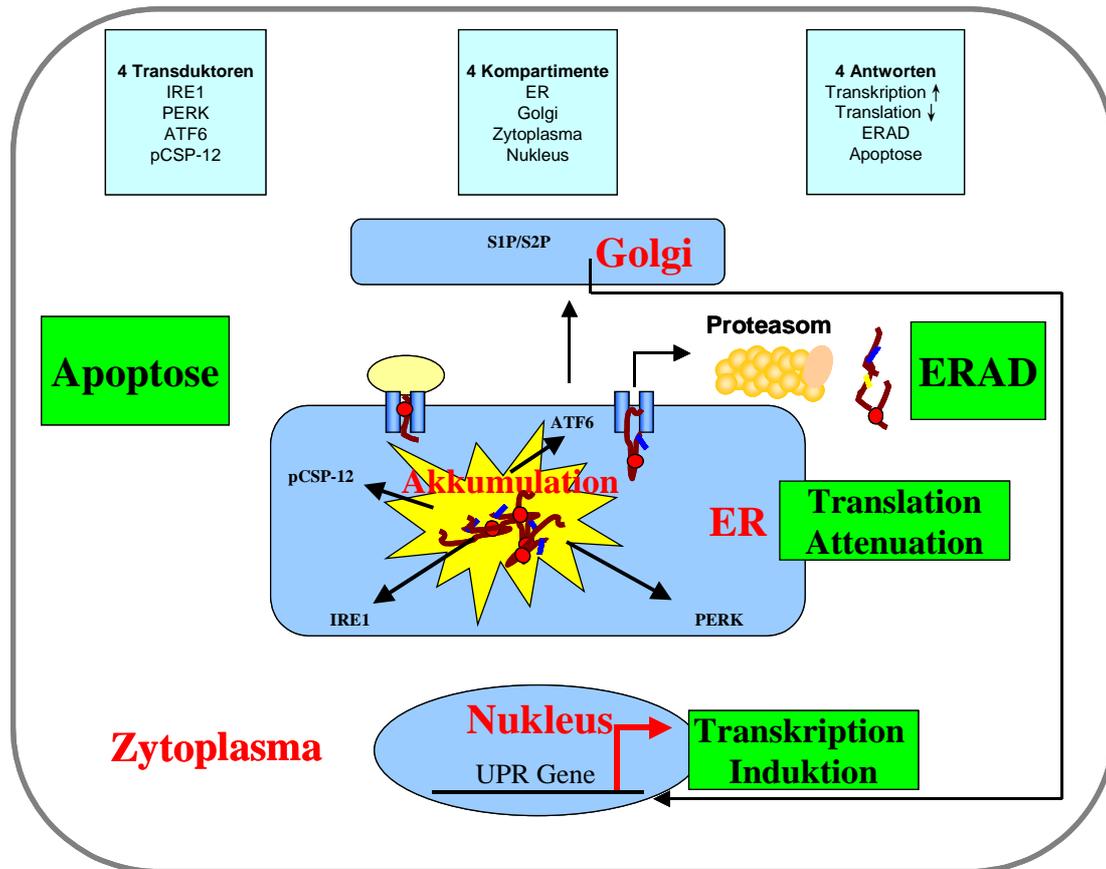


Abb. 31 Schematische Darstellung der Unfolded Protein Response. Die Unfolded Protein Response ruft vier unterschiedliche Antworten der Zelle hervor. Dieser Prozess verläuft in vier Kompartimenten der Zelle und beinhaltet die Aktivierung verschiedener Gene und Proteine. Weitere Details sind dem Text zu entnehmen (modifiziert nach Liu & Kaufman, Journal of Cell Science 2003).

Eine Störung der ER-Funktionen, beispielweise durch Synthese von mutierten, nicht faltungsfähigen Proteinen, kann zur Akkumulation dieser im ER führen (**Abbildung 31**). Dieser Zustand stellt eine Bedrohung der lebenden Zelle dar, welche versuchen muss, diesen „ER-Stress“ zu bewältigen. Eine Möglichkeit stellt die Induktion der ERAD-Maschinerie dar. Die fehlgefalteten Proteine werden zunächst aus dem ER-Lumen in das Zytoplasma retrotransloziert, wo sie ubiquitiniert und anschließend durch das Proteasom degradiert werden. Hierdurch erwirbt die Zelle die Möglichkeit, die Konzentration an inkorrekt gefalteten Proteinen zu senken und diese aus der Zelle zu entfernen. Die proteasomale Degradation von ER-assoziierten fehlgefalteten Proteine ist erforderlich, um die Zelle zunächst vor der *Unfolded Protein Response* Aktivierung zu schützen. Travers *et al.* konnte jedoch zeigen, dass die Inhibierung der Proteasomen ausreichend ist, um die UPR einzuschalten (Travers *et al.*, 2000). Dementsprechend erfolgt bei nicht ausreichender

Degradation der mutanten Proteinen das Einschalten der *Unfolded Protein Response*-Kaskade.

Die *Unfolded Protein Response* ist ein intrazellulärer Signalweg, welcher die Information über den Proteinfaltungstatus vom ER-Lumen ins Zytoplasma und den Nukleus überträgt (Kaufman, 2002; Ron, 2002). Die UPR beinhaltet initial die transkriptionelle Induktion von UPR-Genen, eine translationelle Dezimierung der Proteinbiosynthese sowie eine Erhöhung der ER-assoziierten Degradation von Proteinen. Bei einem Fehlschlag dieser Mechanismen wird die Apoptose der Zelle hervorgerufen.

Die drei wichtigsten Sensoren der UPR stellen PERK1, IRE1 und ATF6 dar. PERK 1 phosphoryliert eIF2 α , dieses wiederum führt zu einer Reduktion der Translationsinitiationskomplexe und einer generellen Translationsattenuation. ATF6 wird bei ER-Stress im Golgi-Kompartiment durch S1P/S2P Proteasen gespalten und das freiwerdende Fragment wandert in den Zellkern, wo es die Transkription der UPR-Gene aktiviert. IRE1 spaltet XBP1 mRNA, die ihrerseits mehr potente transkriptionelle Aktivatoren hervorbringt. Auf diese Weise wird die Produktion molekularer Chaperone hochreguliert und die Faltungskapazität des ER erhöht, um die Überlebenschancen der Zelle zu steigern. Bei anhaltender UPR Aktivierung reagiert die Zelle letztendlich mit der Induktion von Apoptose. Die wichtigste Rolle spielt hierbei IRE1, das in diesem Fall eine proapoptotische Funktion ausführt. Über die Aktivierung CHOP und der Caspase-Kaskaden, wobei Caspase-12 eine bedeutende Rolle im UPR-assoziierten Zelltods einnehmen soll, wird die Apoptose der Zelle ausgelöst (Zinszner *et al.*, 1998; Nakagawa *et al.*, 2000).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass das ER-Chaperon BiP (auch GRP78 genannt) als ein Master UPR-Regulator dient, indem es bei der Aktivierung von IRE1, PERK1 und ATF6 eine essentielle Rolle spielt (Hendershot, 2004). Unter normalen Bedingungen bindet BiP an neusynthetisierte, nicht gefaltete sowie fehlgefaltete Proteine (Ma & Hendershot, 2004). Ebenso besteht eine Bindung zu den drei Sensoren der UPR. Nach Akkumulation von ungefalteten Proteinen wird die Bindung zwischen BiP sowie IRE1, PERK1 und ATF6 unterbrochen und erlaubt das Einschalten des UPR-Prozesses. Dabei ist typischerweise die Hochregulation der BiP-Expression zu beobachten (Lee, 2001; Hendershot, 2004).

Nachfolgend wurde die Expression von BiP in CPT-induzierten U937T Zellen untersucht. Entsprechend der Überlegungen wurde eine Korrelation zwischen der Apoptose und der Induktion der BiP-Expression sichtbar. Die Analyse ergab eine signifikante Erhöhung der BiP-Expression in MT-HNE- (18 bis 53-fach) im Vergleich zur WT-HNE-exprimierenden Zellen. Diejenigen Mutanten, welche eine hohe Apoptose aufwiesen, zeigten ebenfalls eine starke Aktivierung dieses Chaperones. Interessanterweise war bei der Mutante R191Q ebenfalls eine signifikante BiP-Induktion nachweisbar. Diese Mutante zeigte in vorausgegangenen Analysen keine erhöhte Apoptose und auch keine Veränderungen hinsichtlich Prozessierung und Lokalisation.

Es bestehen unterschiedliche Möglichkeiten, ER-Stress in einer Zelle zu induzieren. Zu den bekanntesten Induktoren gehören Thapsigargin, A23187 und Tunicamycin (Lee, 2001). Durch Tunicamycin wird die Glykosylierung der Proteine verhindert und auf diese Weise der Transport aus dem ER gehemmt. Die Induktion von ER-Stress durch die Zugabe von Tunicamycin in WT-HNE-exprimierenden Zellen resultierte in einer Akkumulation des WT-HNE Protein im Zytoplasma, vergleichbar mit der Mutante C122Y. Diese Ergebnisse erlauben die Vermutung, dass die Akkumulation inkorrekt gefalteter mutanter Formen der Elastase die UPR einschalten kann.

Eine Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen wird in Zusammenhang mit inkorrekt gefalteten Proteinen und ihren Konsequenzen beschrieben (Rutishauser & Spiess, 2002). Hierzu gehören Diabetes oder Osteogenesis imperfecta (Lamande *et al.*, 1999). Oyadomari *et al.* untersuchten beispielsweise die Auswirkungen der Expression des mutanten Proinsulins im Mausmodell (Oyadomari *et al.*, 2002). Sie konnten zeigen, dass die Mutation ER-Stress induziert, welcher über die Induktion von CHOP zur Apoptose der pankreatischen β -Zellen führte. Weiterhin wird vermutet, dass auch in neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, (Katayama *et al.*, 1999), Parkinson (Imai *et al.*, 2001) oder Huntington die UPR eine wichtige Rolle spielt. Die Akkumulation der aberranten Proteine im Zytoplasma führt zu Proteinaggregaten, welche die Funktion des Ubiquitin-Proteasom Systems signifikant verschlechtern (Bence *et al.*, 2001). Obwohl die Aggregate nicht im ER, sondern im Zytoplasma der Zelle lokalisiert sind, vermehren sich die Anhaltspunkte auf eine Wechselbeziehung zwischen ERAD und UPR. Die Untersuchung von Bence *et al.* und Nishitoh *et al.* lieferten einen Hinweis, dass die zytoplasmatischen

Aggregate die proteasomale Funktion inhibieren, dadurch in den ERAD-Prozess eingreifen und auf diese Weise UPR induzieren (Nishitoh *et al.*, 2002).

Im Kontext mit den bisher publizierten Daten und den hier beobachteten Veränderungen ergibt sich eine neue, komplexe Sichtweise bezüglich des Einflusses, welchen die Mutationen der Neutrophilen Elastase auf die Entwicklung der neutropenischen Erkrankung nehmen. Die Daten erlauben die Entwicklung eines Modells zur Erklärung chronischer Neutropenien (**Abbildung 32**).

Infolge der HNE-Mutationen entsteht eine Faltungsinkompetenz der mutanten Proteine, die in einem Transportdefekt resultiert. Die Akkumulation der mutanten Proteine im ER ruft ER-Stress hervor und löst damit bedingte Induktion von Stress-Antworten aus, wie beispielsweise Erhöhung der Chaperone-Menge. Für dieses Szenario spricht die Induktion der BiP-Expression für die Mutante R191Q, welche jedoch keinen apoptotischen Effekt demonstriert. Die Expression dieser Mutante führt zunächst zur Induktion der UPR. Die Aktivierung der UPR ist ausreichend, um die ER-Kapazität zu steigern, ersichtlich aus der Erhöhung der BiP-Expression sowie Intensivierung der Sekretionskapazität (vergleiche Abbildung 16). Diese Maßnahmen resultieren in einer Normalisierung der Proteinprozessierung, sodass keine weiteren Folgen wie beispielsweise eine Apoptoseinduktion entstehen. Um weitere Nachweise für dieses Modell zu liefern, wäre beispielsweise die Überprüfung der Degradationskapazität dieser Mutante notwendig. Die beobachtete Akkumulation einiger weiterer mutanter Proteine weist auf eine Retrotranslokation dieser ins Zytoplasma der Zelle, um sie in der Proteasommaschinerie abzubauen, um so den anfallenden ER-Stress zu bewältigen. Jedoch ist der ER-assoziierte Degradationsprozess für diese Mutanten nicht effektiv genug, um mit dem anfallenden Übermaß mutanter Proteine fertig zu werden. Die anhaltende *Unfolded Protein Response* initiiert apoptotische Signale. Folglich endet die Expression der Mutante $\Delta V145-C152$, welche einen Transportstopp sowie eine fehlende Sekretion aufweist, trotz Erhöhung der BiP-Expression letztendlich in der Apoptose.

Für einige Mutationen bleiben einige Fragen offen und es ist nur zu spekulieren, welche Faktoren möglicherweise eine entscheidende Rolle spielen.

Beispielsweise wurden die Mutanten P110L und P176R korrekt prozessiert, wiesen aber keine proteolytische Aktivität und ebenfalls keine (P176R) oder eine sehr stark reduzierte Sekretion (P110L) auf. Diese Beobachtungen ließen sich mit einer Zurückhaltung des Proteins nicht im ER, sondern im Golgi-Kompartiment erklären. Ähnliches konnte für das Aquaporin-2 Wasserkanal-Protein demonstriert werden. Die reduzierte Expression dieses Proteins an der Plasmamembran der Zelle verursacht eine autosomal-dominante Form des nephrogenen Diabetes Insipidus. Mulders *et al.* konnten für das Protein eine Retention im Golgi-Apparat nachweisen (Mulders *et al.*, 1998). Dahingestellt sei jedoch, ob ähnliche Retrotranslokationsmechanismen wie sie aus dem ER-Kompartiment bekannt sind, auch im Golgi-Apparat existieren.

Die Expression der Mutante P110L in der Zelle führte zudem zu einer Induktion der BiP-Expression und resultierte in der Apoptose der Zellen. Es wäre denkbar, dass ein gewisser Teil der synthetisierten Proteine eine Bindung mit ER-Chaperonen eingeht, trotz Mutation eine korrekte Faltung erreicht und das Protein aus der Zelle sezerniert werden kann. Infolge der Mutationen könnte die Interaktion mit Chaperonen jedoch eine längere Zeit benötigen. Aus diesem Grund erhalten viele der produzierten mutanten Proteine keinen Interaktionspartner, bleiben im ER zurück und aktivieren die UPR. Bestärkt wird diese Annahme insbesondere auch durch die Berücksichtigung der beobachteten Akkumulation der Mutante $\Delta V161-F170$, welche eine der Mutante P110L vergleichbare reduzierte Sekretionskapazität aufwies.

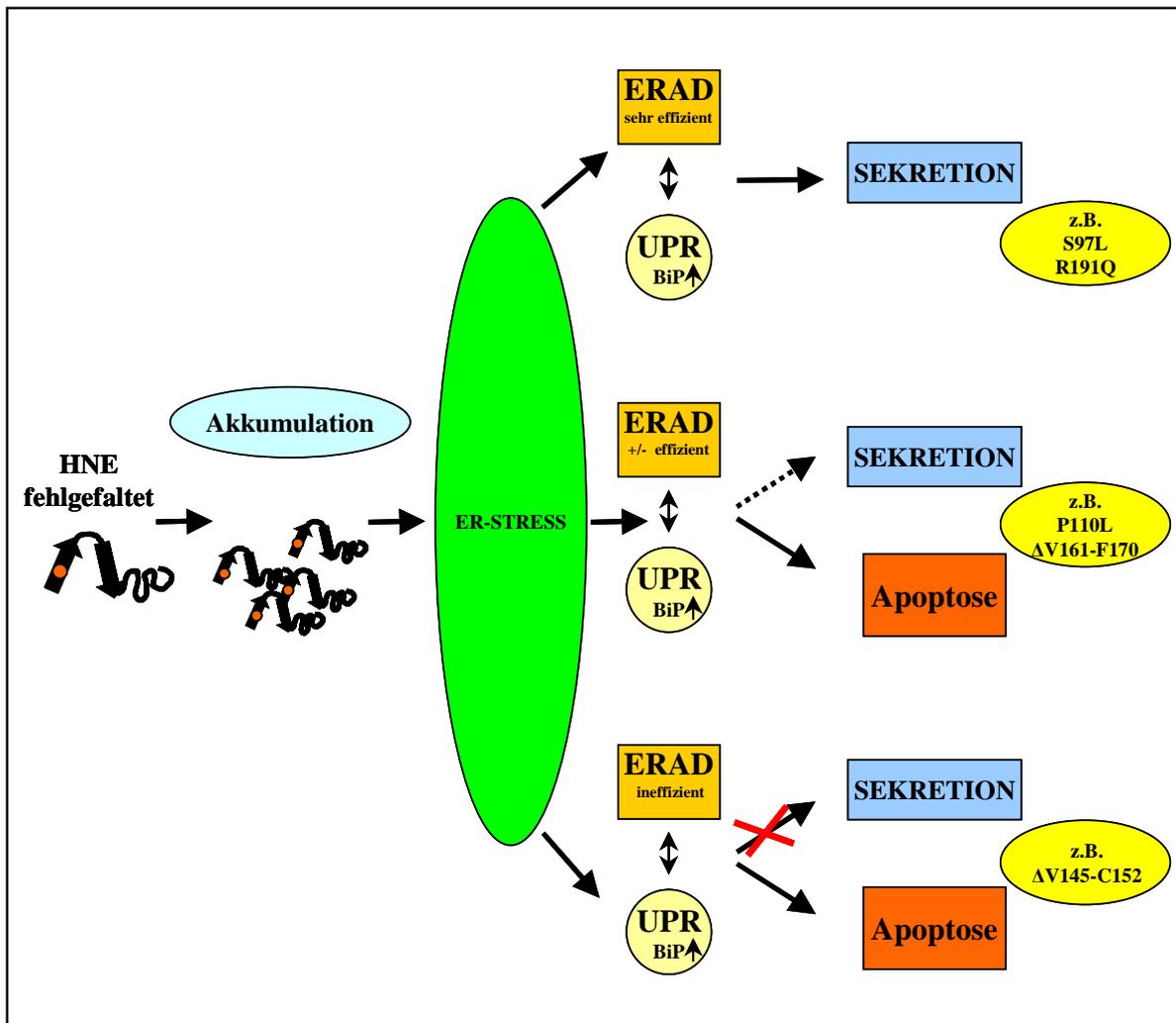


Abb. 32 Schematische Darstellung des Modells für die Pathogenese der chronischen Neutropenien. Eine inkorrekte Faltung, bedingt durch die Mutation der HNE, verhindert den Weitertransport der synthetisierten Proteine und führt zu einer Akkumulation im ER. Diese Anreicherung resultiert im ER-Stress, welcher unterschiedliche Zellantworten auslöst. Die Kapazität des ER wird erhöht, beispielsweise durch die Induktion von BiP und Steigerung der Degradation. Wenn diese Maßnahmen wirken, kann die Zelle ihre normalen Funktionen weiterführen. Wenn die ERAD-Maschinerie den anfallenden Überschuss an fehlgefalteten Proteinen nicht vollständig bewältigen kann und nur ein reduzierter Anteil an Proteinen die Zelle verlassen kann, wird die UPR aktiviert. Bei einer anhaltenden UPR werden apoptotische Kaskaden eingeschaltet und die Apoptose der Zelle ausgelöst.

4.6 Die Neutrophile Elastase stellt ein membran-assoziiertes, aber kein Transmembranprotein dar

Die Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zeigen, dass die Neutrophile Elastase in einer membran-assoziierten Form an der Plasmamembran nachgewiesen werden kann. Bangalore und Travis konnten nach Stimulation von neutrophilen Granulozyten die Freisetzung der Elastase aus den Granulozyten und gleichzeitige, erneute Bindung der aktiven HNE an die Plasmamembran aufzeigen (Bangalore und Travis, 1994). Auch andere Arbeitsgruppen berichten über membran-gebundene Formen der Elastase. Owen *et al.* untersuchten die Merkmale der membran-assoziierten im Vergleich zur löslichen Form der Elastase (Owen *et al.*, 1995). Als Kontrollen der Versuche dienten unstimulierte Zellen, welche nur sehr geringe Mengen an Elastase an der Oberfläche aufwiesen. Die Stimulation der Granulozyten resultierte in einer starken Mobilisation der Elastase an die Oberfläche. Zudem wies diese membran-gebundene Protease eine Aktivität gegenüber unterschiedlichen Substraten auf. Ferner konnte gezeigt werden, dass, im Gegensatz zu löslicher Elastase, eine Resistenz gegenüber Inhibitoren vorhanden war.

Der zugrundeliegende Mechanismus, welcher an der Elastase-Mobilisierung an die Oberfläche beteiligt ist, wird bisher nur vermutet. Durch die Zugabe von exogener Elastase zu Granulozyten konnte eine Bindung dieses Proteins an der externen Plasmamembran der neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Owen *et al.*, 1995). Von Dwenger *et al.* wird ein Elastase-Rezeptor an der Zelloberfläche der Granulozyten postuliert, der eine relativ schwache Bindungskapazität aufweist (Dwenger *et al.*, 1986). Eine andere Möglichkeit stellt eine elektrostatische Bindung der positiv geladenen Serinprotease an die Membran dar. Diese Hypothese wird von Owen *et al.* unterstützt, da die Exposition der neutrophilen Granulozyten mit positiv geladenen Molekülen wie Lactoferrin die Mobilisierung der Elastase an die Oberfläche hemmte. Im Gegensatz dazu hatte die Zugabe von negativ geladenen Molekülen keinerlei Effekt (Owen *et al.*, 1995).

Die Lokalisation an der Zelloberfläche konnte nicht nur für die Elastase aufgezeigt werden, sondern wurde auch für weitere Serinproteasen beobachtet. Beispielsweise wiesen Owen *et al.* das Vorkommen von Cathepsin G an der Oberfläche stimulierter Granulozyten nach (Owen *et al.*, 1995). Die Autoren vermuteten, dass, wie viele periphere Proteine auch,

Cathepsin G über elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken mit den hydrophilen Domänen integraler Membranproteine an der Membran festgehalten wird. Desgleichen konnte sowohl für Cathepsin G eine Aktivität der membran-gebundenen Protease gezeigt werden (Owen *et al.*, 1995) als auch das Vorhandensein von Cathepsin G-Rezeptoren (Campbell *et al.*, 1982).

Die Mobilisierung an die Zelloberfläche wurde für weitere Proteine der azurophilen Granula beschrieben und hat den Anschein eines allgemeingültigen Mechanismus. Auch *Urokinase-type plasminogen activator* (Chapman *et al.*, 1990), Proteinase 3 (Witko-Sarsat *et al.*, 1999), Lactoferrin (Birgens, 1984; Campbell *et al.*, 1982), Azurocidin (Campanelli *et al.*, 1990) und Myeloperoxidase (Cross *et al.*, 1981; Bangalore und Travis, 1994) wurden nicht nur in löslicher, sondern auch in membran-assoziiierter Form an der Oberfläche von Zellen detektiert.

Der Nachweis von Serinproteasen an der Zelloberfläche führte zu der Vermutung, dass die proteolytische Aktivität des Enzyms auf diese Weise scharf fokussiert werden kann (Owen *et al.*, 1995). Beispielsweise spielt die Elastase eine zentrale Rolle in der Migration der neutrophilen Granulozyten durch Bindegewebe. Um diese Aktivitäten ausüben zu können, muss eine Aktivität der Protease in einer Umgebung voller Serinproteaseinhibitoren gewährleistet werden. In ihrer membran-assoziierten Form weisen die Proteasen eine Resistenz gegenüber Serinproteaseinhibitoren und können auf diese Weise ihre Funktion weiterhin erfüllen. Ferner liegt ein weiterer denkbarer Vorteil in einer nur minimalen Zerstörung von umliegenden Gewebe, da ein präziseres und punktgenaueres Arbeiten möglich wird.

Kürzlich durchgeführte Untersuchungen von Benson und Kollegen lassen vermuten, dass die Neutrophile Elastase nicht nur in einer Assoziation mit der Membran vorliegt, sondern sogar eine transmembrane Konformation aufweist (Benson *et al.*, 2003). Mittels subzellulärer Fraktionierung und der Immunofluoreszenz-Färbung von RBL-Zellen fanden die Autoren prozessierte Formen der Elastase (31 kD) predominant in der azurophilen Granula, während ein geringfügiger Teil der Proteine keine Prozessierung des C-Terminus (34 kD) erfuhr und an der Plasmamembran sichtbar wurde. Weiterhin analysierten Benson *et al.* humane neutrophile Granulozyten nach Behandlung der Zellen mit Proteinase K

sowie selektiver Permeabilisierung der Plasmamembran. Sie fanden für die 34 kD-Form der HNE nach Zugabe von Proteinase K und Permeabilisierung eine Änderung des Migrationsverhaltens im Acrylamidgel im Vergleich zu der mit Proteinase K-behandelten, aber nicht permeabilisierten Kontrolle. Sie folgerten aus diesen Ergebnissen, dass die unprozessierte (mit C-Terminus) Neutrophile Elastase eine transmembrane Topologie demonstriert, während die prozessierte Form in den azurophilen Granula löslich vorliegt. Ihre Theorie unterstützend fanden sie zwei potentielle Transmembrandomänen in der computer-basierenden Prädiktion der Proteinstruktur der Neutrophilen Elastase (**Abbildung 33**).

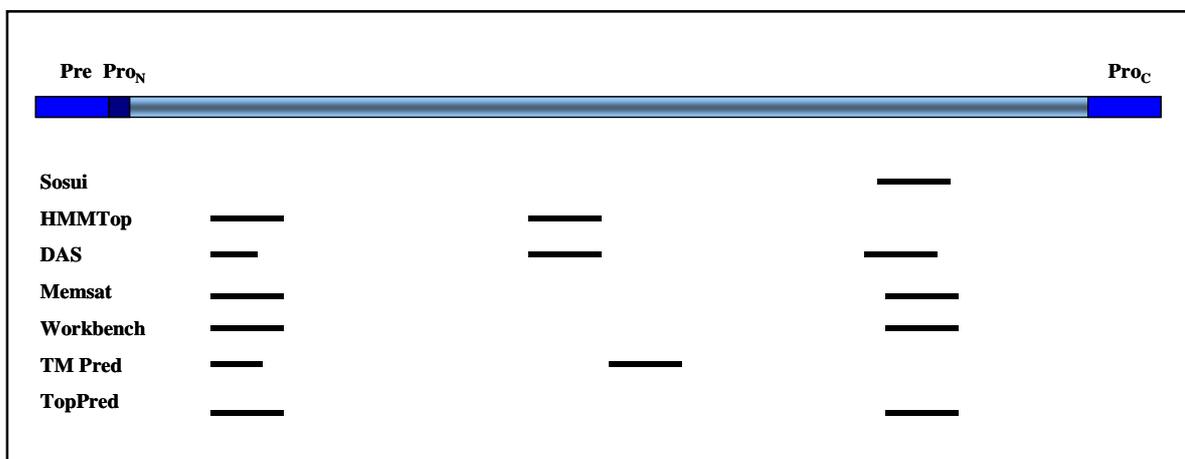


Abb. 33 Computer-basierende Prädiktion von Transmembrandomänen in der Proteinstruktur der Humanen Neutrophilen Elastase. Unter Verwendung unterschiedlicher Programme zur Topologie-Prädiktion von Proteinen wurden zwei putative Transmembrandomänen der HNE gefunden.

Benson und Kollegen stellten dementsprechend die Hypothese auf, Störungen der Transmembrandomänen führen zu einer Mislokalisierung der mutanten Proteine (Benson *et al.*, 2003). Die Autoren fanden ein Muster, nach dem sich die meisten Mutationen, die bei CyN gefunden werden, innerhalb der putativen Transmembrandomänen (TMD) befanden. Entsprechend konnten Benson *et al.* für die Mutante $\Delta V161-F170$, die einen Teil der putativen TMD deletieren soll, eine Störung des intrazellulären Transportes beobachten. Die Unterbrechung der Transmembrandomäne führte, gemäß den Analysen von Benson und Kollegen, zu einem ausschließlichen Transport der mutanten Elastase in die azurophilen Granula. Die Mutante A32V, welche die putative amino-terminale Transmembrandomäne auch unterbricht, war ebenfalls ausschließlich in den Granula nachweisbar. Währenddessen zeigte in den Arbeiten von Benson *et al.* die Mutante R191Q, in der carboxy-terminale Transmembrandomäne liegend, eine ausschließliche Plasmamembran-Lokalisation. Diese Beobachtung wirft Fragen auf. Der Hypothese

zufolge müsste diese Mutante einen Transport in die Granula aufweisen. Die Autoren erklärten, dass der Aminosäurewechsel von Arginin zu Glutamin die Hydrophobizität des Proteins erhöht und so die Transmembrandomäne stabilisiert wird (Benson *et al.*, 2003). Hiermit wurde die ausschließliche beobachtete Membranassoziation für diese Mutante erklärt. Leider bleiben die Autoren in ihrer Argumentation nicht konsequent. Gemäß der aufgestellten Annahme, hydrophobe Aminosäuren führen zu einer Stabilisierung der TMD, müsste die Mutante A32V eine dominante Plasmamembran-Lokalisation aufweisen, da der Austausch der Aminosäuren Alanin zu Valin tatsächlich zu einer stärkeren Hydrophobizität führt. Diese Mutante wies jedoch eine granuläre Verteilung der Elastase auf, anstatt wie R191Q an der Plasmamembran lokalisiert zu sein.

Ergänzt wurden diese Studien durch Massullo *et al.*, welche den Transport der Mutante G185R analysierte (Massullo *et al.*, 2005). Die Mutation G185R unterbricht ebenfalls die putative carboxy-terminale Transmembrandomäne und verursacht klinisch einen schweren kongenitalen Phänotyp. Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe standen in einem starken Kontrast zur Hypothese von Benson und Kollegen. Obwohl eine Störung der Transmembrandomäne vorlag, führte die Mutation laut Masullo und Mitarbeiter zu einer prominenten Lokalisation an der Plasmamembran, anstatt in einer ausschließlichen granulären Verteilung des Proteins zu resultieren.

Nicht nur die Diskrepanz der untersuchten Mutationen ist auffallend, sondern ist auch die von Benson und Kollegen vorgeschlagene Verwendung beider putativer Transmembrandomänen fraglich (**Abbildung 34A**). Bei der Biosynthese von integralen Membranproteinen mit einer abspaltbaren Signalsequenz erfolgt nach der Anheftung der entstehenden Polypeptidkette an die Membran des rauhen endoplasmatischen Retikulums die Einleitung der ko-translationalen Translokation des Proteins (Lodish *et al.*, 1996). Nachfolgend wird die Signalsequenz abgespalten und das Protein weiter ins ER-Lumen transloziert bis die Wechselwirkung mit einer Transfer-Stoppssequenz, in diesem Fall einer Transmembrandomäne, in einem Transferstopp resultiert.

Auch die Humane Neutrophile Elastase weist eine abspaltbare Signalsequenz auf, die ko-translational von Signalpeptidasen entfernt wird. Dieser Prozessierungsschritt erfolgt im ER-Lumen (Paetzel *et al.*, 2002). Bei der von Benson *et al.* vorgeschlagenen Topologie wäre jedoch die Abspaltung der Signalsequenz nicht möglich, da der N-Terminus im

Zytosol lokalisiert wäre. Zudem könnte vermutlich die Aktivierung des HNE-Proteins nicht stattfinden, da auch die Aktivierung der Protease durch die DPP I ebenfalls wahrscheinlich im Lumen der azurophilen Granula erfolgt (McGuire *et al.*, 1993).

Bezüglich der Integration von TMD in die Membranen untersuchten Ota *et al.* die Verankerung des Erythrozyten Band 3-Proteins (Ota *et al.*, 2000). Anhand unterschiedlicher Konstrukte konnten sie nachweisen, dass die Integration der zweiten Transmembrandomäne (TMD) in signifikanter Abhängigkeit zur Position der ersten TMD steht. Nur wenn beide TMD in unmittelbarer Nähe zueinander standen, wurde das Protein über beide TMD in der Membran verankert. Bei einer Distanz von mehr als 50 Aminosäuren zwischen den beiden TMD erfolgte die Integration der ersten TMD in die Membran, während das verbleibende Protein samt zweiter TMD in das ER-Lumen transloziert wurde. Folglich postulieren die Autoren notwendige Interaktionen zwischen beiden Domänen, um eine korrekte Topologie des Proteins zu erreichen. Da die beiden putativen Transmembrandomänen der Neutrophile Elastase aber einen Abstand von über mehr als 50 Aminosäuren aufweisen, wäre dementsprechend die von Benson und Kollegen Topologie nicht wahrscheinlich.

Möglich wäre jedoch, dass die Neutrophile Elastase ein Transmembran-Protein darstellt, das über nur eine Transmembrandomäne in der Plasmamembran verankert ist. Eventuell besteht eine Integration der HNE über die amino-terminalen Transmembrandomäne (**Abbildung 34B**). Jedoch wäre bei der Verwendung dieser potentiellen Transmembrandomäne die Glykosylierung des Proteins nicht mehr möglich, da sich beide Glykosylierungsstellen im Zytosol befänden, die Glykosylierung eines Proteins aber luminal abläuft (Geetha-Habib *et al.*, 1988; Kornfeld & Kornfeld, 1985). Wie aber von Gullberg *et al.* sowie eigene Arbeiten demonstrierten, wurde die Neutrophile Elastase glykosyliert vorgefunden (Gullberg *et al.*, 1995; vergleiche Abbildung 12).

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die putative C-terminale Transmembrandomäne verwendet werden könnte, die Neutrophile Elastase also ein Typ I Transmembranprotein darstellt (**Abbildung 34C**). Typ I integrale Membranproteine besitzen eine abspaltbare Signalsequenz am N-Terminus, der anschließend im ER-Lumen vorliegt, sowie carboxy-terminal eine transmembrane Domäne (Ott & Lingappa, 2003). Jedoch wäre bei dieser Topologie eine Aminosäure des aktiven Zentrums der HNE in die Membran integriert. Somit wäre möglicherweise die proteolytische Aktivität des Enzyms blockiert. Eigene

Arbeiten konnten jedoch die Aktivität der WT-HNE nachweisen (vergleich Abbildung 17).

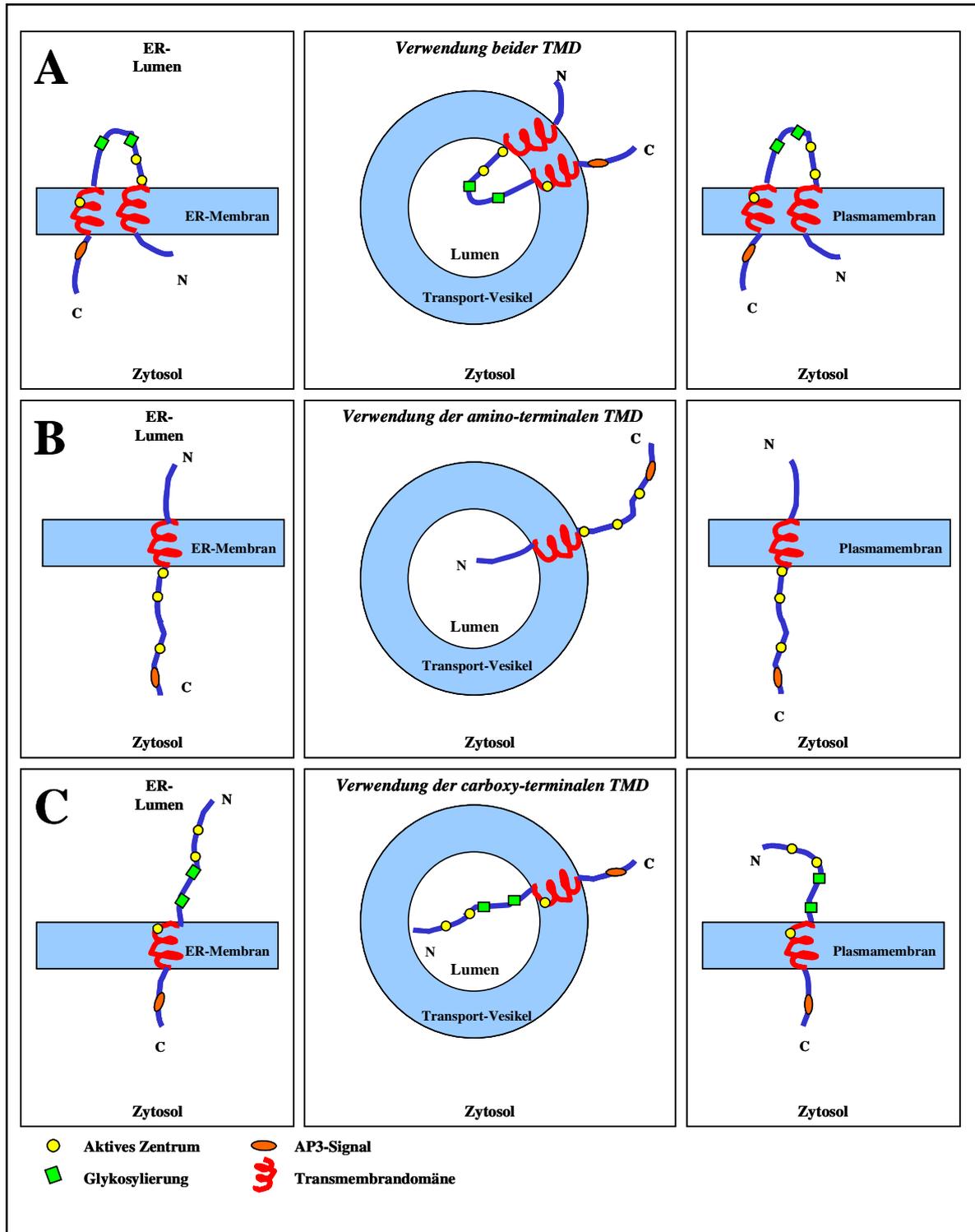


Abb. 34 Unterschiedliche Möglichkeiten der Integration der HNE in die Membranen. (A) Benson und Kollegen schlagen eine transmembrane Topologie der HNE vor, bei der die Integration in die Membran mittels zweier Transmembrandomänen erfolgt. (B) Bei der Verankerung der HNE mittels der amino-terminalen Transmembrandomäne in der Membran ist die Glykosylierung des Proteins nicht mehr möglich. (C) Bei der Verankerung der HNE mittels der carboxy-terminalen Transmembrandomäne in der Membran befände sich eine Aminosäure des aktiven Zentrums in die Membran integriert und die HNE würde möglicherweise ihre Aktivität verlieren.

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden nachfolgend Analysen hinsichtlich der Lokalisation und Topologie der Neutrophilen Elastase an der Plasmamembran durchgeführt.

Entsprechend der durchgeführten Studien anderer Arbeitsgruppen, konnte ebenfalls in der vorliegenden Arbeit die Lokalisation der Neutrophilen Elastase an der Oberfläche von U937T Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu WT-HNE-exprimierenden Zellen, die etwa eine 20 %-ige Oberflächen-HNE-Färbung aufwiesen, zeigten die Mutanten S97L, Δ V145-C152 und R191Q eine reduzierte Oberflächen-Lokalisation von etwa 7 %. Diese Daten könnten vermuten lassen, dass die Mutationen beispielweise zu einer Änderung der Konformation führen könnten und so eine geringere Bindungseffizienz zu Elastase-Rezeptoren oder anderen Proteinen an der Zelloberfläche entsteht.

Um die Möglichkeit einer transmembranen Topologie der Neutrophilen Elastase zu analysieren, wurden Proteinlysate von HNE-exprimierenden Zellen mit Proteinase K behandelt. Bei der Verwendung der putativen carboxy-terminalen Domäne läge der Teil des Proteins, wo die Antikörper-Bindungsstelle lokalisiert ist, für die Proteinase K zugänglich und würde bei der Behandlung mittels Proteinase K abgespalten werden; somit wäre keine Neutrophile Elastase mehr nachweisbar (**Abbildung 34C**). Bei der Analyse des Spaltungsmusters konnte jedoch das Protein detektiert werden. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde eine geringfügige Verschiebung des Molekulargewichtes im Acrylamidgel sichtbar (circa 1 kD). Bedingt durch die Zugabe von Proteinase K wäre eine Beeinflussung des Laufverhaltens der Elastase denkbar, da Proteinase K mit der Größe von 30 kD ein annähernd gleiches Molekulargewicht wie die Elastase aufweist. Zudem wurde nachträglich festgestellt, dass die eingesetzten Mengen an Proteinase K vermutlich zu hoch gewählt wurden.

In der vorliegenden Arbeit konnte des Weiteren für die WT-HNE und einige mutante Varianten eine sezernierte Form nachgewiesen werden. Viele Transmembranproteine vom Typ I und II kommen auch in einer löslichen Form vor (Hooper *et al.*, 1997). Diese löslichen Formen entstehen durch die Proteolyse der Transmembranproteine, welche mittels „Sheddase“ durchgeführt wird. Über die Regulation und Identifizierung der für dieses sogenannten Zelloberflächen-*Shedding* verantwortliche Proteasen ist bislang sehr wenig bekannt. Die Sekretion in dieser Weise betrifft einige Membranrezeptoren, Rezeptorliganden oder auch Zelladhäsionsmoleküle (Rose-John & Heinrich, 1994). Die

biologische Funktion kann nur angenommen werden und liegt mutmaßlich in der Erstellung von löslichen Proteinen mit etwas abgewandelten Eigenschaften als die membrane Variante. Unterschiedliche Inhibitorstudien wiesen Metalloproteasen als Vermittler der Proteolyse auf. Haro *et al.* zeigten beispielsweise, dass in das *Shedding* von TNF α die Matrix Metalloprotease-7 involviert ist (Haro *et al.*, 2000). Bekannt ist zudem, dass auch Serinproteasen mit *Shedding*-Prozessen assoziiert werden.

Im Rahmen des *Sheddings* wäre zu erwarten, dass die sezernierte Form der Elastase, welche aus der carboxy-terminal transmembran-verankerten Elastase entstehen würde, ein deutlich niedrigeres Molekulargewicht aufwiese (**Abbildung 34C**).

Die Analyse der Größe der sezernierten Form ergab jedoch keinerlei Unterschiede zwischen der endogenen und der sezernierten Neutrophilen Elastase. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die sezernierte Form der Neutrophilen Elastase nicht über das *Shedding* einer transmembranen Variante entsteht. Ihre Funktion konnte eher im *Shedding* selbst beschrieben werden. In diesem Zusammenhang konnten Kaup *et al.* das *Shedding* des humanen Transferrin Rezeptors nachweisen, welches mit der membran-assoziierten Neutrophilen Elastase verknüpft wurde (Kaup *et al.*, 2002).

Ein weiterer Aspekt, den Benson und Kollegen im Zusammenhang mit der transmembranen Topologie der Neutrophilen Elastase diskutierten, war der Transport der Serinprotease über das AP3-Protein zu den azurophilen Granula. Entsprechend fanden die Autoren in der computer-basierenden Prädiktion der Proteinstruktur der Neutrophilen Elastase ein Tyrosin-basierendes Signal, welches vom AP3 erkannt werden könnte.

Aufgrund der beobachteten Oberflächen-Lokalisation der Mutante Y199Stop, welche eine Deletion des AP3-Signals aufweist, postulieren Benson und Kollegen, dass die Unterbrechung des AP3-Signals in einer ausschließlichen plasmamembranen Lokalisation der mutanten Elastase resultiert. Die Unterbrechungen der transmembranen Strukturen des Proteins rufen dagegen einen exzessiven Transport der Elastase in die Granula hervor. Viele der gefundenen Mutationen der Elastase liegen im Bereich des vorgeschlagenen AP3-Sortierungssignals und sind mit SCN assoziiert. Mutationen, welche innerhalb der Transmembrandomänen liegen, werden im Zusammenhang mit zyklischen Neutropenien beschrieben.

Studien bezüglich der Wechselwirkung der HNE und AP3 von Massullo *et al.* wiesen Unterschiede im Verteilungsmuster von AP3 in G185R- und WT-HNE-exprimierenden Zellen auf (Massullo *et al.*, 2005). Massullo und Kollegen fanden einen Verlust des AP3-Proteins in G185R-exprimierenden Zellen. Diese Beobachtung erklärten die Autoren durch mutmaßliche Veränderungen der Struktur in der HNE, die Störungen der Interaktion zwischen der Neutrophilen Elastase und AP3 bedingen.

Eigene Untersuchungen in diesem Zusammenhang konnten keine Verbindung zwischen der Neutrophilen Elastase und dem AP3-Protein erkennen lassen. Diesbezüglich wurden zwei Mutanten erstellt, welche das Tyrosin-basierende Signal mutieren. Bei der Mutante Y199F konnte keinerlei Beeinflussung des Transportes der HNE nachgewiesen werden. Die Verteilung des mutanten Proteins in transient transfizierten HeLa Zellen entsprach dem der WT-HNE. Interessanterweise konnte für die Mutante Y199Stop, welche von Benson und Kollegen an der Plasmamembran verteilt gefunden wurde, keine positive HNE-Färbung aufgezeigt werden. Die nachfolgende Analyse der Zelllysate mittels Western Blot wies keinerlei Proteinexpression für diese Mutante nach, während die Expression der Mutante Y199F in einem deutlichen HNE-Signal resultierte. Denkbar wäre, dass aufgrund des Stoppsignals in der Gensequenz kein Protein gebildet wird oder aber das verkürzte Protein unmittelbar nach der Biosynthese abgebaut wird.

Des Weiteren wurde über eine Ko-Immünpräzipitation von HNE und AP3 versucht, die Interaktion der beiden Proteine nachzuweisen. Während die Gesamtzelllysate deutliche Signale für AP3 aufwiesen, konnte kein AP3-Protein in den mit HNE-präzipitierten Proben detektiert werden. Diese Analysen lassen vermuten, dass AP3 keine wichtige Rolle beim Transport der HNE spielt.

Unter Berücksichtigung des oben erläuterten Wissenstandes zur Bedeutung membranassoziierter Formen der HNE und eigener Analysen im Hinblick auf eine transmembrane Konformation des Proteins kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Neutrophile Elastase kein Transmembranprotein darstellt. Folglich kann die Protease nicht über das AP3-Protein in die azurophilen Granula transportiert werden.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse eine Lokalisation der Neutrophilen Elastase an der Plasmamembran, weisen jedoch nicht auf eine transmembrane Topologie des Proteins hin. Des Weiteren lassen die hier vorgestellten Daten des Zellmodells auf einen neuen Mechanismus schließen, welcher die Ursache der chronischen Neutropenien darstellen könnte. Die Mutationen der Neutrophilen Elastase führen zur Expression inkorrekt gefalteter Proteine. Dieses verursacht eine Akkumulation dieser mutanten Formen im Zytoplasma der Zelle und zieht die Aktivierung der UPR nach sich. Die anhaltende UPR-Induktion resultiert in der Apoptose der Zellen. Zusätzlich konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Mislokalisierung der Neutrophilen Elastase in primären Granulozyten von Patienten mit Neutropenien demonstriert werden. Wie schon die Analysen im Zellmodell zeigten, führte die Expression der mutanten Elastase auch in primären Granulozyten zum selben Ergebnis und verdeutlichte auf diese Weise die Signifikanz des intrazellulären Transportdefektes der mutanten Neutrophilen Elastase. Die Entdeckung dieses Mechanismus´ dient als Ausgangspunkt für weitere Analysen hinsichtlich ERAD und UPR und könnte die Basis für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze bei den neutropenischen Erkrankungen darstellen.

4.7 Ausblick

Die Identifizierung der UPR als verantwortlichen Mechanismus zur Auslösung der kongenitalen Erkrankungen eröffnet neue Möglichkeiten bezüglich der therapeutischen Ansätze. Die Aktivierung der UPR erfolgt durch die Zunahme an inkorrekt gefalteten Proteinen, welche durch das ER-assoziierte Degradationssystem nicht rechtzeitig abgebaut werden. Die akkumulierten Proteine lösen ER-Stress in der Zelle aus und rufen letztendlich eine UPR-verknüpfte Apoptose der Zelle aus. Die Inhibition dieser Stress-Antwort durch den Einsatz pharmakologischer oder synthetischer Chaperone könnte trotz Mutation in einem funktions-fähigen Protein resultieren (Cohen & Kelly, 2003).

Dieser Weg ist zwischenzeitlich für einige Proteine, welche aufgrund einer inkorrekten Faltung im ER zurückgehalten werden, beschrieben worden (Morello *et al.*, 2000; Tamarappoo & Verkman, 1998). Infolge der Zugabe chemischer oder pharmakologischer Chaperone konnte eine Korrektur des intrazellulären Transportes der fehlgefalteten Proteine erreicht und somit die Aktivierung der UPR verhindert werden (Tamarappoo & Verkman, 1998).

Die vermutliche Funktion der künstlichen Chaperone liegt in der Erleichterung der Faltung (Sawano *et al.*, 1992), Stabilisierung der Proteinkonformation (Gekko & Timasheff, 1981) und auf diese Weise einer Einflussnahme auf den korrekten Proteintransport.

Unter der Berücksichtigung, dass Protein-spezifische Inhibitoren als pharmakologische Chaperone einsetzbar sind (Morello *et al.*, 2000), läge der Einsatz bei kongenitaler Neutropenie bereits in naher Zukunft. Beispielweise konnte für die Fabry-Erkrankung gezeigt werden, dass der Einsatz eines kompetitiven Inhibitors von α -Galaktosidase, welche aufgrund von Mutationen im ER aggregierte, zur Normalisierung der Enzymfunktion führte (Fan *et al.*, 1999). Aufgrund der Verbindung der Neutrophilen Elastase mit Erkrankungen der Atemwege befinden sich seit geraumer Zeit einige Inhibitoren der Neutrophilen Elastase in klinischer Erprobung (Chughtai & O'Riordan, 2004). Dazu gehören sowohl natürlich vorkommende Inhibitoren wie SLPI (McElvaney *et al.*, 1993) und α 1-Antitrypsin (Sandhaus, 2004) als auch synthetische *small molecules inhibitors* (Koizumi *et al.*, 1999), welche direkt an die Aminosäuren des aktiven Zentrums der Neutrophilen Elastase binden. Es konnte für einige der *small molecules inhibitors*

gezeigt werden, dass sie sowohl die intrazelluläre als auch die membran-assoziierte Elastase inhibieren, ohne einen Einfluss auf die antibakteriellen Eigenschaften der neutrophilen Granulozyten auszuüben. Des weiteren weisen sie eine hohe Stabilität auf und bieten den Vorteil einer oralen Darreichungsart. Zusammengefasst bieten die bisher durchgeführten Studien eine gute Basis für die Entwicklung neuer Therapien bei chronischen Neutropenien.

5.1 Literaturverzeichnis

Albring,J., Koopmann,J.O., Hammerling,G.J. & Momburg,F. Retrotranslocation of MHC class I heavy chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol is dependent on ATP supply to the ER lumen. *Mol. Immunol.* **40**, 733-741 (2004).

Allen,D.H. & Tracy,P.B. Human coagulation factor V is activated to the functional cofactor by elastase and cathepsin G expressed at the monocyte surface. *J. Biol. Chem.* **270**, 1408-1415 (1995).

Aprikyan,A.A., Liles,W.C. & Dale,D.C. Emerging role of apoptosis in the pathogenesis of severe neutropenia. *Curr. Opin. Hematol.* **7**, 131-132 (2000a).

Aprikyan,A.A. *et al.* Myelokathexis, a congenital disorder of severe neutropenia characterized by accelerated apoptosis and defective expression of bcl-x in neutrophil precursors. *Blood* **95**, 320-327 (2000b).

Aprikyan,A.A. *et al.* Impaired survival of bone marrow hematopoietic progenitor cells in cyclic neutropenia. *Blood* **97**, 147-153 (2001).

Ariel,A. *et al.* IL-2 induces T cell adherence to extracellular matrix: inhibition of adherence and migration by IL-2 peptides generated by leukocyte elastase. *J. Immunol.* **161**, 2465-2472 (1998).

Baggiolini,M. The enzymes of the granules of polymorphonuclear leukocytes and their functions. *Enzyme* **13**, 132-160 (1972).

Bainton,D.F. & Farquhar,M.G. Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. Two types derived from opposite faces of the Golgi complex in developing granulocytes. *J. Cell Biol.* **28**, 277-301 (1966).

Bainton,D.F., Ulliyot,J.L. & Farquhar,M.G. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J. Exp. Med.* **134**, 907-934 (1971).

Bainton,D.F., Miller,L.J., Kishimoto,T.K. & Springer,T.A. Leukocyte adhesion receptors are stored in peroxidase-negative granules of human neutrophils. *J. Exp. Med.* **166**, 1641-1653 (1987).

Banda,M.J., Rice,A.G., Griffin,G.L. & Senior,R.M. Alpha 1-proteinase inhibitor is a neutrophil chemoattractant after proteolytic inactivation by macrophage elastase. *J. Biol. Chem.* **263**, 4481-4484 (1988).

Bangalore,N. & Travis,J. Comparison of properties of membrane bound versus soluble forms of human leukocytic elastase and cathepsin G. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **375**, 659-666 (1994).

Barrett,A.J. Leukocyte elastase. *Methods Enzymol.* **80 Pt C**, 581-588 (1981).

-
- Beger,C. *et al.* Identification of Id4 as a regulator of BRCA1 expression by using a ribozyme-library-based inverse genomics approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 130-135 (2001).
- Belaouaj,A. *et al.* Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat. Med.* **4**, 615-618 (1998).
- Bellanne-Chantelot,C. *et al.* Mutations in the ELA2 gene correlate with more severe expression of neutropenia: a study of 81 patients from the French Neutropenia Register. *Blood* **103**, 4119-4125 (2004).
- Bence,N.F., Sampat,R.M. & Kopito,R.R. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* **292**, 1552-1555 (2001).
- Benson,K.F. *et al.* Mutations associated with neutropenia in dogs and humans disrupt intracellular transport of neutrophil elastase. *Nat. Genet.* **35**, 90-96 (2003).
- Birgens,H.S. The biological significance of lactoferrin in haematology. *Scand. J. Haematol.* **33**, 225-230 (1984).
- Bode,W., Meyer E Jr & Powers,J.C. Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry* **28**, 1951-1963 (1989).
- Bonifacino,J.S. & Weissman,A.M. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 19-57 (1998).
- Bonilla,M.A. *et al.* Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia in patients with congenital agranulocytosis. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1574-1580 (1989).
- Bonilla,M.A. *et al.* Long-term safety of treatment with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (r-metHuG-CSF) in patients with severe congenital neutropenias. *Br. J. Haematol.* **88**, 723-730 (1994).
- Borregaard,N., Kjeldsen,L., Lollike,K. & Sengelov,H. Granules and secretory vesicles of the human neutrophil. *Clin. Exp. Immunol.* **101 Suppl 1**, 6-9 (1995).
- Borregaard,N. & Cowland,J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* **89**, 3503-3521 (1997).
- Bradford,M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** , 248-254 (1976).
- Cai,T.Q. & Wright,S.D. Human leukocyte elastase is an endogenous ligand for the integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, alpha M beta 2) and modulates polymorphonuclear leukocyte adhesion. *J. Exp. Med.* **184**, 1213-1223 (1996).

-
- Campanelli,D., Detmers,P.A., Nathan,C.F. & Gabay,J.E. Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. Differential antimicrobial and proteolytic properties. *J. Clin. Invest* **85**, 904-915 (1990).
- Campbell,E.J. Human leukocyte elastase, cathepsin G, and lactoferrin: family of neutrophil granule glycoproteins that bind to an alveolar macrophage receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **79**, 6941-6945 (1982).
- Campbell,E.J., Campbell,M.A. & Owen,C.A. Bioactive proteinase 3 on the cell surface of human neutrophils: quantification, catalytic activity, and susceptibility to inhibition. *J. Immunol.* **165**, 3366-3374 (2000).
- Cario,G. *et al.* Heterogeneous expression pattern of pro- and anti-apoptotic factors in myeloid progenitor cells of patients with severe congenital neutropenia treated with granulocyte colony-stimulating factor. *Br. J. Haematol.* **129**, 275-278 (2005).
- Carter,C.R., Whitmore,K.M. & Thorpe,R. The significance of carbohydrates on G-CSF: differential sensitivity of G-CSFs to human neutrophil elastase degradation. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 515-522 (2004).
- Chanat,E. & Huttner,W.B. Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* **115**, 1505-1519 (1991).
- Chapman,H.A., Bertozzi,P., Sailor,L.Z. & Nusrat,A.R. Alveolar macrophage urokinase receptors localize enzyme activity to the cell surface. *Am. J. Physiol* **259**, L432-L438 (1990).
- Chughtai,B. & O'Riordan,T.G. Potential role of inhibitors of neutrophil elastase in treating diseases of the airway. *J. Aerosol Med.* **17**, 289-298 (2004).
- Clark,J.M., Aiken,B.M., Vaughan,D.W. & Kagan,H.M. Ultrastructural localization of elastase-like enzymes in human neutrophils. *J. Histochem. Cytochem.* **28**, 90-92 (1980a).
- Clark,J.M., Vaughan,D.W., Aiken,B.M. & Kagan,H.M. Elastase-like enzymes in human neutrophils localized by ultrastructural cytochemistry. *J. Cell Biol.* **84**, 102-119 (1980b).
- Cohen,F.E. & Kelly,J.W. Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature* **426**, 905-909 (2003).
- Cross,A.R., Jones,O.T., Harper,A.M. & Segal,A.W. Oxidation-reduction properties of the cytochrome b found in the plasma-membrane fraction of human neutrophils. A possible oxidase in the respiratory burst. *Biochem. J.* **194**, 599-606 (1981).
- Dale,D.C. & Hammond,W.P. Cyclic neutropenia: a clinical review. *Blood Rev.* **2**, 178-185 (1988).
- Dale,D.C. *et al.* Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. *Blood* **96**, 2317-2322 (2000).
- Dale,D.C. *et al.* Severe chronic neutropenia: treatment and follow-up of patients in the Severe Chronic Neutropenia International Registry. *Am. J. Hematol.* **72**, 82-93 (2003).

-
- Delclaux,C. *et al.* Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **14**, 288-295 (1996).
- Dell'Angelica,E.C. *et al.* AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *EMBO J.* **16**, 917-928 (1997).
- Donadieu,J. *et al.* Analysis of risk factors for myelodysplasias, leukemias and death from infection among patients with congenital neutropenia. Experience of the French Severe Chronic Neutropenia Study Group. *Haematologica* **90**, 45-53 (2005).
- Doring,G. The role of neutrophil elastase in chronic inflammation. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **150**, S114-S117 (1994).
- Duan,Z. *et al.* A novel notch protein, N2N, targeted by neutrophil elastase and implicated in hereditary neutropenia. *Mol. Cell Biol.* **24**, 58-70 (2004).
- Dwenger,A., Tost,P. & Holle,W. Evaluation of elastase and alpha 1-proteinase inhibitor-elastase uptake by polymorphonuclear leukocytes and evidence of an elastase-specific receptor. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **24**, 299-308 (1986).
- El Ouriaghli,F. *et al.* Neutrophil elastase enzymatically antagonizes the in vitro action of G-CSF: implications for the regulation of granulopoiesis. *Blood* **101**, 1752-1758 (2003).
- Elbein,A.D. Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharides. *CRC Crit Rev. Biochem.* **16**, 21-49 (1984).
- Ellgaard,L. & Helenius,A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 181-191 (2003).
- Emig,S., Schmalz,D., Shakibaei,M. & Buchner,K. The nuclear pore complex protein p62 is one of several sialic acid-containing proteins of the nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* **270**, 13787-13793 (1995).
- Ewald,A., Kossner,U., Scheer,U. & Dabauvalle,M.C. A biochemical and immunological comparison of nuclear and cytoplasmic pore complexes. *J. Cell Sci.* **109** (Pt 7), 1813-1824 (1996).
- Fan,J.Q., Ishii,S., Asano,N. & Suzuki,Y. Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat. Med.* **5**, 112-115 (1999).
- Finger,A., Knop,M. & Wolf,D.H. Analysis of two mutated vacuolar proteins reveals a degradation pathway in the endoplasmic reticulum or a related compartment of yeast. *Eur. J. Biochem.* **218**, 565-574 (1993).
- Freedman,M.H. *et al.* Myelodysplasia syndrome and acute myeloid leukemia in patients with congenital neutropenia receiving G-CSF therapy. *Blood* **96**, 429-436 (2000).
- Gallin,J.I. Neutrophil specific granules: a fuse that ignites the inflammatory response. *Clin. Res.* **32**, 320-328 (1984).

-
- Garwicz,D., Lindmark,A. & Gullberg,U. Human cathepsin G lacking functional glycosylation site is proteolytically processed and targeted for storage in granules after transfection to the rat basophilic/mast cell line RBL or the murine myeloid cell line 32D. *J. Biol. Chem.* **270**, 28413-28418 (1995).
- Garwicz,D., Lennartsson,A., Jacobsen,S.E., Gullberg,U. & Lindmark,A. Biosynthetic profiles of neutrophil serine proteases in a human bone marrow-derived cellular myeloid differentiation model. *Haematologica* **90**, 38-44 (2005).
- Geetha-Habib,M., Noiva,R., Kaplan,H.A. & Lennarz,W.J. Glycosylation site binding protein, a component of oligosaccharyl transferase, is highly similar to three other 57 kd luminal proteins of the ER. *Cell* **54**, 1053-1060 (1988).
- Gekko,K. & Timasheff,S.N. Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. *Biochemistry* **20**, 4677-4686 (1981).
- Germeshausen,M., Schulze,H., Ballmaier,M., Zeidler,C. & Welte,K. Mutations in the gene encoding neutrophil elastase (ELA2) are not sufficient to cause the phenotype of congenital neutropenia. *Br. J. Haematol.* **115**, 222-224 (2001).
- Gilman,P.A., Jackson,D.P. & Guild,H.G. Congenital agranulocytosis: prolonged survival and terminal acute leukemia. *Blood* **36**, 576-585 (1970).
- Gossen,M. & Bujard,H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 5547-5551 (1992).
- Grenda,D.S. *et al.* Mice expressing a neutrophil elastase mutation derived from patients with severe congenital neutropenia have normal granulopoiesis. *Blood* **100**, 3221-3228 (2002).
- Gullberg,U. *et al.* Carboxyl-terminal prodomain-deleted human leukocyte elastase and cathepsin G are efficiently targeted to granules and enzymatically activated in the rat basophilic/mast cell line RBL. *J. Biol. Chem.* **270**, 12912-12918 (1995).
- Gullberg,U., Andersson,E., Garwicz,D., Lindmark,A. & Olsson,I. Biosynthesis, processing and sorting of neutrophil proteins: insight into neutrophil granule development. *Eur. J. Haematol.* **58**, 137-153 (1997).
- Gullberg,U. *et al.* Processing and targeting of granule proteins in human neutrophils. *J. Immunol. Methods* **232**, 201-210 (1999).
- Haro,H. *et al.* Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor-alpha in a model of herniated disc resorption. *J. Clin. Invest* **105**, 143-150 (2000).
- Helenius,A. & Aebi,M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-2369 (2001).
- Hendershot,L.M. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt. Sinai J. Med.* **71**, 289-297 (2004).

-
- Hitomi,J. *et al.* Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J. Cell Biol.* **165** , 347-356 (2004).
- Hooper,N.M., Karran,E.H. & Turner,A.J. Membrane protein secretases. *Biochem. J.* **321 (Pt 2)**, 265-279 (1997).
- Horwitz,M., Benson,K.F., Person,R.E., Aprikyan,A.G. & Dale,D.C. Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. *Nat. Genet.* **23**, 433-436 (1999).
- Hsiang,Y.H., Hertzberg,R., Hecht,S. & Liu,L.F. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **260**, 14873-14878 (1985).
- Hunter,M.G., Druhan,L.J., Massullo,P.R. & Avalos,B.R. Proteolytic cleavage of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor by neutrophil elastase induces growth inhibition and decreased cell surface expression of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Am. J. Hematol.* **74**, 149-155 (2003).
- Imai,Y. *et al.* An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* **105**, 891-902 (2001).
- Itani,T., Ariga,H., Yamaguchi,N., Tadakuma,T. & Yasuda,T. A simple and efficient liposome method for transfection of DNA into mammalian cells grown in suspension. *Gene* **56**, 267-276 (1987).
- Jensen,T.J. *et al.* Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* **83**, 129-135 (1995).
- Kalra,R. *et al.* Monosomy 7 and activating RAS mutations accompany malignant transformation in patients with congenital neutropenia. *Blood* **86**, 4579-4586 (1995).
- Karsunky,H. *et al.* Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nat. Genet.* **30**, 295-300 (2002).
- Katayama,T. *et al.* Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **1**, 479-485 (1999).
- Kaufman,R.J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J. Clin. Invest* **110**, 1389-1398 (2002).
- Kaup,M. *et al.* Processing of the human transferrin receptor at distinct positions within the stalk region by neutrophil elastase and cathepsin G. *Biol. Chem.* **383**, 1011-1020 (2002).
- Kawabata,K., Hagio,T. & Matsuoka,S. The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *Eur. J. Pharmacol.* **451**, 1-10 (2002).
- Koizumi,F. *et al.* Smoking accelerates absorption of inhaled neutrophil elastase inhibitor FK706. *Clin. Pharmacol. Ther.* **66**, 501-508 (1999).

- Kornfeld,R. & Kornfeld,S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631-664 (1985).
- Kostman,R. Infantile genetic agranulocytosis. A review with presentation of ten new cases. *Acta Paediatr. Scand.* **64**, 362-368 (1975).
- KOSTMANN,R. Infantile genetic agranulocytosis; agranulocytosis infantilis hereditaria. *Acta Paediatr.* **45**, 1-78 (1956).
- Laemmli,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- Lamande,S.R. & Bateman,J.F. Procollagen folding and assembly: the role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 455-464 (1999).
- Lazebnik,Y.A., Kaufmann,S.H., Desnoyers,S., Poirier,G.G. & Earnshaw,W.C. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**, 346-347 (1994).
- Le,C., V, Cowland,J.B., Calafat,J. & Borregaard,N. Targeting of proteins to granule subsets is determined by timing and not by sorting: The specific granule protein NGAL is localized to azurophil granules when expressed in HL-60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 6454-6457 (1996).
- Lee,A.S. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 504-510 (2001).
- Lee,W.L. & Downey,G.P. Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **164**, 896-904 (2001).
- Leffell,M.S. & Spitznagel,J.K. Association of lactoferrin with lysozyme in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* **6**, 761-765 (1972).
- Li,F.Q. & Horwitz,M. Characterization of mutant neutrophil elastase in severe congenital neutropenia. *J. Biol. Chem.* **276**, 14230-14241 (2001).
- Li,F.Q. *et al.* Lymphoid enhancer factor-1 links two hereditary leukemia syndromes through core-binding factor alpha regulation of ELA2. *J. Biol. Chem.* **279**, 2873-2884 (2004).
- Li,J.M. & Shah,A.M. Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 19952-19960 (2002).
- Lindmark,A., Persson,A.M. & Olsson,I. Biosynthesis and processing of cathepsin G and neutrophil elastase in the leukemic myeloid cell line U-937. *Blood* **76**, 2374-2380 (1990).
- Liou,T.G. & Campbell,E.J. Nonisotropic enzyme--inhibitor interactions: a novel nonoxidative mechanism for quantum proteolysis by human neutrophils. *Biochemistry* **34**, 16171-16177 (1995).

- Liu,C.Y. & Kaufman,R.J. The unfolded protein response. *J. Cell Sci.* **116**, 1861-1862 (2003).
- Lodish,H., Baltimore,D., Berk,A., Zipursky,S., Matsudaira,P. & Darnell,J. *Molekulare Zellbiologie*. **2. Auflage**, (1996).
- Lollike,K., Kjeldsen,L., Sengelov,H. & Borregaard,N. Lysozyme in human neutrophils and plasma. A parameter of myelopoietic activity. *Leukemia* **9**, 159-164 (1995).
- Ma,Y. & Hendershot,L.M. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J. Chem. Neuroanat.* **28**, 51-65 (2004).
- Massullo,P. *et al.* Aberrant subcellular targeting of the G185R neutrophil elastase mutant associated with severe congenital neutropenia induces premature apoptosis of differentiating promyelocytes. *Blood* **105**, 3397-3404 (2005).
- McElvaney,N.G. *et al.* Pharmacokinetics of recombinant secretory leukoprotease inhibitor aerosolized to normals and individuals with cystic fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**, 1056-1060 (1993).
- McGuire,M.J., Lipsky,P.E. & Thiele,D.L. Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I. *J. Biol. Chem.* **268**, 2458-2467 (1993).
- Morello,J.P. *et al.* Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J. Clin. Invest* **105**, 887-895 (2000).
- Mulders,S.M. *et al.* An aquaporin-2 water channel mutant which causes autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus is retained in the Golgi complex. *J. Clin. Invest* **102**, 57-66 (1998).
- Nakagawa,T. *et al.* Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**, 98-103 (2000).
- Nakajima,H. *et al.* All-trans and 9-cis retinoic acid enhance 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced monocytic differentiation of U937 cells. *Leuk. Res.* **20**, 665-676 (1996).
- Nakamura,H., Yoshimura,K., McElvaney,N.G. & Crystal,R.G. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J. Clin. Invest* **89**, 1478-1484 (1992).
- Nauseef,W.M., Olsson,I. & Arnljots,K. Biosynthesis and processing of myeloperoxidase--a marker for myeloid cell differentiation. *Eur. J. Haematol.* **40**, 97-110 (1988).
- Nauseef,W.M., McCormick,S. & Yi,H. Roles of heme insertion and the mannose-6-phosphate receptor in processing of the human myeloid lysosomal enzyme, myeloperoxidase. *Blood* **80**, 2622-2633 (1992).
- Nishitoh,H. *et al.* ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.* **16**, 1345-1355 (2002).

-
- Ota,K., Sakaguchi,M., Hamasaki,N. & Mihara,K. Membrane integration of the second transmembrane segment of band 3 requires a closely apposed preceding signal-anchor sequence. *J. Biol. Chem.* **275**, 29743-29748 (2000).
- Ott,C.M. & Lingappa,V.R. Integral membrane protein biosynthesis: why topology is hard to predict. *J. Cell Sci.* **115**, 2003-2009 (2002).
- Owen,C.A., Campbell,M.A., Sannes,P.L., Boukedes,S.S. & Campbell,E.J. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J. Cell Biol.* **131**, 775-789 (1995).
- Oyadomari,S. *et al.* Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J. Clin. Invest* **109**, 525-532 (2002).
- Paetzel,M., Karla,A., Strynadka,N.C. & Dalbey,R.E. Signal peptidases. *Chem. Rev.* **102** , 4549-4580 (2002).
- Peppin,G.J. & Weiss,S.J. Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**, 4322-4326 (1986).
- Person,R.E. *et al.* Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat. Genet.* **34**, 308-312 (2003).
- Plempner,R.K. & Wolf,D.H. Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 266-270 (1999).
- Rappeport,J.M., Parkman,R., Newburger,P., Camitta,B.M. & Chusid,M.J. Correction of infantile agranulocytosis (Kostmann's syndrome) by allogeneic bone marrow transplantation. *Am. J. Med.* **68**, 605-609 (1980).
- Ron,D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J. Clin. Invest* **110**, 1383-1388 (2002).
- Roddie,P.H., Paterson,T. & Turner,M.L. Gene transfer to primary acute myeloid leukaemia blasts and myeloid leukaemia cell lines. *Cytokines Cell Mol. Ther.* **6**, 127-134 (2000).
- Rohn,W.M., Rouille,Y., Waguri,S. & Hoflack,B. Bi-directional trafficking between the trans-Golgi network and the endosomal/lysosomal system. *J. Cell Sci.* **113** (Pt 12), 2093-2101 (2000).
- Rose-John,S. & Heinrich,P.C. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem. J.* **300** (Pt 2), 281-290 (1994).
- Rous,B.A. *et al.* Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1071-1082 (2002).
- Rutishauser,J. & Spiess,M. Endoplasmic reticulum storage diseases. *Swiss. Med. Wkly.* **132**, 211-222 (2002).

-
- Sallenne, J.M. *et al.* Secretory leukocyte proteinase inhibitor is preferentially increased in patients with acute respiratory distress syndrome. *Eur. Respir. J.* **13**, 1029-1036 (1999).
- Sandhaus, R.A. alpha1-Antitrypsin deficiency . 6: new and emerging treatments for alpha1-antitrypsin deficiency. *Thorax* **59**, 904-909 (2004).
- Sawano, H. *et al.* Efficient in vitro folding of the three-disulfide derivatives of hen lysozyme in the presence of glycerol. *FEBS Lett.* **303**, 11-14 (1992).
- Schiller, M. *et al.* [Cyclic neutropenia. Detection of a mutation in the gene for neutrophil elastase (ELA2)]. *Hautarzt* **52**, 790-796 (2001).
- Schwinzer, R., Schraven, B., Kwas, U., Meuer, S.C. & Wonigeit, K. Phenotypical and biochemical characterization of a variant CD45R expression pattern in human leukocytes. *Eur. J. Immunol.* **22**, 1095-1098 (1992).
- Sengelov, H., Kjeldsen, L. & Borregaard, N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J. Immunol.* **150**, 1535-1543 (1993).
- Senior, R.M. *et al.* Elastase of U-937 monocytelike cells. Comparisons with elastases derived from human monocytes and neutrophils and murine macrophagelike cells. *J. Clin. Invest* **69**, 384-393 (1982).
- Shockett, P., Difilippantonio, M., Hellman, N. & Schatz, D.G. A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 6522-6526 (1995).
- Simpson, F., Peden, A.A., Christopoulou, L. & Robinson, M.S. Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J. Cell Biol.* **137**, 835-845 (1997).
- Sinha, S. *et al.* Primary structure of human neutrophil elastase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**, 2228-2232 (1987).
- Skold, S., Rosberg, B., Gullberg, U. & Olofsson, T. A secreted proform of neutrophil proteinase 3 regulates the proliferation of granulopoietic progenitor cells. *Blood* **93**, 849-856 (1999).
- Sodeik, B., Ebersold, M.W. & Helenius, A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* **136**, 1007-1021 (1997).
- Stromatt, S.C. Secretory leukocyte protease inhibitor in cystic fibrosis. *Agents Actions Suppl* **42**, 103-110 (1993).
- Takahashi, H. *et al.* Structure of the human neutrophil elastase gene. *J. Biol. Chem.* **263**, 14739-14747 (1988).
- Tamarappoo, B.K. & Verkman, A.S. Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones. *J. Clin. Invest* **101**, 2257-2267 (1998).

-
- Travers,K.J. *et al.* Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**, 249-258 (2000).
- Trevani,A.S. *et al.* Neutrophil apoptosis induced by proteolytic enzymes. *Lab Invest* **74**, 711-721 (1996).
- Valore,E.V. & Ganz,T. Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. *Blood* **79**, 1538-1544 (1992).
- Varki,A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97-130 (1993).
- Vender,R.L. Therapeutic potential of neutrophil-elastase inhibition in pulmonary disease. *J. Investig. Med.* **44**, 531-539 (1996).
- Ward,C.L., Omura,S. & Kopito,R.R. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **83**, 121-127 (1995).
- Welte,K. *et al.* Differential effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in children with severe congenital neutropenia. *Blood* **75**, 1056-1063 (1990).
- Werner,E.D., Brodsky,J.L. & McCracken,A.A. Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 13797-13801 (1996).
- Wewers,M.D., Herzyk,D.J. & Gadek,J.E. Alveolar fluid neutrophil elastase activity in the adult respiratory distress syndrome is complexed to alpha-2-macroglobulin. *J. Clin. Invest* **82**, 1260-1267 (1988).
- Witko-Sarsat,V. *et al.* Presence of proteinase 3 in secretory vesicles: evidence of a novel, highly mobilizable intracellular pool distinct from azurophil granules. *Blood* **94**, 2487-2496 (1999).
- Zhang,K. & Kaufman,R.J. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **279**, 25935-25938 (2004).
- Zimmer,M. *et al.* Three human elastase-like genes coordinately expressed in the myelomonocyte lineage are organized as a single genetic locus on 19pter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 8215-8219 (1992).
- Zinszner,H. *et al.* CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* **12**, 982-995 (1998).

5.2 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| α | anti bei Antikörper-Angaben |
| Amp ^R | Resistenzgen gegen Ampicillin |
| AP3 | Adaptorprotein-Komplex 3 |
| APS | Ammoniumperoxydisulfat |
| AS | Aminosäure |
| BIP | <i>Immunglobulin binding protein</i> |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| C | carboxy-terminales Ende eines Proteins |
| CBF α | <i>Core-binding Factor α</i> |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> |
| CMV | Cytomegalie-Virus |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CPT | Camptotecin |
| CR3 | Mac-1 |
| Cy2 | Carbocyanin 2 |
| CyN | <i>cyclic neutropenia</i> |
| DABCO | 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DPP I | Dipeptidyl Peptidase I |
| ECL | <i>Enhanced chemoluminescence</i> |
| ELA2 | Humane Neutrophile Elastase Gen |
| ELISA | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> |
| Endoglykosidase F | N-Glycosidase F (Peptide-N ⁴ -(N-acetyl- β -D-glucosaminyl)) |
| Endoglykosidase H | Endo- β -N-acetylglucosaminidase H aus <i>Streptomyces</i> |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ERAD | ER-assozierte Degradation |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherischia coli</i> |
| FACS | <i>Fluorescence activated cell sorter</i> |
| FBS | <i>fetal bovine serum</i> |
| FKS | fetales Kälberserum |
| HNE | Humane Neutrophile Elastase Protein |
| HPS2 | Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 2 |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| Hyg ^R | Resistenzgen gegen Hygromyzin |
| IgG1 | Immunglobulin G1 |
| +ind | induzierte U937T Zellen (-Tetrazyklin) |
| -ind | nicht-induzierte U937T Zellen (+Tetrazyklin) |
| KBE | Kolonie-bildende Einheiten |
| kD | Kilodalton |
| LB | Luria-Bertani |
| LEF-1 | <i>Lymphoid enhancer Factor-1</i> |
| LTR | <i>long terminal repeat</i> |
| MKS | multiple Klonierungsstelle |
| MT | mutant |
| N | amino-terminales Ende eines Proteins |

| | |
|------------------|--|
| Neo ^R | Resistenzgen gegen Neomycin |
| NIH | <i>National Institutes of Health</i> |
| n.u. | nicht untersucht |
| OD | optische Dichte |
| PARP-1 | Poly (ADP-ribose) Polymerase-1 |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PBST | <i>phosphate buffered saline with Tween</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PDAR | <i>predeveloped Taqman assay reagents</i> |
| PE | Phycoerythrin |
| P.G.S. | Protein-G-Sepharose-Lösung in PBS |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| RBL | Ratten-Basophile-Leukämie Zelllinie |
| r-HuG-CSF | <i>recombinant human granulocyte colony-stimulating factor</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | <i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i> |
| RRX | Rhodamine Red X |
| RW | Rückwärts bei Primerangaben |
| SCN | <i>severe congenital neutropenia</i> |
| SDS- PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| SLPI | <i>secretory leukocyte protease inhibitor</i> |
| Taq | <i>Thermophilus aquaticus</i> |
| Tm | Tunicamycin |
| TMD | Transmembrandomäne |
| TRE | <i>tetracycline response element</i> |
| TRITC | Tetramethylrhodaminisothiozyanat |
| tTA | <i>tetracycline-controlled transactivator protein</i> |
| U | <i>Units</i> |
| UPM | Umdrehungen pro Minute |
| UPR | <i>Unfolded Protein Response</i> |
| UV | Ultraviolettes Licht |
| VSV-G | <i>vesicular stomatitis virus</i> |
| VW | Vorwärts bei Primerangaben |
| WT | Wildtyp |
| X | beliebige Aminosäure |

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Vorname Inga
Name Köllner
Anschrift Garkenburgstraße 50
30519 Hannover
Geburtsdatum/-ort 30.05.1976 in Danzig/ Polen

Schulbildung

1989-1996 Bismarckgymnasium in Hannover
Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

1996-2002 Studium der Biologie an der Universität Hannover

2001-2002 **Diplomarbeit**
Institut für Physiologische Chemie,
Tierärztliche Hochschule Hannover
Betreuung: Prof. Dr. H. Naim

Thema: **Herstellung und Analyse von sekretorischen und membranständigen Formen des Galactose-bindenden Proteins Galectin-3**

2002-2004 **Promotion**
Institut für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie,
Medizinische Hochschule Hannover
Betreuung: Prof. Dr. K. Welte, Dr. C. Beger

2004-2005 Institut für Zell- und Molekularpathologie,
Medizinische Hochschule Hannover
Betreuung: Prof. Dr. B. Schlegelberger, Dr. C. Beger

Thema: **Untersuchungen zur Relevanz von Mutationen der Humanen Neutrophilen Elastase bei kongenitalen Neutropenien**

Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Prof. Brigitte Schlegelberger für die spontane Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen. Insbesondere möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit an ihrem Institut zum Abschluss bringen zu dürfen. Dies erlaubte mir, diese herausragende Arbeitsgruppe kennen zu lernen. Der Erfolg und die sehr gute Atmosphäre des Institutes für Zell- und Molekularpathologie sind nicht zuletzt aufgrund der stets offenen Tür von Prof. Schlegelberger möglich. Das Engagement der Mitarbeiter lässt die Arbeitsgruppe wie ein „Uhrwerk“ erscheinen, wo ein Rädchen ins andere greift. Dies macht die Arbeit an diesem Institut so unvergleichbar.

Ganz besonders herzlich möchte ich bei Dr. Carmela Beger für die wertvolle fachliche Betreuung sowie für die organisatorische und persönliche Einbindung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken. Sie unterstützte unermüdlich dieses Projekt, sei es durch immer neue Ideen, strukturierte Kritiken, Hilfe bei Auswertungen oder anregende Diskussionen. Die Kombination aus ihrem Engagement und dem notwendigen wissenschaftlichen Freiraum, ermöglichte mir, die Dissertation in dieser Form anzufertigen.

Bei Prof. Karl Welte möchte ich mich für die Überlassung dieser sehr interessanten Aufgabenstellung, seiner ständigen Diskussionsbereitschaft und der Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Prof. Walter Müller danke ich herzlich für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit. Die Gewissheit, sich jederzeit an ihn wenden zu können, steuerte wesentlich dazu bei, meine Dissertation etwas entspannter schreiben zu können.

Ich bedanke mich ganz, ganz herzlich bei allen Patienten, die an dieser Studie teilgenommen haben. Ihr Glaube und Hoffnung an die Forschung motivierte mich immer und immer wieder.

Mein Dank gebührt auch Dr. Beate Sodeik für eine Kooperation, wie man sie sich nicht besser wünschen kann. Insbesondere bedanke ich mich für ihre stetige Gesprächsbereitschaft und wichtige Hinweise bei der Interpretation der Immunfluoreszenzen.

Dr. Rudi Bauerfeind danke ich für die Hilfe bei Problemen am Konfokalen und die ständige Diskussion, ist es nun eins oder nicht... Mein Dank gilt auch Dr. Cornelia Zeidler und Dr. Beate Schwinzer für die Koordination der Blutentnahmen bei Patienten; Dr. Christian Kardinal und Dr. Marc Dangers für die Bereitstellung von Antikörpern, Arbeitsplatz und immer, immer wieder des Douncers sowie den Eders, Scheers, Baums und Kleins für die selbstverständliche Überlassung eines Arbeitsplatzes und Hilfe beim FACS.

Allen Mitarbeitern und Studenten der Arbeitsgruppen Welte, Klein und Tümmler danke ich für die gemeinsamen 2 Jahre Seite an Seite, in guten wie in schlechten Tagen.

Meinen herzlichen Dank möchte ich an alle Kollegen des Instituts für Zell- und Molekularpathologie für die sehr freundliche Aufnahme unserer Arbeitsgruppe am Institut aussprechen. Das große Engagement aller Arbeitskollegen, verbunden mit stetiger,

gegenseitiger Hilfsbereitschaft sowie das freundschaftliche Arbeitsklima, ermöglichten eine optimale Zusammenarbeit.

Die Zeit meiner Doktorarbeit war nicht frei von Tagen, an denen ich am liebsten alles hinter mir gelassen hätte. Doch an diesen Tagen stand eine Vielzahl an Menschen hinter mir, die mir wieder Mut zugesprochen habe und mich aufs Neue motivieren konnten. Diesen Menschen gilt mein ganz besonderer Dank.

Sabine Schreek, die mir bei der Ausführung vieler, vieler Arbeiten beispielweise Immunfluoreszenzen, ELISAs und jeder Menge Blots geholfen hatte. Ihre große Lebenserfahrung, gepaart mit manchmal schreeken Humor, ließ vieles wieder relativieren. Diskussionen mit ihr öffneten die Augen für das Wichtige und bewegten zum Nachdenken. Anja Vietmeyer, die gute Seele des Labors; meine Freundin, die immer einen guten Ratschlag bereit hatte; die auch nicht scheute, einem mal den Kopf zu waschen und mit ihrer Ruhe und Ausgeglichenheit für Harmonie im Labor sorgte. Miriam Ball und Sabine Außenhofer, die diese 3 Jahre unvergesslich prägten. Man denke nur an „den richtigen Anschlag der Pipette“... Holger Heyn insbesondere für seine gute Laune. Auch sehr herzlichen Dank an Claudia, Holgers bessere Hälfte, für die prompte Korrektur dieser Arbeit. Die Schreeks, die Viets, die Holfs, die Balls und die Kö's als interne SI-Einheiten werden in meinen täglichen Sprachgebrauch übergehen. Die Zusammenarbeit mit Euch hat mich inspiriert und war für mich eine sehr große Bereicherung.

Bei allen meinen Freunden und meinen Geschwistern bedanke ich mich für ihr Verständnis, für die kleinen und großen Hilfeleistungen und ihre Freundschaft. Meinen Eltern, die mir diesen Weg so selbstverständlich ermöglicht haben, möchte ich Danke sagen.

Ich danke Maik, meinem Mann, für seine großartige Unterstützung und seine Liebe.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zur Relevanz von Mutationen der Humanen Neutrophilen Elastase bei kongenitalen Neutropenien“ eigenständig verfasst und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere an Eides Statt, dass diese Dissertation nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie und am Institut für Zell- und Molekularpathologie der Medizinischen Hochschule Hannover in der Zeit von Juli 2002 bis Dezember 2005 durchgeführt.

Hannover, im Dezember 2005

Inga Köllner