



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Regulation der endothelialen Interleukin-8-Produktion durch
Proteinase 3 und Elastase**

Autor: Stefan P. Berger
Einrichtung: V. Medizinische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. F. J. van der Woude

Proteinase 3 (PR 3) ist das wichtigste Zielantigen der antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörper bei der Wegnerschen Granulomatose. Das Enzym ist eine 29 kD Serinprotease und wird in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten gespeichert. Es besteht eine ausgeprägte Homologie mit den Enzymen Elastase und Cathepsin G. Aufgrund seiner enzymatischen Aktivität kann PR 3 kultivierte Endothelzellen lysieren und verursacht ein Lungenemphysem, wenn es in Hamsterlungen instilliert wird. Weiterhin kann es zusammen mit einer Schwellenkonzentration von Cathepsin G Thrombozyten aktivieren.

Die Wegnersche Granulomatose ist eine nekrotisierende granulomatöse Vaskulitis, die vor allem die Atemwege und Nieren befällt. Die Histologie der akuten Läsion der Erkrankung wird durch die Infiltration von neutrophilen Granulozyten geprägt. Der überwiegende Anteil der Patienten hat antineutrophile cytoplasmatische Antikörper (cANCA), die im ELISA eine Spezifität für PR 3 aufzeigen. Es ist wahrscheinlich, daß PR 3 eine Bedeutung bei der Pathogenese der Wegnerschen Granulomatose hat.

Interleukin-8 (IL-8) ist ein Chemokin der C-X-C Familie und wird unter anderem durch Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen und Fibroblasten produziert. Ein wichtiger Angriffspunkt des Chemokins sind neutrophile Granulozyten. Die wesentlichen biologischen Wirkungen von IL-8 auf Granulozyten beinhalten die Förderung der Chemotaxis, die Stimulation der Expression von Adhäsionsmolekülen und die Aktivierung mit Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Granula.

Es ist bekannt, daß die neutrophile Elastase die IL-8-Produktion durch Bronchialepithelzellen stimulieren kann. Daher interessierte uns die Frage, ob die Enzyme der neutrophilen α -Granula Elastase, Cathepsin G und insbesondere PR 3 die IL-8 Produktion durch Endothelzellen stimulieren und auf diese Weise zu einer Verstärkung einer Entzündung beitragen können.

Um diese Fragestellung beantworten zu können, kultivierten wir humane Nabelschnurendothelzellen und behandelten diese mit verschiedenen Konzentrationen hochgereinigter PR 3, neutrophiler Elastase und Cathepsin G. Die Versuche wurden sowohl mit aktiven als auch mit inaktivierten Enzymen durchgeführt. Die IL-8-Konzentration im Überstand wurde mit einem ELISA bestimmt. In einem zusätzlichem Versuch wurde der Einfluß von PR 3 auf die MCP-1 (monocyte chemoattractant protein)-Produktion untersucht.

Um die *de novo*-Synthese von IL-8 zu untersuchen, hemmten wir die Translation mit Cycloheximid und führten Northern Blots mit Proteinase 3 behandelten Endothelzellen durch.

Sowohl die Anwesenheit von PR3 wie auch die von Elastase führte zu einer Verstärkung der IL-8-Produktion durch Endothelzellen. Optimale Konzentrationen an PR 3 führten zu einer 15,6-fachen Steigerung der IL-8-Produktion. Elastase führte zu einer 4,2-fachen Steigerung. Cathepsin G hatte keinen Einfluß auf die Produktion von IL-8. Die Zugabe von PR 3 führte ebenfalls zu einem dosisabhängigen bis zu 2,6-fachen Anstieg der MCP-1-Produktion.

Obwohl die Zugabe von α 1-Antitrypsin die Elastase vermittelte IL-8 Produktion vollständig blockierte, hatte α 1-Antitrypsin keinen signifikanten Einfluß auf die PR 3 vermittelte IL-8-Produktion. Sowohl die durch PR 3 als auch die durch Elastase gesteigerte IL-8 Produktion konnte durch die Zugabe von Cycloheximid blockiert werden. Im Northern Blot konnte eine erhöhte endotheliale IL-8-m-RNA-Expression nach Stimulation mit PR 3 nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß die neutrophile Elastase und PR 3 die IL-8 *de novo* Synthese durch Endothelzellen steigern können. Im Gegensatz zu Elastase übt PR 3 diese Wirkung unabhängig von seiner enzymatischen Funktion aus. Die Mechanismen, wodurch diese Enzyme die Chemokinproduktion durch Endothelzellen steuern, sind bisher nicht bekannt.

Wir postulieren, daß die lysozymalen Enzyme PR 3 und Elastase durch die Stimulation der endothelialen IL-8-Synthese zu einem sich selbst verstärkenden Entzündungsprozeß beitragen. Hierbei führt die Freisetzung dieser Enzyme zur erhöhten Freisetzung von IL-8 durch Endothelzellen. Dieses könnte zu einer verstärkten Chemotaxis, Adhäsion und Aktivierung der neutrophilen Granulozyten führen, was wiederum in einer fortgesetzten Freisetzung von PR 3 und Elastase münden würde.

Über die Bedeutung dieser Ergebnisse für die Pathogenese der Wegnerschen Granulomatose kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden. Es wird interessant sein, den Einfluß von anti-PR 3-Antikörpern auf die PR 3 vermittelte IL-8 Produktion zu untersuchen.