

# Räumlich aufgelöste Analyse der Aktivität der Neutrophilene lastase mit ratiometrischen Fluoreszenzsonden\*\*

Stefanie Gehrig, Marcus A. Mall und Carsten Schultz\*

Neutrophilene lastase (NE) ist eine Serinprotease mit wichtigen Funktionen, die unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen vorwiegend von Neutrophilen sekretiert wird. Dies führt zum Umbau der extrazellulären Matrix und dient der Abwehr bakterieller Infektionen.<sup>[1,2]</sup> Bei Krankheiten mit chronischer Neutrophilen-basierter Entzündung, wie der Zigarettenrauch-induzierten chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease; COPD) oder der Lungenkrankheit bei Mukoviszidose (Cystische Fibrose, CF), wird übermäßige NE-Aktivität für die proteolytische Schädigung der Atemwegs- und Lungengewebe und die Entwicklung von Bronchiektasen und Emphysem verantwortlich gemacht. Dies führt letztlich zu Lungenversagen und Tod.<sup>[3-7]</sup> Tatsächlich sind NE-defiziente Mäuse weniger empfindlich gegen Zigarettenrauch.<sup>[3]</sup> Die entscheidende Rolle des Protease/Antiprotease-Gleichgewichts wird auch bei Patienten deutlich, denen der wichtige endogene NE-Inhibitor α1-Antitrypsin (A1AT) fehlt: Sie entwickeln sehr früh ein Lungenemphysem,<sup>[8]</sup> was darauf schließen lässt, dass die korrekte Regulation der NE-Aktivität von großer Wichtigkeit für die allgemeine Lungenhomöostase ist. In Neutrophilen ist NE in der aktiven Form in azurophilen Granula gespeichert und wird nach Stimulation freigesetzt.<sup>[1]</sup> Die lokale Enzymaktivität in direkter Nähe der Zellmembran wird für die Neutrophilenwanderung zum

Entzündungsherd benötigt. Es kann daher spekuliert werden, dass Membran-assoziierte NE für die Neutrophilenwanderung verantwortlich ist und dass sekretierte NE im Atemwegslumen blockiert ist, um die Lunge vor unkontrollierter Proteolyse zu schützen.<sup>[6]</sup> Daher ist es wesentlich, die Aktivitätsverteilung der NE zwischen der Zelloberfläche und dem löslichen Anteil zu verstehen.

Bisher konzentrierten sich die Untersuchungen zur Rolle der NE bei chronischen Lungenerkrankungen auf die Aktivität der löslichen NE-Variante,<sup>[4,5,9]</sup> die üblicherweise mit dem chromophoren Substrat NMeOSuc-AAPV-pNA oder seiner fluoreszierenden Variante gemessen wird. Im Menschen zeigen diese eine gute Selektivität gegenüber der strukturell ähnlichen Proteinase 3 (PR3),<sup>[10,11]</sup> allerdings ist die Spezifität für die Mausvarianten der Enzyme gering.<sup>[12]</sup> Auch liegt die Detektionsgrenze der Assays im nanomolaren Bereich und ist damit nicht ausreichend empfindlich für die Untersuchung biologischer Proben wie bronchoalveolärer Lavagen (BAL).<sup>[4]</sup> Mehrere Berichte zeigten eine Membran-gebundene Form der NE,<sup>[13,14]</sup> die wahrscheinlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen der positiv geladenen Enzymoberfläche beruht.<sup>[15]</sup> Unseres Wissens wurde bisher die Rolle dieser Membran-assoziierten Enzymfraktion nicht eingehend untersucht.

Um Proteaseaktivitäten in der komplexen Umgebung intakter Zellen und Geweben von Versuchstieren und Patienten zuverlässig messen zu können, sind hohe Spezifität und Empfindlichkeit der Sonde unerlässlich. Wir wählten daher eine längere Peptidsequenz, die auf beiden Seiten der zu spaltenden Bindung in die Bindungstasche der Maus- wie auch der humanen NE passt,<sup>[16]</sup> mit dem Ziel, eine verbesserte NE-Detektion im Mausmodell zu erreichen. Die neue NE-Sonde wurde außerdem lipidiert, um wie zuvor bei Matrixmetalloproteinase 12 (MMP12) die Enzymaktivität auf Zellmembranen messen zu können.<sup>[17]</sup> Messungen auf Zelloberflächen geben Information über lokale Aktivitäten und haben den Vorteil, das Signal zu akkumulieren. Dadurch werden geringere Sondenkonzentrationen benötigt, was bei klinischen Anwendungen wichtig ist.

Zwei spezifische ratiometrische auf Energietransfer basierende Sonden zur Messung der NE-Aktivität wurden synthetisiert: NEMo-1 zur Detektion der Aktivität des löslichen Enzyms und die lipidierte Variante NEMo-2 für Messungen an der Plasmamembran. Wir wählten die Peptidsubstratsequenz QPMAVVQSVVPQ mit der spezifischen Spaltstelle zwischen den Valinresten, die sowohl von Maus- als auch von humaner NE erkannt wird.<sup>[16]</sup> Beide Sonden wurden mit rekombinanter Maus-NE oder isolierter humaner NE getestet, wobei NEMo-1 in Puffer und NEMo-2 auf Liposomen wie auch in Zellkultur untersucht wurde. Um die Verwendung in

[\*] S. Gehrig, Priv.-Doz. Dr. C. Schultz<sup>[+]</sup>  
Cell Biology and Biophysics Unit, EMBL  
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)  
E-Mail: schultz@embl.de

Prof. Dr. M. A. Mall<sup>[+]</sup>  
Abteilung Translationale Pneumologie und Sektion Pädiatrische Pulmonologie & Allergie- und Mukoviszidosezentrum, Pädiatrie III, Universität Heidelberg  
69120 Heidelberg (Deutschland)

S. Gehrig, Prof. Dr. M. A. Mall,<sup>[+]</sup> Priv.-Doz. Dr. C. Schultz<sup>[+]</sup>  
MMPU und Translationales Zentrum für Lungenforschung Heidelberg (TLRC-H), Mitglied des Deutschen Zentrums für Lungenforschung, Universität Heidelberg  
69120 Heidelberg (Deutschland)

[+] Diese Autoren trugen als Hauptautoren zu gleichen Teilen bei.

[\*\*] Wir danken für die exzellente technische Unterstützung von Stefanie Hirtz, Jolanthe Schatterny und Heike Stichnoth sowie der zentralen Mikroskopieeinheit des EMBL (ALMF). C.S. dankt für die Förderung von LIVIMODE, einem gemeinschaftlichen FP7-Projekt der EU. M.A.M. dankt für die Förderung durch die DFG (MA 2081/4-1 und MA 2081/3-2). S.G. ist Doktorandin in der Molecular Medicine Partnership Unit (MMPU), finanziert vom EMBL und der Universität Heidelberg.

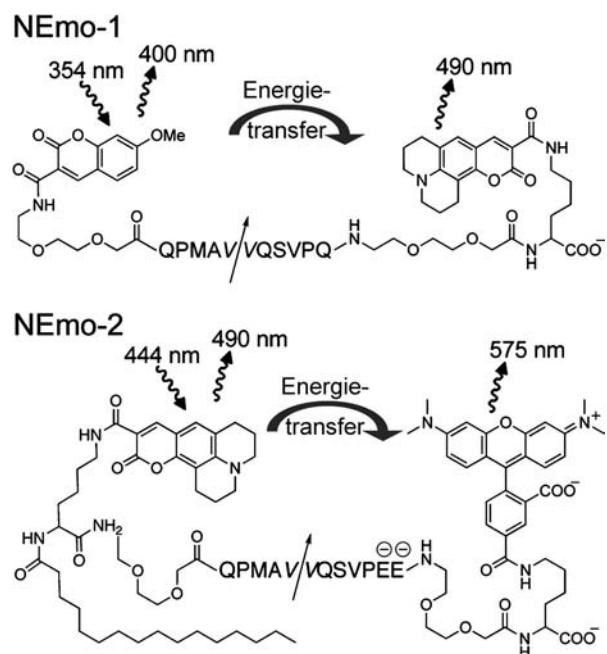
 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (detaillierte experimentelle Vorschriften und die Peptidsynthese) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201109226> zu finden.

komplexen biologischen Proben zu demonstrieren, wurde ein Mausmodell für akute Neutrophilen-basierte Lungenentzündung verwendet. Lungenspülflüssigkeit (Lavage) und Neutrophile wurden aus BAL gewonnen, um NEMo-1 oder NEMo-2 zur Messung der NE-Aktivität einzusetzen.

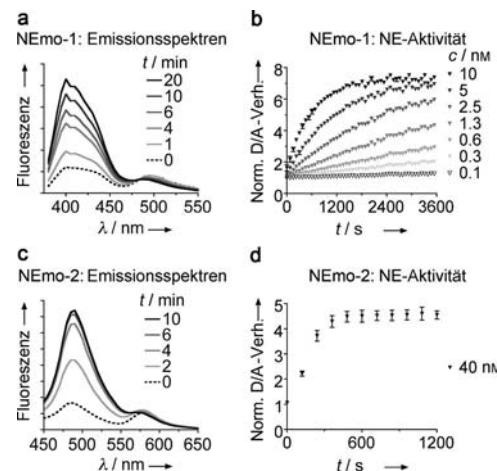
Die komplette Synthese beider Sonden wurde vollständig mithilfe typischer 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-basierter Festphasenpeptidsynthese durchgeführt. Für die lösliche Variante NEMo-1 wurde die Substratsequenz QPMAVVQSVVPQ zuerst an beiden Seiten um Polyethylen-glycol(PEG)-Linker erweitert, mit dem Ziel, die Löslichkeit zu erhöhen und größere Abstände zu den Fluorophoren zu erzeugen. Um das Energietransferpaar zu bilden, wurden die Seitenketten von N- und C-terminal angeknüpften Lysinen mit Methoxycumarin bzw. Cumarin343 umgesetzt. Basierend auf unseren Erfahrungen mit der MMP12-Sonde LaRee5 wurden Cumarinfarbstoffe gewählt,<sup>[17]</sup> da sie üblicherweise keine nichtfluoreszierenden Komplexe bilden. Für NEMo-2, das auf Zelloberflächen verwendet werden soll, wurde das längerwellige Fluorophorpaar aus Cumarin343 und dem Rhodamin-Fluoreszenzfarbstoff TAMRA gewählt, da dies die Zellschädigung durch UV-Licht vermindert und die Anregung mit dem bei Fluoreszenzmikroskopen üblichen 405-nm-Laser ermöglicht. Zur Kupplung von Palmitinsäure als Lipidanker wurde ein zusätzlicher Lysinrest am N-Terminus eingeführt. Die Diffusion der intakten Sonde oder des C-terminalen Fragments nach Enzymspaltung über die Plasmamembran wurde durch Einführung negativer Ladung verhindert, indem Glutamin am C-Terminus durch zwei Glutamate ersetzt wurde (Schema 1). Die Wahl zweier Fluorophore anstelle eines Fluorophors und eines Löschers ermöglicht die ratiometrische Erfassung der Sondenhydrolyse. Ferner kann für die lipidierte Sonde NEMo-2 die Spaltung auch mithilfe direkter Akzeptoranregung gesteuert werden.

Zur weiteren Verringerung unspezifischer Hydrolyse der Sonden durch andere Proteasen wurden Sonden mit einer verkürzten NE-Substratsequenz hergestellt, die ausschließlich die Erkennungssequenz P4-P4'<sup>[18]</sup> trugen. Allerdings zeigten diese Sonden eine verminderte Affinität für NE. Dieser Effekt wurde auch für Sondenvarianten ohne PEG-Linker gefunden. Dies deutet darauf hin, dass genügend Abstand zwischen den Fluorophoren und dem aktiven Zentrums des Enzyms nötig ist, um die Erkennungssequenz korrekt einpassen zu können.

NEMo-1 zeigte in der intakten Form einen sehr starken Donorlöscheffekt. Enzymatische Spaltung der Sonde führte zu einem starken Anstieg der Donorfluoreszenz und einem kleinen Abfall der Akzeptorfluoreszenz. Dies lässt darauf schließen, dass der Akzeptor vorwiegend als Löscher wirkt. Die Sondenhydrolyse wurde durch die Änderung des Emissionsverhältnisses über die Zeit berechnet (Abbildung 1a,b). NEMo-1 detektierte Maus und humane NE-Aktivität im subnanomolaren Bereich (Tabelle 1) mit Detektionsgrenzen ähnlichen zum fluoreszierenden Standardsubstrat NMeOSuc-AAPV-AMC (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen (SI)). Zudem ist das ratiometrische Signal von NEMo-1 und NEMo-2 weitgehend unabhängig von der Sondenkonzentration und anderen äußeren Einflüssen. NEMo-1 zeigte eine etwa 35-fache Spezifität für humane NE gegenüber der



**Schema 1.** Durch Festphasensynthese hergestellte lösliche (NEMo-1) und membransuchende lipidierte Fluoreszenzsonde (NEMo-2) zur Messung von Neutrophilenelastase (NE). Die NE-spezifische peptidische Erkennungssequenz ist im Einbuchstabencode der Aminosäuren gezeigt. Zwei negative Ladungen wurden in NEMo-2 eingeführt, um die Internalisierung von der Zellmembran zu verhindern. Pfeile zeigen die Hydrolysestelle.



**Abbildung 1.** Hydrolyse der NE-Sonden in vitro. a) Änderung des Emissionsspektrums von NEMo-1 nach Zugabe von NE. b) Dosis-abhängige NE-Aktivität, gemessen mit NEMo-1. Hydrolyse ist als Änderung des Donor/Akzeptor(D/A)-Emissionsverhältnisses (Methoxycumarin,  $\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$ , Cumarin343,  $\lambda_{\text{max}} = 490 \text{ nm}$ , normiert auf Kontrolle (kein Enzym)) gezeigt. c) Änderung des Emissionsspektrums von NEMo-2 auf Liposomen nach Zugabe von NE. d) Hydrolyse von NEMo-2 auf Liposomen ist als normiertes D/A-Emissionsverhältnis (Cumarin343,  $\lambda_{\text{max}} = 490 \text{ nm}$ ; TAMRA,  $\lambda_{\text{max}} = 575 \text{ nm}$ ) nach Zugabe von 40 nm NE zeitabhängig aufgetragen.

strukturell eng verwandten Proteinase 3 (PR3) (Abbildung S2b (SI)). Dies ähnelt den Befunden von Kalupov et al. für die Enzyme aus Mäusen.<sup>[16]</sup> Auch wurde eine gute Spezifität gegenüber einer Serie von entzündungsrelevanten Maus-

**Tabelle 1:** Hydrolyseverhalten von NEMo-1.

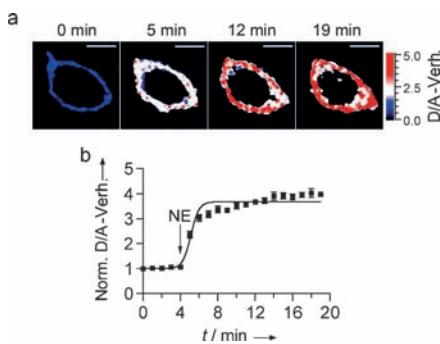
anfängliches D/A-Verhältnis	maximales D/A-Verhältnis	$FRET_{eff}^{[a]}$	Dektionsgrenze [nm] rmNE[b]	HNE[c]
1.0–1.2 <sup>[d]</sup>	7.5–9.5 <sup>[d]</sup>	0.86	ca. 0.1	ca. 0.02

[a] Effektiver resonanter Fluoreszenzenergietransfer. [b] Rekombinantes Enzym; Aktivität abhängig von der Aktivierung durch CathC, weshalb eine unvollständige Aktivierung wahrscheinlich ist. [c] HNE = humane NE. [d] Abhängig vom verwendeten Puffer.

und humanen Matrixmetalloproteasen gefunden (Abbildung S2c (SI)).

Das Verhalten der lipidierten Sonde NEMo-2 wurde auf Liposomen getestet, die aus einer Phosphatidylcholin/Phosphatidylserin(PC/PS)-Lipidmischung durch Extrusion gewonnen wurden (Abbildung 1c,d). Während NEMo-2 auf Liposomen das erwartete Signal gab, wurden unbefriedigende Ergebnisse in Puffer erzielt. Dies ist wahrscheinlich auf die schlechte Löslichkeit von TAMRA und/oder Aggregation der lipidierten Probe zurückzuführen (Abbildung S3 (SI)).

Für den Einsatz von NEMo-2 im intakten Zellmodell wurden RAW-Makrophagen aus Zellkultur (diese exprimieren selbst keine NE) mit der Sonde inkubiert. Donorfluoreszenz und sensibilisierte Akzeptoremission wurden fluoreszenzmikroskopisch gemessen. NEMo-2 lokalisierte ausschließlich an der Plasmamembran. Nach Zugabe von NE wurde ein starker Anstieg des D/A-Emissionsverhältnisses (ca. 4-fach) beobachtet (Abbildung 2). Anders als im Fall der MMP12-Sonde LaRee1<sup>[17]</sup> wurde innerhalb von vier Stunden keine Internalisierung des lipidierten Spaltprodukts gefunden.

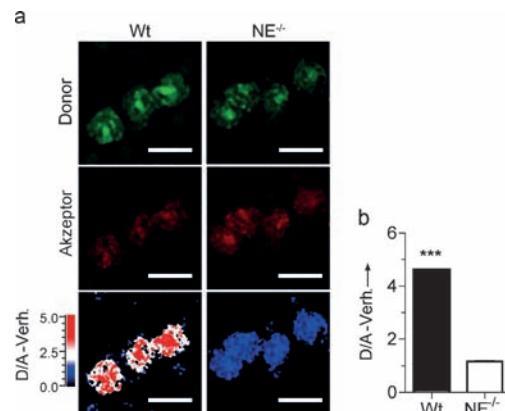


**Abbildung 2.** Hydrolyse von NEMo-2 auf kultivierten RAW-Makrophagen. Die Zellen wurden 2 min mit NEMo-2 inkubiert und gewaschen. Nach 4 min wurde NE zugegeben. a) Konfokale ratiometrische D/A-Bilder. Blau = niedriges D/A-Verhältnis, NEMo-2 intakt; rot = hohes D/A-Verhältnis, Signal der gespaltenen Sonde NEMo-2. b) Berechnete D/A-Verhältnisse wurden auf den Startwert normiert und zeitabhängig aufgetragen. Pfeil zeigt die Zugabe von NE. Skalierungsbalken = 10 µm.

Danach wurden NEMo-1 und NEMo-2 an einem Mausmodell für akute neutrophile Lungenentzündung getestet. Wildtyp(Wt)- und NE-defiziente (NE<sup>-/-</sup>) Mäuse wurden per intratrachealer Instillation von Lipopolysaccharid (LPS) vier Stunden behandelt, und anschließend wurde eine BAL

durchgeführt.<sup>[19,20]</sup> Die BAL wurde in Überstand und Zellfraktion getrennt. Letztere enthielt ca. 85 % Neutrophile (Abbildung S4 (SI)). Die Untersuchung der elastolytischen Aktivität mit NEMo-1 im BAL-Überstand, die repräsentativ für die des Atemwegslumen ist, zeigte keine NE-Aktivität in Wt- und NE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Tatsächlich inhibierte der BAL-Überstand die Aktivität isolierter NE, was bedeutet, dass im BAL-Überstand vermutlich ein Überschuss an endogenem Inhibitor vorhanden ist (Abbildung S5 (SI)). Wahrscheinlicher Kandidat ist die Antiprotease A1 AT, die ein wichtiger physiologischer NE-Inhibitor in der Lunge ist und NE durch die Bildung eines kovalenten Komplexes inhibiert.<sup>[21–23]</sup>

Nachfolgend untersuchten wir die Hypothese, dass sich die NE-Aktivität ausschließlich auf der Neutrophilenoberfläche befindet und durch die Zellen geleitet ihre Substrate erreicht. Um die Zelloberflächen-assoziierte NE-Aktivität sichtbar zu machen, wurden BAL-Neutrophile mit NEMo-2 inkubiert und auf einem Objekträger verteilt, und die Sondenhydrolyse wurde fluoreszenzmikroskopisch gemessen. Auf Neutrophilen des Wt, aber nicht auf solchen von NE<sup>-/-</sup>-Mäusen, wurde ein deutlicher Anstieg des D/A-Verhältnisses auf der Zelloberfläche gemessen. Dies bedeutet, dass es sich um NE-spezifische Hydrolyse handelt (Abbildung 3). Alternativ zum Aufbringen der BAL-Zellen auf einem Objekträger wurden die Zellen direkt in Zellkulturschalen gegeben. Nach kurzer Zeit hatten sie sich auf dem Boden abgesetzt und konnten direkt nach Inkubation mit NEMo-2 mikroskopisch untersucht werden. Wir beobachteten eine definierte Plasmamembranfärbung, die vergleichbar mit der Verteilung auf RAW-Makrophagen war. Auf der Oberfläche von Wt-Neutrophilen, aber nicht auf NE<sup>-/-</sup>-Neutrophilen, wurde NE-Aktivität gefunden (Abbildung S6 (SI)). Auch zeigte die direkte Akzeptoranregung von Neutrophilen auf Objekträgern



**Abbildung 3.** NE-Aktivitätsmessung auf primären Mausatemwegsneutrophilen, isoliert aus LPS-behandelten Mäusen. Neutrophile von Wt- oder NE-defizienten (NE<sup>-/-</sup>) Mäusen wurden mit NEMo-2 inkubiert und auf Objekträgern verteilt. a) Donorfluoreszenz und sensibilisierte Akzeptoremission wurden gemessen und daraus D/A-Verhältnis-Bilder erstellt. NEMo-2 wurde von Wt-Neutrophilen rasch gespalten, wogegen auf NE<sup>-/-</sup>-Neutrophilen keine Hydrolyse beobachtet wurde. blau = niedriges D/A-Verhältnis bei intaktem NEMo-2; rot = hohes D/A-Verhältnis, Signal der gespaltenen Sonde NEMo-2. b) D/A-Verhältnisse zeigten einen 4-fachen Anstieg bei Wt-Neutrophilen gegenüber NE<sup>-/-</sup>-Neutrophilen. Daten sind als Mittelwerte ± SEM gezeigt; n = 6 Mäuse pro Gruppe. Skalierungsbalken = 20 µm.

gern ein ausgeprägtes Signal für TAMRA auf NE<sup>-/-</sup>-Neutrophilen, aber nicht auf Wt-Neutrophilen. Dies heißt, dass NEMo-2 nur auf der äußeren Plasmamembran zu finden ist, da das TAMRA-Fragment nach Spaltung die Zelloberfläche durch Diffusion verlassen konnte. Ferner blockierte die Zugabe von A1 AT vollständig die Hydrolyse der Sonde, was ebenfalls nur bei einer Lokalisation von NEMo-2 auf der äußeren Membranseite möglich ist (Abbildung S7 (SI)). Die Befunde zeigen, dass NE ihre Aktivität vorwiegend auf der Zelloberfläche von Neutrophilen ausübt. Durch eine Mischung aus membrangebundenem und ständig sekretiertem Enzym kann wahrscheinlich ein Gradient von Enzymaktivität ausgehend von der Plasmamembran aufrechterhalten werden.

Unsere Befunde lassen vermuten, dass bei einer Lungenentzündung NE vorwiegend auf der Oberfläche der infiltrierenden Neutrophilen aktiv ist und nicht in der extrazellulären Flüssigkeit, die die Atemwegsepithele benetzt. Dies bedeutet, dass die proteolytische Aktivität auf Bereiche in direktem Kontakt zu Neutrophilen beschränkt ist. Die lokale Menge an Membran-assoziierten NE könnte es Neutrophilen ermöglichen, mit dem Zielgewebe zu wechselwirken und dabei eine Mikroumgebung zu schaffen, die es ermöglicht, die NE-Aktivität vor der hohen endogenen Antiproteasekonzentration zu schützen. NE ist ein diagnostischer Marker für chronische Neutrophilen-basierte Entzündungsleiden wie COPD und CF<sup>[4,9,24]</sup> und zukünftige Behandlungsstrategien für diese Krankheiten sollten die lokale Enzymaktivität berücksichtigen. Idealerweise sollten Wirkstoffkandidaten direkt auf Neutrophile gerichtet sein und sich in die Plasmamembran insertieren, um NE direkt auf der Zelloberfläche zu inhibieren. Als Alternative könnten Verbindungen verwendet werden, die die Wechselwirkung der Neutrophilen mit der extrazellulären Matrix verhindern und so die Proteolyse der Matrixproteine verringern.

Mit den neuen ratiometrischen Fluoreszenzsonden haben wir nun die Hilfsmittel, um zwei der wichtigsten Proteasen, die bei chronischer Entzündung für die proteolytische Schädigung der Lunge verantwortlich sind – MMP12 und NE – zu messen. Überraschenderweise sind beide vorwiegend auf der Oberfläche der sie sekretierenden Zellen aktiv. Diese räumliche Beschränkung ist gegebenenfalls essenziell für den Schutz des Lungengewebes oder auch anderer Organe vor exzessiver Proteolyse und Zerstörung der extrazellulären Matrix.

Eingegangen am 29. Dezember 2011,  
veränderte Fassung am 24. Februar 2012  
Online veröffentlicht am 3. Mai 2012

**Stichwörter:** Fluoreszenzsonden · FRET · Lungenemphysem · Medizinische Chemie · Proteasen

- [1] B. Korkmaz, M. S. Horwitz, D. E. Jenne, F. Gauthier, *Pharmacol. Rev.* **2010**, *62*, 726–759.
- [2] A. Belaaouaj, R. McCarthy, M. Baumann, Z. Gao, T. J. Ley, S. N. Abraham, S. D. Shapiro, *Nat. Med.* **1998**, *4*, 615–618.
- [3] S. D. Shapiro, N. M. Goldstein, A. M. Houghton, D. K. Kobayashi, D. Kelley, A. Belaaouaj, *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 2329–2335.
- [4] P. D. Sly, S. Brennan, C. Gangell, N. de Clerk, C. Murray, L. Mott, S. M. Stick, P. J. Robinson, C. F. Robertson, S. C. Ranganathan, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2009**, *180*, 146–152.
- [5] P. Birrer, N. G. McElvaney, A. Rudeberg, C. W. Sommer, S. Liedechti-Gallati, R. Kraemer, R. Hubbard, R. G. Crystal, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1994**, *150*, 207–213.
- [6] C. A. Owen, *Int. J. Chronic Obstruct. Pulm. Dis.* **2008**, *3*, 253–268.
- [7] U. Demkow, F. J. van Overveld, *Eur. J. Med. Res.* **2010**, *15*, 27–35.
- [8] P. O. Ganrot, C. B. Laurell, S. Eriksson, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1967**, *19*, 205–208.
- [9] T. Z. Khan, J. S. Wagener, T. Bost, J. Martinez, F. J. Accurso, D. W. Riches, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1995**, *151*, 1075–1082.
- [10] M. J. Castillo, K. Nakajima, M. Zimmerman, J. C. Powers, *Anal. Biochem.* **1979**, *99*, 53–64.
- [11] K. Nakajima, J. C. Powers, B. M. Ashe, M. Zimmerman, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 4027–4032.
- [12] O. Wiesner, R. D. Litwiller, A. M. Hummel, M. A. Viss, C. J. McDonald, D. E. Jenne, D. N. Fass, U. Specks, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 5305–5312.
- [13] C. A. Owen, M. A. Campbell, P. L. Sannes, S. S. Boukedes, E. J. Campbell, *J. Cell. Biol.* **1995**, *131*, 775–789.
- [14] B. Korkmaz, S. Attucci, M. A. Juliano, T. Kalupov, M. L. Jourdan, L. Juliano, F. Gauthier, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 991–1000.
- [15] E. J. Campbell, C. Owen, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 14645–14654.
- [16] T. Kalupov, M. Brillard-Bourdet, S. Dade, H. Serrano, J. Waruelle, N. Guyot, L. Juliano, T. Moreau, A. Belaaouaj, F. Gauthier, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 34084–34091.
- [17] A. Cobos-Correa, J. B. Trojanek, S. Diemer, M. A. Mall, C. Schultz, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 628–630.
- [18] Nomenklatur verwendet wie in: I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 157–162.
- [19] G. Matute-Bello, C. W. Frevert, T. R. Martin, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2008**, *295*, L379–L399.
- [20] B. Starcher, I. Williams, *Lab. Anim.* **1989**, *23*, 234–240.
- [21] E. Remold-O'Donnell, *J. Exp. Med.* **1985**, *162*, 2142–2155.
- [22] T. Sugimori, J. Cooley, J. R. Hoidal, E. Remold-O'Donnell, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1995**, *13*, 314–322.
- [23] B. Faller, M. Cadene, J. G. Bieth, *Biochemistry* **1993**, *32*, 9230–9235.
- [24] M. L. Bartoli, A. Di Franco, B. Vagaggini, E. Bacci, S. Cianchetti, F. L. Dente, M. Tonelli, P. L. Paggiaro, *Respiration* **2009**, *77*, 265–272.